

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 486**

51 Int. Cl.:

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2011** **E 11152942 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015** **EP 2392358**

54 Título: **Injertos quirúrgicos para reparar defectos condrales**

30 Prioridad:

04.02.2010 US 700469

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

21.07.2015

73 Titular/es:

**FAWELL MEDICINE CO. (100.0%)
5F.-2, No. 252, Sec. 2, Xinglong Road
Tapei City 11690, TW**

72 Inventor/es:

**LIU, HWA-CHANG;
LIN, FENG-HUEI;
LEE, SHING-MOU y
YEN, CHUN-CHE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 541 486 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

Injertos quirúrgicos para reparar defectos condrales.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a injertos quirúrgicos para reparar un defecto condral.

10 **Antecedentes de la invención**

10 El trasplante de condrocitos autógenos se ha utilizado para tratar el defecto condral desde 1994, y comprende recoger condrocitos de tejidos cartilagosos normales, expandir estas células en un medio *in vitro* lo más posible, y después rellenar el defecto condral implantando las células expandidas en armazones artificiales. Sin embargo, todavía hay muchos problemas; por ejemplo, la fuente de condrocitos autógenos es limitada, la capacidad de proliferación de los condrocitos es baja y sus fenotipos únicos pueden perderse durante la expansión (Saadeh *et al.*, Human cartilage engineering: chondrocyte extraction, proliferation, and characterization for construct development. Ann Plast Surg 1999; 42:509-13).

20 Las células madre mesenquimatosas (MSC) pueden diferenciarse para dar células de linajes de tejido conjuntivo incluyendo cartílago y por tanto se convierten en una fuente celular atractiva para la ingeniería tisular de cartílago. Se han utilizado muchos procedimientos en la inducción condrogénica de MSC. Kavalkovich *et al.* proporcionaron un procedimiento de cultivo de sedimentos que imitaba el entorno del desarrollo de cartílago embrionario, en el que se obtuvo una alta densidad celular de células pero estaba presente una masa de células estrechamente agregadas con una gran cantidad de células que formaba tan sólo un pequeño volumen de tejido condral. Por tanto, se requería un número considerablemente grande de los sedimentos celulares para reparar un cartílago defectuoso, y los grandes sedimentos mostraron una periferia de células viables, pero el centro del sedimento se volvía necrótico (Kavalkovich *et al.*, Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells within an alginate layer culture system. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2002; 38:457-66). Además, los sedimentos son difíciles de manipular y moldear para obtener diversas formas necesarias para la reparación de defectos. Teniendo en cuenta lo anterior, el cultivo de sedimentos resulta poco práctico para aplicaciones quirúrgicas. Además, se encontró que la incorporación de MSC humanas (hMSC) en geles de agarosa o alginato podía colarse para obtener diversas formas y provocaba condrogénesis sustancial (Huang *et al.*, Chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in agarose culture. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 2004; 278:428-36; y Ma *et al.*, Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. J Biomed Mater Res A 2003; 64:273-81). Sin embargo, los armazones de alginato o agarosa para la ingeniería tisular de cartílago presenta los siguientes inconvenientes: mala adhesión celular y degradación incontrolable del alginato tras la difusión de cationes divalentes al medio circundante. Además, se utilizaron matrices de alginato en las aplicaciones *in vivo* y se notificó que presentaban intensas reacciones de células gigantes frente a cuerpos extraños y respuestas inmunológicas cuando se implantaban para tratar defectos de grosor completo en cartílago en animales de experimentación (Hunziker, Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. Osteoarthritis Cartilage 2001; 0:432-63). Por tanto, no se han empleado matrices de alginato en pacientes humanos para la reparación de cartílago articular.

45 También se ha descrito la formación de microesferas mediante combinación de células madre mesenquimatosas con una disolución de colágeno de tipo I al 0,05 - 0,3% p/v. Se induce diferenciación condrogénica en un medio de inducción condrogénico que contiene TGF-beta 3. Las micromasas producidas se integran bien en tejido huésped y se utilizan para tratar por ejemplo artritis (Hui *et al.*, In vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen microspheres: Influence of cell seeding density and collagen concentration. Biomaterials 29 (2008); 3201-3212).

