

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 859**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2011 E 11382041 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2361971**

54 Título: **Procedimiento para la obtención de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración de tejido óseo**

30 Prioridad:

19.02.2010 ES 201030238

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

23.01.2017

73 Titular/es:

**BANC DE SANG I TEIXITS (100.0%)
Passeig Taulat, 116
08005 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**PLA CALVET, PABLO ARNAU;
GARCÍA LÓPEZ, JUAN;
VIVES ARMENGOL, JOAQUIM;
CAMINAL BOBET, MARTA;
GODIA CASABLANCAS, FRANCESC;
CAIRO BADILLO, JORDI JOAN y
AGUIRRE CANYADELL, MARIUS**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Carlos

Observaciones :

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

ES 2 597 859 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

Procedimiento para la obtención de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración de tejido óseo

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración de tejidos óseos. Más en particular, la presente invención se refiere a un producto que comprende principalmente células mesenquimales de origen óseo expandidas, inmovilizadas sobre soportes óseos y amalgamadas mediante geles de fibrina. Dicho procedimiento comprende fundamentalmente las etapas de colonización de los soportes óseos y el amalgamado de las partículas colonizadas en base a geles de fibrina.

10 La reconstrucción de segmentos óseos debido a traumatismos, enfermedades degenerativas, inflamación y el tratamiento quirúrgico de tumores es un problema clínico no resuelto. Los tratamientos disponibles en la actualidad incluyen el trasplante de tejido óseo autólogo, heterólogo y la utilización de implantes en base a diversos tipos de biomateriales. Entre las anteriores aproximaciones el autoinjerto de hueso obtenido de diversas localizaciones, como por ejemplo la cresta ilíaca, es el tratamiento preferido para una amplia variedad de condiciones ortopédicas. Entre estas se encuentran el reemplazo de defectos óseos, la consolidación de fracturas complicadas o los defectos de unión. La utilización de tejido autólogo como vehículo de la regeneración ósea cumple una serie de requisitos básicos claves, aporta una matriz estructural osteoinductiva, factores de crecimiento que promueven la vascularización y osteoinducción del implante e introduce células con potencial osteogénico.

20 A pesar de los beneficios derivados, desde un punto de vista exclusivamente mecanístico, la utilización de autoinjertos en la práctica clínica presenta una serie de importantes inconvenientes. Frecuentemente, no se consigue una sustitución completa del tejido óseo dañado con el autoinjerto. Esta circunstancia puede desencadenar a largo plazo en la rotura del injerto. Se ha estimado que transcurridos 10 años el porcentaje de rotura es del 60% y se encuentra asociada a multitud de factores como la disminución en la mineralización del hueso neoformado, la producción de microfracturas o la actividad de los osteoclastos (Wheeler DL y otros, *Allograft bone decreases in strength in vivo over time. Clin Orthop Relat Res.* 2005;435:36-42.). Por otro lado, la obtención quirúrgica del hueso autólogo frecuentemente lleva asociada una elevada morbilidad variable (Laurie SW y otros, *Donor-site morbidity after harvesting rib and iliac bone. Plast Reconstr Surg.* 1984;6:93-98.) en función de la localización anatómica y la técnica de extracción (Chou LB y otros, *Stress fracture as a complication of autogenous bone graft harvest from the distal tibia. Foot Ankle Int.* 2007;2:199-201; Brawley SC y otros, *Results of an alternative autogenous iliac crest bone graft harvest method. Orthopedics.* 2006;4:342-346.).

35 La utilización de células madre mesenquimales sobre matrices para huesos obtenidos por ingeniería tisular ha sido descrita (LIU G y otros, *TISSUE ENGINEERING. PART A MAR 2010, vol.16, págs. 971-982*; LIU G y otros, *CRYOBIOLOGY*, 2008, vol.56, págs. 209-215).

