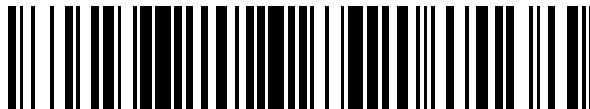


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 392**

21 Número de solicitud: 201830730

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

A61K 35/16 (2015.01)

A61K 47/30 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

19.07.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.11.2018

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
(31.0%)**

**Servicio de Promoción y Apoyo a la Investigación
y Transferencia Edificio Nexus (6G) -3ª planta,
Camí de Vera, s/n**

46022 Valencia ES;

FUNDACIÓN INCLIVA (29.0%);

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (22.0%) y

**CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA EN RED, M.P. (18.0%)**

72 Inventor/es:

GÓMEZ RIBELLES, José Luis;

GALLEGO FERRER, Gloria;

ANTOLINOS TURPÍN, Carmen;

SANCHO-TELLO VALLS, María y

CARDA BATALLA, Carmen

74 Agente/Representante:

CUETO PRIEDE, Sénida Remedios

54 Título: **MATERIAL INYECTABLE PARA LA REGENERACIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR**

57 Resumen:

Material inyectable para la regeneración del cartílago articular.

La invención se refiere a un material inyectable cuyo implante en el lugar de un defecto de cartílago se puede combinar con una técnica de estimulación del hueso subcondral, más particularmente, se refiere a un material inyectable de microesferas de plasma rico en plaquetas obtenidas a partir de una extracción de sangre del propio paciente y otras microesferas sintéticas, preferentemente, de un polímero biorreabsorbible, y su uso como soporte de la regeneración de cartílago.

ES 2 690 392 A1

DESCRIPCIÓN

**MATERIAL INYECTABLE PARA LA REGENERACIÓN DEL CARTÍLAGO
ARTICULAR**

CAMPO DE LA TÉCNICA

5 La presente invención se encuadra en el sector biomédico y farmacéutico, más concretamente, en el campo de la regeneración de tejidos, y se refiere a un material inyectable cuyo implante en el lugar de un defecto de cartílago se puede combinar con una técnica de estimulación del hueso subcondral.

10 **ESTADO DEL ARTE**

En la actualidad, las patologías del cartílago articular suponen una de las principales causas de discapacidad en personas mayores. En la regeneración del cartílago articular se emplean diversas técnicas de estimulación del hueso subcondral. Estas técnicas quirúrgicas se basan en dañar, por distintos procedimientos, el hueso por debajo del lugar del daño en el cartílago de forma que se produce un sangrado que abre la vía a la migración de células pluripotenciales, mesenquimales, con capacidad de producir nuevo tejido cartilaginoso. Sin embargo, con gran frecuencia el tejido formado no tiene la estructura ni propiedades del cartílago articular (cartílago hialino) sino que se parece más al fibrocartílago, más blando, que no es funcional y degenera con el tiempo. Una de las razones para que las células que llegan al lugar del defecto no sean capaces de generar el tejido correcto es que el entorno biomecánico que encuentran no es adecuado. Se han desarrollado distintos implantes que pretenden proteger las células y hacer que las cargas de compresión dinámica a la que la articulación se ve sometida se transfieran a las células de forma similar a como ocurre en el tejido sano.

El plasma rico en plaquetas (PRP) es un producto utilizado actualmente en terapias regenerativas. Se obtiene de una extracción de la sangre del propio paciente, que por centrifugación se separa en distintos componentes habitualmente utilizados en clínica. En la parte inferior del tubo de centrifuga se obtienen la fase rica en glóbulos rojos y sobre ella una capa que contiene el plasma sanguíneo donde queda la mayor parte de las plaquetas y que se ha llamado en la literatura científica y en la aplicación clínica plasma rico en plaquetas o PRP. Sobre ella quedan distintas capas de plasma sanguíneo con menor contenido en plaquetas y que se denomina "plasma pobre en plaquetas" o PPP. Tanto el PRP como el PPP coagulan en presencia de iones de calcio,

para formar un gel. Fortier *et al.* (*The Role of Growth Factors in Cartilage Repair, Clinical Orthopaedics and Related Research* 2011; 469(10): 2706-15) y Dold *et al.* (*Platelet-Rich Plasma in the Management of Articular Cartilage Pathology: A Systematic Review, Clinical Journal of Sport Medicine* 2014; 24(1): 31-43), analizan estudios publicados sobre la aplicación de PRP para el tratamiento de la patología del cartílago articular.