50 Todavía se desea desarrollar un injerto quirúrgico para reparar un defecto condral en un paciente.

Sumario de la invención

55 La presente invención se basa en dos descubrimientos inesperados de que (1) un implante que contiene una matriz de colágeno en la que se incorporan células de tipo condrocitos repara defectos condrales cuando se implanta en un sitio de defecto condral, y (2) no se forma ningún hueco entre el implante y los tejidos en el sitio de implantación.

60 Por consiguiente, un aspecto de esta invención presenta un implante de reparación de defectos condrales que contiene una matriz de colágeno en la que se incorporan células de tipo condrocitos y complementada con factor de crecimiento transformante beta uno (TGF-β1). Este implante, libre de lagunas, se prepara cultivando células madre mesenquimatosas (MSC) en un medio que contiene colágeno (por ejemplo, colágeno de tipo I o tipo II) que contiene colágeno a una concentración del 1% al 10% p/v y complementado con TGF-β1 durante de 7 a 21 días y en condiciones que permiten la diferenciación de MSC para dar las células de tipo condrocitos y la formación del implante. Las células de tipo condrocitos secretan glicosaminoglicano. Las MSC pueden obtenerse a partir de

65

médula ósea, tejido adiposo, tejido muscular, pulpa dentaria de dientes de leche de bebé, sangre del cordón umbilical, gelatina de Wharton, placenta o membrana de revestimiento del cordón.

5 La etapa de cultivo mencionada anteriormente se realiza cultivando las MSC en un medio que contiene colágeno complementado con TGF- β 1 durante de 7 a 21 días en condiciones que permiten la formación de una matriz de colágeno y la diferenciación de las MSC para dar células de tipo condrocitos, que se incorporan en la matriz de colágeno. El medio que contiene colágeno presenta una concentración de colágeno del 1% al 10% p/v (por ejemplo, de aproximadamente el 3% p/v). Esta etapa de cultivo puede llevarse a cabo en una cápsula.

10 Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un implante tal como se describió anteriormente para su utilización como medicamento. En otro aspecto, la presente invención se refiere a un implante tal como se describió anteriormente para su utilización como medicamento para tratar un defecto condral.

15 Preferentemente, el defecto condral se selecciona de entre el grupo constituido por hueso inmaduro, artritis intensamente degenerativa en la que se necesita artroplastia total de articulación, otros defectos tales como rotura del ligamento cruzado y lesión de menisco, artritis tal como artritis reumatoide y artritis gotosa, y enfermedad infecciosa tal como sida y hepatitis B.

20 A continuación se describen con detalle las diversas formas de realización de la presente invención. Otras características de la presente invención se presentarán claramente en las siguientes descripciones detalladas y dibujos sobre las diversas formas de realización y reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

25 Con el fin de ilustrar la invención, en los dibujos se muestran formas de realización que se prefieren actualmente. Sin embargo, debe entenderse que la invención no se limita a las formas de realización preferidas mostradas.

En los dibujos:

30 La figura 1 muestra la puntuación de IKDC de los 9 pacientes tratados con el procedimiento según la invención, en la que se encontró una mejora significativa mediante la prueba de la t de Student 6 meses y 12 meses tras la operación.

35 La figura 2 es una imagen que muestra la observación artroscópica de un paciente tratado con el procedimiento según la invención 12 meses tras el trasplante; en la que no había ningún hueco entre el sitio receptor y el injerto quirúrgico creado mediante el complejo de células-matriz.

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención presenta un procedimiento para reparar un defecto condral en un paciente con un implante que comprende una matriz de colágeno en la que se incorporan células de tipo condrocitos y factor de crecimiento transformante beta uno (TGF- β 1) en el que las células de tipo condrocitos se diferencian a partir de células madre mesenquimatosas (MSC) y secretan glicosaminoglicano, mediante lo cual puede repararse el defecto condral sin ningún hueco entre el injerto.