40 La utilización de hueso humano procedente de bancos de tejidos soluciona el problema de la morbilidad asociada a los autoinjertos, pero carece de los beneficios asociados a la actividad regeneradora aportada por el componente celular, la cual se ha determinado como un factor clave. Este tipo de injertos presentan una incorporación lenta en el hueso nativo que puede acabar produciendo inestabilidad mecánica durante esfuerzos o poca afinidad celular, circunstancias que se traducen en la no unión con el hueso nativo (Enneking WF y otros, *Observations on massive retrieved human allografts. J Bone Joint Surgery.* 1991;73:1123-1142; Turk JB y otros, *Bone source from craneomaxillofacial reconstruction. Facial Plast Surg.* 2000;16:7-14). Esta problemática sitúa la tasa de fracaso de esta técnica entre el 10 y el 40% (Ottolenghi CE. *Massive osteo and osteo-articular bone grafts: technique and results of 62 cases. Clin Orthop Relat Res* 1972;87:156-64). Por esta razón, aunque se disponga de tejido óseo de banco, el tratamiento más frecuente de lesiones óseas importantes es el autoinjerto.

50 Como respuesta a la problemática mencionada, la presente invención da a conocer un procedimiento para preparar un producto basado en la ingeniería tisular, cuya utilización resulta en una alternativa terapéutica eficaz. El uso del producto obtenido mediante el procedimiento que da a conocer la presente invención se fundamenta en la utilización de matrices en base a biomateriales, combinadas con células madre para inducir la regeneración de los tejidos óseos dañados.

55 Las matrices utilizadas en la presente invención muestran varias características, que resultan claves para realizar la función de soporte a la reconstrucción del tejido diana. Entre estas características se destacan que son biocompatibles, reabsorbibles, poseen integridad estructural y características mecánicas que se adecuan a la zona de implantación. Además, deben ser capaces de generar un entorno biológico que garantice el aporte de nutrientes a las células para asegurar que estas puedan realizar su función regeneradora. A las anteriores características debe añadirse que una matriz orientada a la regeneración de tejidos óseos debería poseer capacidad de inducir osteoinducción.

60 El segundo componente fundamental del producto de ingeniería tisular de la presente invención son las células. Dichas células también exhiben varias características relevantes tales como la facilidad y seguridad de su preparación, son una fuente segura desde el punto de vista citogenético y tienen propiedades de multipotencialidad, que les permite diferenciarse hacia células responsables de la producción de tejido óseo, los osteoblastos.

Por lo tanto, la presente invención da a conocer un procedimiento para la preparación de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración ósea. Dicho procedimiento se fundamenta en la utilización de células mesenquimales expandidas, de origen autólogo o alogénico, procedentes de la médula ósea, dichas células se inmovilizan sobre soportes en base a partículas de hueso desantigenizado o desantigenizado/desmineralizado. El producto obtenido por dicho procedimiento se amalgama y estabiliza en la zona de implantación utilizando geles de fibrina. El tratamiento con el producto obtenido por el procedimiento de la presente invención tiene como principal ventaja respecto de los tratamientos basados en el autoinjerto, que no es necesario someter al receptor de la terapia a una o varias intervenciones de cirugía mayor para la extracción del material biológico.

El material celular necesario para la preparación del producto de Ingeniería Tisular según la presente invención se obtiene mediante la extracción de médula ósea que se realiza de forma ambulatoria. Esta aproximación, por lo tanto, evita las complicaciones potencialmente graves derivadas de la obtención de material óseo autólogo tales como dolor crónico, afectación del tejido nervioso y arterial, inestabilidad de la pelvis, infección y cicatrices (Banwart JC y otros, Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. Spine. 1995;20:1055-1060).

Por otro lado, el procedimiento según la presente invención, que utiliza de forma combinada células mesenquimales y una matriz de reconocida capacidad osteoinductora, preferentemente hueso desantigenizado o desantigenizado/desmineralizado permite superar las limitaciones impuestas por la utilización de hueso procedente de banco de tejidos sin componente celular, que muestra un índice de fracaso en la integración ósea de entre el 10% y el 40%.