Algunos ejemplos de materiales biocompatibles se encuentran divulgados en el documento WO2013116791A1, que describe una composición que comprende un biomaterial sintético y biodegradable, y un extracto de sangre. El biomaterial puede ser un polímero y además comprende un hidrogel. El extracto de sangre puede ser plasma rico en plaquetas. Esta composición se utiliza en el tratamiento de heridas cutáneas, osteoartritis, daño del músculo cardíaco, defectos óseos, daños traumáticos y dentales. En el documento WO0200272A2 también se hace referencia a una composición polimérica en gel que, mezclada con sangre completa, promueve la regeneración de tejidos como el cartílago, menisco, ligamento o tendón entre otros.

En el documento de Saito *et al.* (*Intraarticular Administration of Platelet-Rich Plasma with Biodegradable Gelatin Hydrogel Microspheres Prevents Osteoarthritis Progression in the Rabbit Knee, Clinical and Experimental Rheumatology* 2009; 27(2): 201-7), se describen materiales biodegradables en hidrogel y la administración intra-articular de microesferas biodegradables de gelatina en forma de hidrogel que contienen plasma rico en plaquetas y su efecto en la progresión de osteoartritis en rodilla de conejo.

WO2006023803A2 divulga un implante formado por la combinación de micropartículas de un polímero como ácido poliláctico y un componente autólogo del paciente como plasma sanguíneo. Este implante puede servir para la reparación de cartílago articular mediante inyección. Por su parte, en el documento WO2011150328A1 se describe una matriz que promueve el crecimiento celular, formada por un polímero biodegradable junto con una solución fisiológica que puede ser plasma rico en plaquetas.

En la literatura científica se han publicado diversos procedimientos para producir la coagulación de proteínas en medio acuoso mediante reacciones químicas que incluyen la modificación de la proteína mediante el injerto en su cadena de grupos reactivos que contienen dobles enlaces carbono-carbono (C=C) que son susceptibles de reaccionar con monómeros que contienen dos de estos grupos C=C, reacciones iniciadas por

iniciadores fotosensibles activados por luz visible o luz ultravioleta. Estas reacciones conducen a la formación de redes poliméricas de la proteína, que son capaces de absorber grandes cantidades de agua pero son insolubles, es decir, forman hidrogeles (Almany y Seliktar, *Biosynthetic Hydrogel Scaffolds Made from Fibrinogen and Polyethylene Glycol for 3D Cell Cultures*, *Biomaterials* 2005; 26(15): 2467-77; Hu *et al.* *Gelatin Hydrogel Prepared by Photo-initiated Polymerization and Loaded with TGF- β 1 for Cartilage Tissue Engineering*, *Macromolecular Bioscience* 2009; 9(12): 1194-201; Oss-Ronen y Seliktar, *Polymer-conjugated Albumin and Fibrinogen Composite Hydrogels as Cell Scaffolds Designed for Affinity-based Drug Delivery*, *Acta Biomaterialia* 2011; 7(1): 163-70; Dikovskiy *et al.* *The effect of Structural Alterations of PEG-fibrinogen Hydrogel Hcaffolds on 3-D Cellular Morphology and Cellular Migration*, *Biomaterials* 2006; 27(8): 1496-506). En el documento Pradhan *et al.* (*A Three-Dimensional Spheroidal Cancer Model Based on PEG-fibrinogen Hydrogel Microspheres*, *Biomaterials* 2017; 115: 141-54), se ha demostrado que, bajo las condiciones de reacción adecuadas, a temperatura de 37°C, con contenidos de iniciador moderados y tiempos de reacción cortos, la reacción es compatible con la viabilidad celular y que por lo tanto permiten obtener hidrogeles cargados de células viables.