45 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Tal como se utiliza en la presente memoria, los siguientes términos presentan los significados que se les atribuye a menos que se especifique otra cosa.

50 Los artículos “un” y “una” se utilizan en la presente memoria para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

55 El término “células madre mesenquimatosas” o “MSC” utilizado en la presente memoria se refiere a células madre multipotentes derivadas de tejidos adultos incluyendo, pero sin limitarse a, médula ósea, tejido adiposo, tejido muscular, pulpa dentaria de dientes de leche de bebé, sangre del cordón umbilical o gelatina de Wharton.

60 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “condrocitos” se refiere a células de cartílago maduras, que se incorporan dentro de las lagunas (pequeñas cavidades) en la matriz. Los condrocitos surgen mediante diferenciación de células condrogénicas mesenquimatosas para dar condroblastos, que son las células más tempranas para producir matriz cartilaginosa. Los condrocitos maduros son grandes células secretoras con un núcleo esférico y un nucléolo prominente. Por tanto, se considera que la formación de lagunas en condrocitos es una característica de condrocitos maduros.

65

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “células de tipo condrocitos” se refiere a las células que presentan las propiedades de las células secretoras condrocitos, tales como secretar glicosaminoglicano (GAG), pero no forman lagunas, una característica típica de condrocitos maduros.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “una matriz de colágeno” se refiere a un producto de ingeniería tisular formado cultivando las MSC en un medio que contiene colágeno, en el que se incorporan células de tipo condrocitos que pueden secretar glicosaminoglicano (GAG) pero sin lagunas.

10 La presente invención proporciona un procedimiento para reparar un defecto condral en un paciente que comprende:
proporcionar un implante que contiene una matriz de colágeno en la que se incorporan células de tipo condrocitos y factor de crecimiento transformante beta uno (TGF- β 1), diferenciándose las células de tipo condrocitos a partir de células madre mesenquimatosas (MSC) y secretando glicosaminoglicano, y

15 colocar el implante en el paciente en un sitio de defecto condral; en el que el implante está libre de lagunas.

En la invención, el implante contiene una matriz de colágeno en la que se incorporan células de tipo condrocitos y factor de crecimiento transformante beta uno (TGF- β 1), que puede obtenerse cultivando MSC en un medio que contiene colágeno complementado con factor de crecimiento transformante beta uno (TGF- β 1) en condiciones que permiten la diferenciación de las MSC para dar las células de tipo condrocitos y la formación del implante.

20 En un ejemplo de la invención, se cultivaron las MSC en un medio que contiene colágeno (por ejemplo, colágeno de tipo I o tipo II) complementado con TGF- β 1 para la diferenciación a partir de las MSC para dar células de tipo condrocitos que se caracterizaron evaluando el contenido en glicosaminoglicano (GAG) para garantizar que se indujeron las MSC para dar tejido similar a cartilago, y se detectó si se formaron lagunas. Se recogió la matriz de colágeno en la que se incorporan células de tipo condrocito; que es un constructo de ingeniería tisular utilizado como molde.

25 En un ejemplo de la invención, se expandieron las MSC y se cultivaron, y después se incorporaron y se cultivaron en un medio que contenía colágeno, y se complementaron con factor de crecimiento transformante beta uno (TGF- β 1) en condiciones para la inducción condrogénica para dar células de tipo condrocitos. Se recoge la matriz de colágeno en la que se incorporan células de tipo condrocitos que secretan glicosaminoglicano (GAG). La matriz de colágeno puede examinarse mediante procedimientos de rutina para confirmar que no se produce formación de lagunas y que las células de tipo condrocitos incorporadas en la misma secretan GAG.

30 En la invención, puede utilizarse cualquier procedimiento, condición o tecnología convencional para permitir que las MSC se diferencien para dar las células de tipo condrocitos y la formación de la matriz de colágeno como implante.

35 En un ejemplo de la invención, el colágeno puede ser colágeno de tipo I o tipo II, o una combinación de los mismos. La concentración de colágeno es de desde el 1% hasta el 10% p/v, y más preferentemente de aproximadamente el 3%.