La combinación de matrices óseas desmineralizadas/desantigenizadas o desantigenizadas con médula ósea no procesada ha demostrado acelerar y incrementar la formación de hueso en comparación a la utilización de la matriz ósea por sí sola (Rougraft BT., Treatment of active unicameral bone cysts with percutaneous injection of demineralized bone matrix and autogenous bone marrow. J. Bone Joint Surg. Am. 2002;84:921). Aunque este resultado pone de manifiesto que la médula ósea, es decir las células con posible potencial osteogénico contenidas en ella, puede ser un elemento clave en la actividad terapéutica del producto, al actuar como catalizadores de la formación de tejido sano.

Sin embargo, la médula ósea está constituida por un conjunto celular heterogéneo que incluye todas las células de linaje hematopoyético, células endoteliales, células de tejido adiposo así como un porcentaje, menor al 0,01% de células mesenquimales multipotentes. Esta población de células mesenquimales es la que mediante un proceso de diferenciación dará lugar a los osteoblastos, que son los principales responsables de la formación de hueso. Lógicamente este bajo porcentaje de las células mesenquimales en la médula ósea supone una limitación en la capacidad regeneradora de esta fuente celular. Por lo tanto, existe un grado de incertidumbre elevado en el resultado del tratamiento, al no ser posible determinar la cantidad de células con capacidad osteoinductora aplicadas y fijadas a la zona de la lesión.

Los presentes inventores han descubierto que mediante el procedimiento de la presente invención, en el que se conjugan matrices óseas mediante un proceso de inmovilización de un producto celular enriquecido en células mesenquimales se obtienen resultados sorprendentes en la regeneración ósea. Dicho producto presenta una excelente capacidad osteoinductora y se obtiene mediante una selección y posterior expansión in vitro de estas células mesenquimales.

El procedimiento de la presente invención, mediante la manipulación del proceso de expansión de las células mesenquimales, permite generar un amplio rango de cantidades de injerto óseo, que facilita el tratamiento de lesiones de diverso tamaño y origen. Esta característica hace que el producto obtenido mediante el procedimiento según la presente invención sea aplicable en un abanico de aproximaciones terapéuticas tales como la reconstrucción ósea maxilofacial, en osteoartrosis, en osteonecrosis, en el reemplazo de defectos óseos, en la fusión intervertebral, en la consolidación de fracturas complicadas o en los defectos de unión.

Por otro lado, la conjugación de las células mesenquimales a las matrices óseas mediante un proceso de colonización, permite la localización de las células con potencial osteogénico en la zona a regenerar. Esta característica asegura la actividad celular reparadora en la zona a tratar y a diferencia de otras aproximaciones de ingeniería tisular, que introducen las células sin inmovilizar en la matriz. Además, esto garantiza la permanencia de las células mesenquimales en la zona de la lesión donde deben realizar la labor reparadora.

Finalmente, el amalgamado de estas partículas de hueso colonizadas con células mesenquimales mediante geles de fibrina permite dotar al conjunto de plasticidad y capacidad de manipulación, facilitando a su vez la inmovilización de la mezcla en la zona a tratar y dándole la arquitectura requerida.

Descripción detallada de la invención.

La presente invención da a conocer un procedimiento para la preparación de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración de tejidos óseos. Dicho producto está constituido por un componente celular consistente en células mesenquimales expandidas a partir de la médula ósea y un componente no celular en base a matrices óseas. El procedimiento comprende las etapas de:

- a) expansión de células mesenquimales;
- b) conjugación/inmovilización de las células mesenquimales obtenidas en (a) en matrices óseas;
- c) lavado de la suspensión ósea; y
- d) acondicionado final (amalgamado).

El tamaño de la lesión a tratar determinará la cantidad de células mesenquimales requeridas para una adecuada regeneración ósea. Una vez obtenida en la etapa (a) la dosis de células mesenquimales requeridas, se inicia la etapa de conjugación de éstas a una matriz ósea. Esta conjugación-inmovilización se puede realizar mediante sistemas dinámicos o estáticos.