En los documentos Sakai *et al.* (*An Injectable, In Situ Enzymatically Gellable, Gelatin Derivative for Drug Delivery and Tissue Engineering*, *Biomaterials* 2009; 30(20): 3371-7), Kuriwawa *et al.* (*Injectable Biodegradable Hydrogels Composed of Hyaluronic Acid-Tyramine Conjugates for Drug Delivery and Tissue Engineering*, *Chemical Communications* 2005; 14(34): 4312-4), se describe otra vía de producir hidrogeles de proteínas o polisacáridos en presencia de células, manteniendo su viabilidad, es el entrecruzamiento enzimático. Poveda-Reyes *et al.* (*Reinforcing an Injectable Gelatin Hydrogel with PLLA Microfibers: Two Routes for Short Fiber Production*, *Macromolecular Materials and Engineering* 2015; 300(10): 977-88) modificaron gelatina introduciendo grupos tiramina, que se disolvió en medio acuoso suspendiendo en él fibroblastos de ratón de la línea L929. La formación del hidrogel se realizó añadiendo *horseradish* peroxidasa (peroxidasa de rábano) y peróxido de hidrógeno, demostrando la formación del gel y la viabilidad de las células tras la reacción.

La presente invención se refiere a un material inyectable que comprende una mezcla de microesferas sintéticas y microesferas de plasma sanguíneo rico en plaquetas para la regeneración del tejido cartilaginoso. La presencia de microesferas de plasma rico en

5 plaquetas y microesferas de un polímero sintético biodegradable, facilita la penetración de células madre procedentes de la microfractura del hueso subcondral, que pueden abrirse paso entre las microesferas soporte, algo que no ocurre cuando los componentes no están en forma de microesferas, sino como gel, ya que no puede ser penetrado por las células hasta que no lo degradan.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

10 En esta memoria la expresión “plasma rico en plaquetas o PRP”, se refiere a muestras de plasma sanguíneo con concentraciones de plaquetas del doble o más de los niveles basales que en promedio supone 5×10^5 o más plaquetas / μL (plaquetas por microlitro).

15 La expresión “plasma pobre en plaquetas o PPP”, se refiere a muestras de plasma sanguíneo con menor concentración de plaquetas que el plasma rico en plaquetas.

20 En la presente memoria, la expresión “microesferas soporte”, se refiere al material inyectable, es decir, a la mezcla de microesferas de plasma rico en plaquetas y microesferas sintéticas.

“implante”, “implante inyectable” y “material inyectable” pueden aparecer en la descripción de la invención con igual significado.

25 Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un material inyectable que comprende una mezcla de:

- microesferas de un polímero biodegradable – microesferas sintéticas -
- y microesferas de plasma rico en plaquetas – microesferas PRP-.

30 En una realización preferida, las microesferas sintéticas están compuestas de al menos un polímero biorreabsorbible: Por ejemplo, las microesferas sintéticas comprenden un polímero seleccionado entre ácido poliláctico, copolímeros de ácido poliláctico y poliglicólico, policaprolactona, polihidroxibutirato, polihidroxi valerato, copolímeros de los dos anteriores, polipéptidos, polianhídridos biodegradables, poliuretanos
35 biodegradables, quitosano, alginato, sulfato de condroitina, ácido hialurónico, almidón,

dextrano y, gelatina, colágeno, derivados biodegradables de la celulosa, fibrina, fibrinógeno y mezclas de microesferas de varios de los materiales anteriores.

Además de los polímeros mencionados en el párrafo anterior, se pueden usar otros polímeros sintéticos capaces de ser reabsorbidos por el organismo en periodos de tiempo inferiores a dos años, otros polisacáridos biorreabsorbibles, y otras proteínas.

En el material inyectable de la invención, las microesferas sintéticas se fabrican por emulsión o microfluídica utilizando procedimientos que han sido publicados en la literatura científica (De la Vega et al. (*Uniform polymer microspheres: monodispersity criteria, methods of formation and applications, Nanomedicine* 2013: Vol 8, pp 265-285); DL Elbert, *Liquid-liquid two-phase systems for the production of porous hydrogels and hydrogel microspheres for biomedical applications: A tutorial review, Acta Biomaterialia* 2011: Vol 7 pp31-56) y M Anindita, P Vilkas, (*Drug delivery: Techniques for polymeric microsphere preparation, Research Journal of Biotechnology* 2007: Vol 2 pp 58-63)) y se esterilizan por el método más adecuado a cada material, por ejemplo, irradiación con rayos gamma.

En una realización particular, la relación en volumen de microesferas sintéticas a microesferas de PRP está comprendida entre el 0,1 y el 80%, de forma más preferida está comprendida en un intervalo entre el 0,2 y el 70%.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar el material inyectable definido anteriormente, que comprende las siguientes etapas:

- obtener microesferas de PRP en un medio oleoso y
- mezclar dichas microesferas con microesferas sintéticas.