40 Según la invención, el implante puede administrarse fácilmente a un sitio de defecto condral mediante un émbolo de tipo jeringa. En una forma de realización de la invención, se carga el implante en una cápsula y el implante puede colocarse apretando el implante para extraerlo de la cápsula y aplicándolo en el sitio de defecto condral.

45 Por consiguiente, la invención también proporciona un implante para reparar un defecto condral, que comprende una matriz de colágeno en la que se incorporan células de tipo condrocitos y complementada con factor de crecimiento transformante beta uno (TGF- β 1), diferenciándose las células de tipo condrocitos a partir de células madre mesenquimatosas (MSC) y secretando glicosaminoglicano, en el que el implante está libre de lagunas.

50 Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un implante tal como se describió anteriormente para su utilización como medicamento. En otro aspecto, la presente invención se refiere a un implante tal como se describió anteriormente para su utilización como medicamento para tratar un defecto condral.

55 Preferentemente, el defecto condral se selecciona de entre el grupo constituido por hueso inmaduro, artritis intensamente degenerativa en la que se necesita artroplastia total de la articulación, otros defectos tales como rotura del ligamento cruzado y lesión de menisco, artritis tal como artritis reumatoide y artritis gotosa, y enfermedad infecciosa tal como sida y hepatitis B.

60 Según la invención, el implante puede prepararse mediante el procedimiento que comprende:

proporcionar unas células madre mesenquimatosas (MSC); y

cultivar las MSC en un medio que contiene colágeno complementado con factor de crecimiento transformante beta uno (TGF- β 1) en condiciones que permiten la diferenciación de las MSC para dar las células de tipo condrocitos y la formación del implante.

- 5 A continuación, se describirá la presente invención más específicamente haciendo referencia a las siguientes formas de realización, que se proporcionan a título demostrativo no limitativo.

Ejemplo 1: Aislamiento y cultivo de MSC humanas

10 Se aspiraron diez (10) ml de sangre de médula ósea heparinizada a partir del íleo de la pelvis, y se aislaron MSC de médula ósea a partir de la misma. Se cultivaron las MSC en medio de Eagle modificado por Dulbecco con bajo contenido en glucosa que contenía suero bovino fetal al 10% a 37°C con el 5% de dióxido de carbono y el 95% de humedad. Se cambió el medio dos veces por semana. Se trataron las células con tripsina y se subcultivaron a una razón de 1:3 cada semana, y después se recogieron y se incorporaron en disolución de colágeno Porcogen™
 15 (colágeno tipo I/tipo II al 3%, SunMax Biotech., Taiwán) que contenía sólo DMEM-LG libre de suero. Se cultivaron las células en alícuotas de 0,5 ml con una densidad celular final de $2,6 \times 10^6$ células/cm² en gel en placas de 24 pocillos a 37°C durante 1 hora seguido por la adición de 2,0 ml de medio por pocillo que contenía: DMEM-LG libre de suero que contenía premezcla ITS+, 2-fosfato de ácido L-ascórbico 50 ug/ml, dexametasona 10^{-7} M, complementado con TGF- β 1 10 ng/ml (Pepro Tech; Rocky Hill, NJ). Se cultivaron las células en el medio descrito anteriormente
 20 durante de 7 a 21 días, cambiándose el medio cada tres días, para permitir que las células incorporadas de manera dispersada en el medio que contenía colágeno obtuvieran una matriz de colágeno en la que se incorporaron células de tipo condrocitos. Se analizaron las mezclas de células/colágeno 7, 14 y 21 días tras la siembra de células para garantizar que se secretaba glicosaminoglicano (GAG) y que aún no se habían formado lagunas para obtener los complejos de células-matriz.

25

Ejemplo 2: Caracterización del complejo de células-matriz

Se recogieron los complejos de células-matriz, se incorporaron en parafina y se cortaron en secciones de 5 μ m. Se desparafinizaron las secciones y se rehidrataron mediante inmersión secuencial en xileno al 100%, etanol al 100%,
 30 etanol al 70%, y agua. Se utilizó tinción con hematoxilina y eosina (Muto, Tokio, Japón) de secciones de muestra para evaluar la morfología celular. Además, se utilizó tinción con azul alcian (Sigma) para evaluar el contenido en glicosaminoglicano (GAG).