En el caso de que se utilice un sistema dinámico, las células mesenquimales obtenidas en la etapa de expansión (a) se resuspenden en medio de cultivo, preferentemente medio DMEM complementado con suero a una concentración no superior 1×10^7 células por mililitro y no inferior a 1×10^3 células por mililitro. A continuación, se dispensa la suspensión celular de forma estéril en una bolsa o frasco de cultivo, que puede estar dotado o no de agitador pendular previamente cargado con la matriz ósea. La relación número de células por centímetro cúbico de matriz ósea se mantendrá dentro del intervalo de 1×10^2 a 1×10^8 células por centímetro cúbico. Una vez añadida la suspensión celular al frasco, bioreactor o bolsa de cultivo, se incuba con agitación durante 4 a 24 horas a una temperatura de 37°C , una saturación de CO_2 del 5%, y humedad relativa del 95%. Las condiciones de agitación empleadas para garantizar el anclaje de las células son de 1 a 120 revoluciones por minuto.

En caso de emplear un sistema de inmovilización estático, las células mesenquimales obtenidas en la etapa de expansión (a) se resuspenden en medio de cultivo, preferentemente medio DMEM complementado con suero a una concentración no superior 1×10^7 células por mililitro y no inferior a 1×10^3 células por mililitro. A continuación, se dispensa la suspensión celular de forma estéril en una bolsa o frasco de cultivo, que puede estar dotado o no de agitador pendular previamente cargado con la matriz ósea. La relación número de células por centímetro cúbico de matriz ósea se mantendrá dentro del intervalo de 1×10^2 a 1×10^8 células por centímetro cúbico. Una vez añadida la suspensión celular al frasco, bioreactor o bolsa de cultivo, se incuba durante 4 a 24 horas a unas condiciones de temperatura de 37°C , una saturación de CO_2 del 5% y humedad relativa del 95%.

El producto obtenido de la etapa de conjugación/inmovilización (b), compuesto por células mesenquimales inmovilizadas sobre matrices óseas, preferentemente de hueso desantigenizadas, más preferentemente desantigenizadas/desmineralizadas, se somete a un ciclo de lavados, preferentemente mediante una solución salina fisiológica, y se emplaza de forma estéril en bolsa de conservación.

El producto obtenido se extrae de la bolsa de conservación de forma estéril mezclado con un gel de fibrina con una relación de 1 unidad volumétrica de solución de fibrinógeno por una unidad volumétrica de solución de trombina y una unidad volumétrica de matriz ósea colonizada.

A continuación, la presente invención se ilustra mediante Ejemplos, que no constituyen una limitación de la misma

Ejemplo 1. Procedimiento utilizando una inmovilización dinámica

En el siguiente procedimiento se realizó para la obtención de un centímetro cúbico del producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración ósea, según la presente invención.

Se obtuvieron 6×10^6 células mesenquimales de médula ósea mediante expansión empleando medios libres de suero animal y se inocularon en un frasco de cultivo. Mediante el empleo de medio en base a DMEM suplementado con suero humano al 10% (v/v), se fijó la concentración celular a una densidad de 6×10^5 células por mililitro. Esta suspensión celular se añadió de forma estéril a un segundo frasco de material plástico dotado de agitador pendular, donde previamente se añadió 1 centímetro cúbico de matriz ósea desantigenizada.

Se emplazó el frasco en la incubadora a unas condiciones de temperatura de 37°C , saturación de CO_2 del 5%, y humedad relativa del 95% y se inició un ciclo de agitación de 24 horas de duración a una velocidad de 1 rpm. A lo largo del tiempo que dura esta etapa de inmovilización de las células mesenquimales sobre la matriz ósea, se tomaron muestras del sobrenadante para determinar el ritmo y rendimiento de la inmovilización de las células. Los rendimientos de inmovilización cuando finalizó esta etapa fueron superiores al 80% y la viabilidad de las células, determinada mediante tinción de núcleos o ensayos metabólicos indirectos, fue superior al 90%.

Transcurridas las 24 horas, tras la inmovilización de las células mesenquimales sobre la matriz ósea, se realizó un lavado del producto obtenido con el objetivo de eliminar restos celulares y del medio de cultivo. Esta operación se llevó a cabo mediante filtración empleando como agente de lavado una solución salina fisiológica. A continuación, se emplazó el producto obtenido en una bolsa estéril.