En una realización particular, la obtención de las microesferas de PRP comprende:

- a) centrifugar sangre extraída de un paciente,
- b) extraer una fracción de plasma rico en plaquetas, PRP, y separar y conservar la fracción de plasma pobre en plaquetas, PPP,
- c) formación de microesferas de PRP.

Además, el procedimiento para preparar el material inyectable, puede comprender:

- d) extraer las microesferas de PRP eliminando el medio oleoso mediante la adición de un medio salino y centrifugar para separar la fase acuosa que contiene las microesferas de PRP, de la oleosa,
- 5 e) lavar las microesferas de PRP sucesivamente en mezclas de etanol y medio salino estéril, con concentraciones crecientes de medio salino hasta acabar con la suspensión de las microesferas en el medio salino estéril, o alternativamente lavar una vez en acetona antes de realizar los lavados en mezclas de etanol y medio salino estéril.
- 10 f) mezclar las microesferas de PRP con las microesferas sintéticas antes de implantarlas.

Preferentemente, las microesferas de PRP obtenidas en la etapa c) presentan diámetros entre 30 y 400 micras, más preferentemente entre 50 y 200 micras.

- 15 En una realización preferida, el medio salino utilizado en la etapa d) es un tampón fosfato salino, PBS (una solución acuosa salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio, fosfato de potasio).

20 En la etapa c) las microesferas de PRP pueden ser formadas con activación de plaquetas.

En otra realización, en la etapa c), las microesferas de PRP pueden ser formadas sin activación de plaquetas.

- 25 En una realización particular, la formación de microesferas de PRP con activación de las plaquetas en la etapa c) comprende las siguientes etapas:

- añadir al PRP de la etapa b) una disolución acuosa de una sal de calcio, o una disolución acuosa de una mezcla de la sal de calcio y una enzima coagulante de fibrinógeno, capaz de inducir la activación de las plaquetas para que inicien la
- 30 coagulación del fibrinógeno contenido en el plasma y dejar gotear la mezcla obtenida en un medio oleoso,
- dejar la mezcla coagular bajo agitación, obteniendo una emulsión a una temperatura inferior o igual a 37°C, obteniendo las microesferas de PRP.

- 35 En una realización preferida, la sal utilizada es cloruro de calcio.

En otra realización preferida, la enzima utilizada es trombina.

5 En una realización particular, el medio oleoso se selecciona entre un aceite mineral y un aceite vegetal.

El aceite mineral puede ser un aceite parafínico, un aceite nafténico, un aceite aromático o un aceite de silicona.

10 El aceite vegetal puede ser aceite de oliva, de girasol, de soja o de maíz.

En una realización particular, la formación de microesferas de PRP sin activación de las plaquetas en la etapa c) comprende, además la obtención de un hidrogel a partir de un precursor de dicho hidrogel por vía química o enzimática.

15

Mediante la formación de microesferas de PRP evitando la activación de las plaquetas, se consigue que no se desprendan los factores de crecimiento que contienen, antes de implantarlas en el lugar de la regeneración, lo que podría hacer que se perdieran, en parte, durante el proceso. Para ello se mezcla el PRP con un precursor de un hidrogel y se forman las microesferas mediante una reacción vía química o enzimática del hidrogel que no altera la viabilidad de las plaquetas del PRP. De esta forma se tiene el PRP retenido en las microesferas conteniendo todos sus componentes.

20

El precursor del hidrogel puede ser ácido hialurónico, gelatina, fibrinógeno, sulfato de condroitina, dextrano o el PPP extraído en la etapa b).

25

En una realización particular, la formación del hidrogel por vía química comprende las siguientes etapas:

- modificar un precursor del hidrogel mediante la reacción con moléculas que contienen grupos acrilato o metacrilato, para obtener un precursor modificado (PRECmod),
- mezclar el PRECmod con el PRP, en relaciones PRP/disolución PRECmod entre 5/95 y 50/50 en volumen, añadir un monómero conteniendo grupos acrilato o metacrilato tales como el metacrilato de etilenglicol, acrilato de etilenglicol, metacrilato de hidroxietilo, acrilato de hidroxietilo, acrilamidas, metacrilamidas y con un fotoiniciador capaz de iniciar la reacción por vía radical,

30

35

- formar una emulsión del producto de la etapa anterior en un medio oleoso,
- exponer la emulsión a luz ultravioleta para producir la coagulación de las microgotas de plasma que constituyen el hidrogel.