Ejemplo 3: Investigación con pacientes humanos

35

1. Poblaciones de pacientes

Se seleccionaron pacientes con defectos condrales u osteocondrales a partir de osteocondritis disecante u osteonecrosis de cóndilo femoral medial, o defectos condrales limitados de osteoartritis que estaban localizados en
 40 el sitio de soporte del peso. Sin embargo, se excluyeron pacientes con hueso inmaduro, artritis intensamente degenerativa en la que se necesita artroplastia total de la articulación, otros defectos tales como rotura del ligamento cruzado y lesión de menisco, artritis tal como artritis reumatoide y artritis gotosa, y enfermedad infecciosa tal como sida y hepatitis B; pacientes completamente postrados en cama durante más de tres meses; pacientes que tomaban corticosteroides durante más de dos semanas, y pacientes alcohólicos. En total, se incluyeron 10 pacientes. De
 45 ellos, seis eran mujeres y cuatro eran hombres. La edad promedio de los pacientes fue de 66 (oscilando entre 47 y 83).

2. Operación

50 Se realizó una incisión en la línea media anterior en la rodilla y se expuso la superficie articular del cóndilo femoral medial utilizando un enfoque parapatelar medial. Se dobló mucho la rodilla para obtener fácilmente acceso al defecto osteocondral. Se retiraron residuos del defecto óseo y se llenó con hueso esponjoso extraído de la parte superior de la tibia. Entonces se trasplantaron en los defectos los complejos de células-matriz obtenidos en el ejemplo 1 como injertos quirúrgicos. Finalmente, se utilizó periostio extraído de la parte proximal de la tibia para cubrir el injerto
 55 quirúrgico. Tras la operación, todos los pacientes recibieron entrenamiento muscular regular del cuádriceps y realizaron ejercicio para mejorar la amplitud de movimiento de la rodilla.

3. Evaluación clínica

60 Se puntuó la función de la rodilla de los 10 pacientes mediante el formulario para la evaluación subjetiva de la rodilla del comité internacional de documentación sobre la rodilla (IKDC) y se realizó una exploración radiográfica antes de la operación y a los 1,5, 3, 6 y 12 meses de seguimiento. Se llevó a cabo una obtención de imágenes por resonancia (IRM) 6 meses y 12 meses tras la operación. Se realizaron un examen artroscópico y biopsia 12 meses tras la operación si los pacientes aceptaron la propuesta. Se utilizó la prueba de la t de Student para el análisis estadístico.

65

4. Resultados

5 Salvo por un paciente que no quiso volver para la evaluación 6 meses tras la operación, se realizó un seguimiento regular de los 9 pacientes restantes hasta los 12 meses. Tal como se muestra en la figura 1, la puntuación de IKDC de los pacientes tratados con el procedimiento según la invención presentó una mejora significativa mediante la prueba de la t de Student que se encontró 6 meses y 12 meses tras la operación. Los 9 pacientes se sentían mucho mejor 6 meses tras la operación. Se realizó un seguimiento de cuatro pacientes durante más de 12 meses y 3 de ellos recibieron artroscopia. Los defectos condrales se encontraron en el cartílago hialino con dureza moderada que se fusionaron sin ningún hueco entre el sitio receptor y el injerto (véase la figura 2).

10 Teniendo en cuenta lo anterior, el complejo de células-matriz que comprende células de tipo condrocitos que secretan GAG pero sin lagunas y la matriz preparada a partir del mismo según la invención mostraron una excelente eficacia en la reparación de un defecto condral en un paciente, tras el trasplante en el sitio receptor, en el que se formó cartílago hialino sin ningún hueco entre el sitio receptor y el injerto quirúrgico creado mediante el complejo de células-matriz.