En el momento previo de la aplicación del producto al paciente, se realizó un amalgamado de las partículas óseas con un gel de fibrina. Para realizar esta operación, se empleó una relación volumétrica consistente en una unidad de

solución de fibrinógeno por una unidad volumétrica de solución de trombina y una unidad volumétrica de matriz ósea colonizada. A continuación, se dotó a dicho conjunto de la forma que le permitió adaptarse a la distribución espacial de la lesión y se emplazó en la misma.

5 Ejemplo 2. Procedimiento utilizando una inmovilización estática

10 Se obtuvieron 6×10^6 células mesenquimales de médula ósea mediante expansión empleando medios libres de suero animal y se inocularon en un frasco de cultivo. Mediante el empleo de medio en base a DMEM suplementado con suero humano al 10% (v/v), se fijó la concentración celular a una densidad de 6×10^5 células por mililitro. Esta suspensión celular se añadió de forma estéril a una bolsa de cultivo permeable a gas de material plástico, donde previamente se añadió 1 centímetro cúbico de matriz ósea desantigenizada.

15 Se emplazó el frasco en la incubadora a unas condiciones de temperatura de 37°C, saturación de CO₂ del 5%, y humedad relativa del 95% y se mantuvo sin movimiento durante 24 horas. A lo largo del tiempo que dura esta etapa de inmovilización de las células mesenquimales sobre la matriz ósea, se tomaron muestras del sobrenadante para determinar el ritmo y rendimiento de la inmovilización de las células. Los rendimientos de inmovilización cuando finalizó esta etapa fueron superiores al 80% y la viabilidad de las células, determinada mediante tinción de núcleos o ensayos metabólicos indirectos fue superior al 90%.

20 Transcurridas las 24 horas, tras la inmovilización de las células mesenquimales sobre la matriz ósea, se realizó un lavado del producto obtenido con el objetivo de eliminar restos celulares y del medio de cultivo. Esta operación se llevó a cabo mediante filtración empleando como agente de lavado una solución salina fisiológica. A continuación, se emplazó el producto obtenido en una bolsa estéril.

25 En el momento previo de la aplicación del producto al paciente, se realizó un amalgamado de las partículas óseas con un gel de fibrina. Para realizar esta operación, se empleó una relación volumétrica consistente en una unidad de solución de fibrinógeno por una unidad volumétrica de solución de trombina y una unidad volumétrica de matriz ósea colonizada. A continuación, se dotó a dicho conjunto de la forma que le permitió adaptarse a la distribución espacial de la lesión y se emplazó en la misma.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento in vitro para la preparación de un producto de ingeniería tisular para la regeneración de tejidos óseos que comprende las etapas de:
- a) selección y expansión de células mesenquimales obtenidas de médula ósea;
 - b) conjugación por inmovilización de las células mesenquimales obtenidas en (a) en matrices óseas en una proporción en el intervalo de 1×10^2 a 1×10^8 células por centímetros cúbicos en un medio DMEM suplementado con suero durante un tiempo en el intervalo de 4 a 24 horas;
 - 10 c) lavado del producto obtenido en b); y
 - d) acondicionado final mediante la combinación con gel de fibrina.
- 15 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la etapa de conjugación/inmovilización se realiza mediante un sistema dinámico o un sistema estático.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, en el que la matriz ósea es hueso desantigenizado.
4. Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, en el que la matriz ósea es hueso desantigenizado y desmineralizado.
- 20 5. Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, en el que el lavado se realiza con solución salina fisiológica.
6. Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, en el que el lavado se realiza en ciclos y el agente de lavado se elimina mediante filtración.
- 25 7. Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de conjugación/inmovilización (b) se realiza en unas condiciones de temperatura de 37°C, una saturación de CO₂ del 5% y humedad relativa del 95%.
- 30 8. Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, en el que la agitación cuando se utiliza el sistema dinámico en la etapa de conjugación/inmovilización (b) se realiza en un intervalo de 1 a 120 rpm.
9. Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, en el que el rendimiento de inmovilización de la etapa de conjugación/inmovilización (b) es superior al 80% y la viabilidad de las células, determinada mediante tinción de núcleos o ensayos metabólicos indirectos, es superior al 90%.