15

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de un implante destinado a reparar un defecto condral, que comprende:
 - 5 proporcionar unas células madre mesenquimatosas (MSC);
cultivar las MSC en un medio de colágeno que contiene colágeno a una concentración del 1% al 10% p/v y complementado con un factor de crecimiento transformante beta uno (TGF-β1) durante de 7 a 21 días en condiciones que permiten la formación de una matriz de colágeno y la diferenciación de las MSC para dar células de tipo condrocitos, que se incorporan a la matriz de colágeno;
10 que está caracterizado por que las células de tipo condrocitos secretan glicosaminoglicano y el implante está libre de lagunas.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que las MSC son aisladas de la médula ósea, del tejido adiposo, del tejido muscular, de la pulpa dentaria de dientes de leche de bebé, de la sangre del cordón umbilical, de la gelatina de Wharton, de la placenta o de la membrana de revestimiento del cordón.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el colágeno está contenido en el medio a una concentración del 3% p/v.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el medio contiene colágeno de tipo I o de tipo II.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa de cultivo se realiza en una cápsula.
6. Implante para reparar un defecto condral, que puede ser obtenido mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 30 7. Implante según la reivindicación 6, para su utilización como medicamento.
8. Implante según la reivindicación 6, para su utilización como medicamento destinado al tratamiento de un defecto condral.
- 35 9. Implante según la reivindicación 8, en el que el defecto condral se selecciona de entre el grupo constituido por hueso inmaduro, artritis degenerativa en la que se necesita artroplastia total de la articulación, rotura del ligamento cruzado, lesión de menisco, artritis reumatoide, artritis gotosa, sida y hepatitis B.

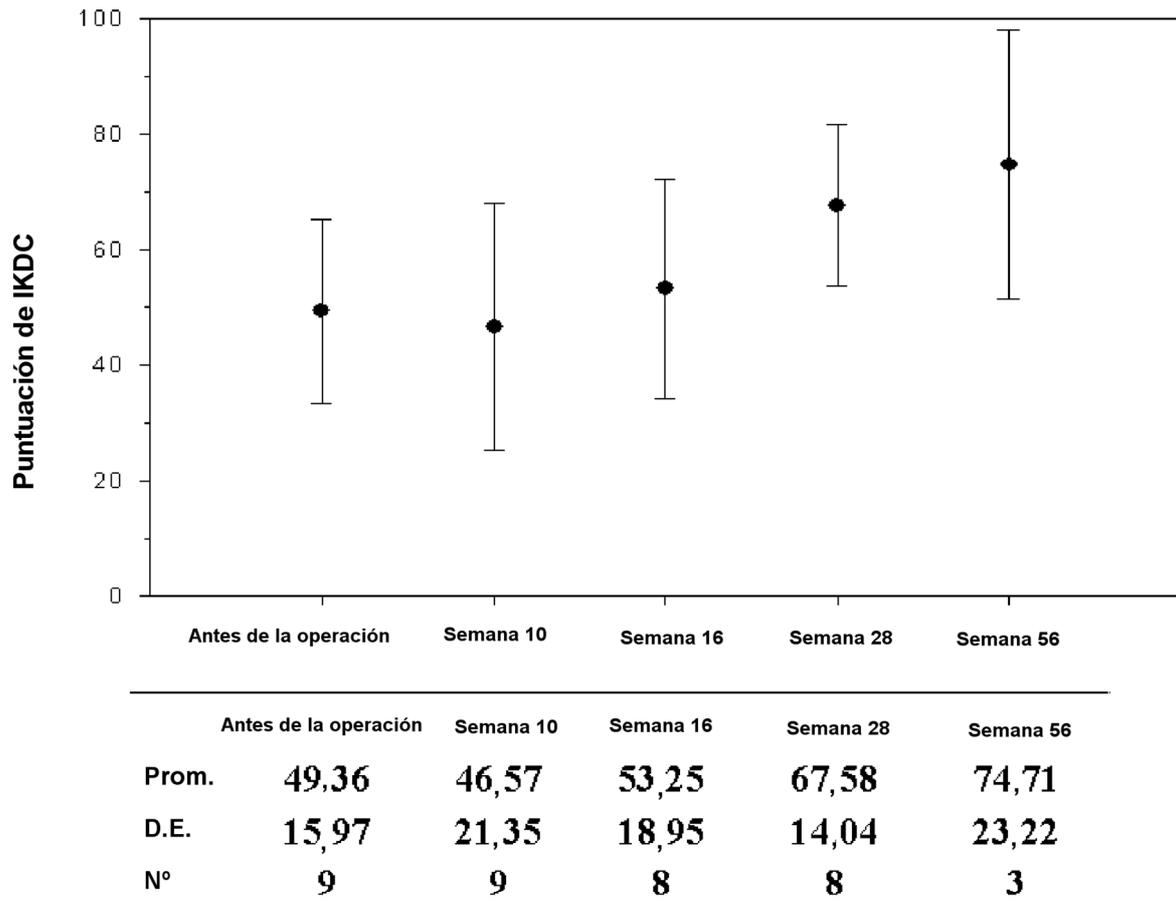


Fig. 1

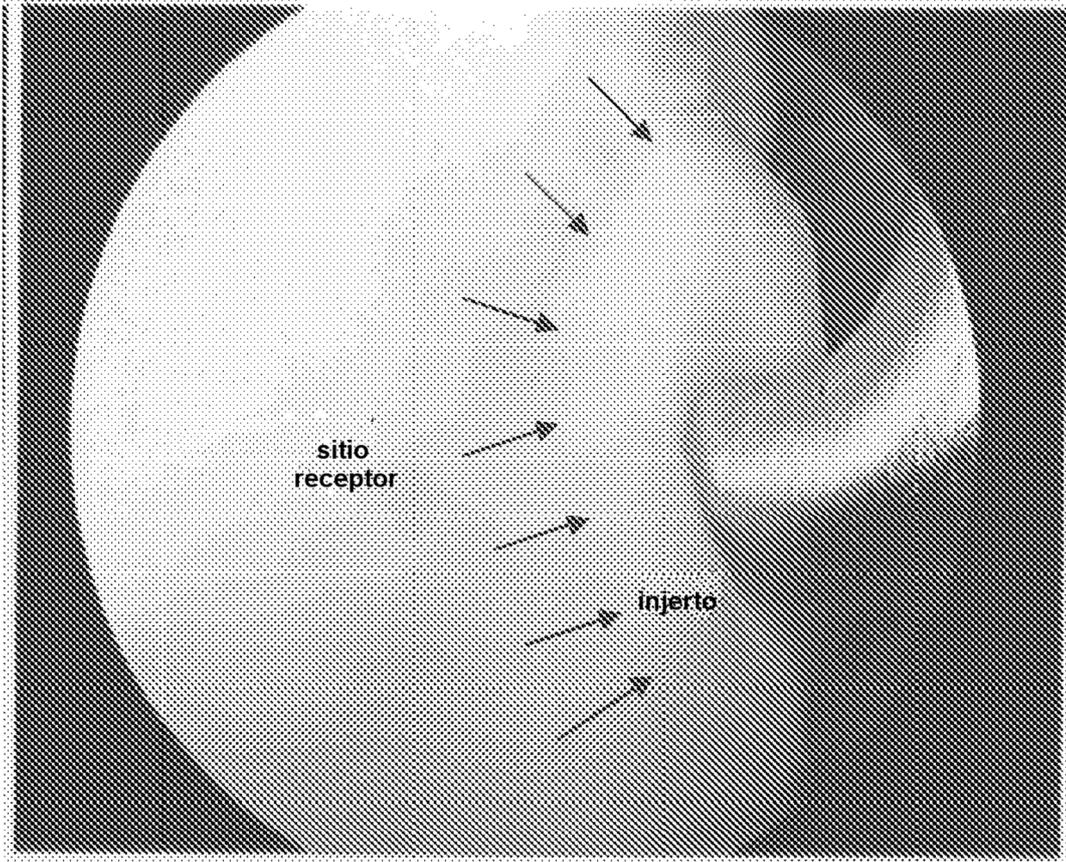


Fig. 2