5 La modificación del precursor del hidrogel mediante la reacción con moléculas que contienen grupos acrilato o metacrilato se realiza de acuerdo con procedimientos análogos a los descritos en las referencias citadas en el estado del arte (*Biomaterials* 2005; 26(15): 2467-77; *Macromolecular Bioscience* 2009; 9(12): 1194-201),
El medio oleoso en el que se forma la emulsión puede ser un aceite mineral (aceite
10 parafínico, un aceite nafténico, un aceite aromático o un aceite de silicona), o un aceite vegetal (aceite de oliva, girasol, soja o maíz).

El procedimiento según esta realización continúa con las etapas d), e) y f) anteriores.

15 En otra realización particular, la formación del hidrogel vía enzimática comprende las siguientes etapas:

- preparar una disolución de un precursor del hidrogel con tiramina,
- mezclar el PRP extraído en la etapa b) con la disolución anterior en relaciones PRP/disolución precursora del hidrogel entre 5/95 y 50/50 en volumen, y añadir
20 *horseradish* peroxidasa,
- emulsión en medio oleoso con peróxido de hidrógeno durante el tiempo necesario para la formación del hidrogel.

La preparación de la disolución de un precursor del hidrogel con tiramina, puede
25 realizarse siguiendo el método descrito en el documento Poveda-Reyes *et al.* (*Reinforcing an Injectable Gelatin Hydrogel with PLLA Microfibers: Two Routes for Short Fiber Production, Macromolecular Materials and Engineering* 2015; 300(10): 977-88);

Preferentemente, para esta realización, la disolución del precursor del hidrogel
30 comprende macromoléculas modificadas con tiramina que se seleccionan entre conjugados tiramina de: gelatina, de ácido hialurónico, de sulfato de condroitina, de dextano y mezcla de ellos.

El procedimiento según esta realización continúa con las etapas d), e) y f).

35

En el caso de la formación de microesferas de PRP sin activación de plaquetas, tanto vía química como enzimática, es necesario que inmediatamente antes de implantar las células en el lugar que el que se pretende la regeneración se activen las plaquetas mediante la adición de cloruro cálcico y/o trombina, lo que hace que el fibrinógeno del PRP coagule en forma de fibrina y las plaquetas desprendan sus factores de crecimiento.

Antes de realizar la mezcla de las microesferas PRP y las microesferas sintéticas, las microesferas PRP pueden ser criopreservadas. Previamente al mezclado de ambas microesferas (sintética y biodegradable), es necesario un proceso de descongelación de dichas microesferas PRP criopreservadas.

En una realización particular, el procedimiento comprende, además, las siguientes etapas después de obtener las microesferas de PRP en medio salino, después de la etapa e):

- eliminar el medio salino por decantación y aspiración,
- transferir las microesferas de PRP a una disolución de dimetilsulfóxido y el PPP obtenido en el paso b) y congelar la suspensión de microesferas obtenida, en nitrógeno líquido para criopreservar hasta su uso posterior,
- descongelar la suspensión de las microesferas,
- acondicionar mediante centrifugación y adición de PPP a las microesferas de PRP.

Las microesferas de PRP se transfieren a una disolución de dimetilsulfóxido y el PPP obtenido en el paso b) en la que éste último está presente en hasta un 10%, y se congela en nitrógeno líquido, dentro de criotubos. En una primera etapa se enfría la suspensión de las microesferas a una velocidad de hasta 2 °C/min para llegar a -80 °C y tras 24 horas de estabilización a esta temperatura, se introducen en un recipiente aislado térmicamente, Dewar, conteniendo el nitrógeno líquido.

La suspensión de las microesferas se descongela en baño de agua a 37°C durante aproximadamente 2 minutos,

El acondicionamiento se lleva a cabo mediante centrifugación a velocidades de rotación de entre 600 y 1000 rpm durante 5 minutos para recuperar las microesferas de PRP, añadiendo PPP a las microesferas de PRP y centrifugando nuevamente entre 600 y 1000 rpm durante 5 minutos. Finalmente se retirara todo el sobrenadante.

35

La suspensión de microesferas de PRP descongeladas se mezcla con las microesferas sintéticas en el medio salino, se deja decantar y se elimina el exceso de líquido.

5 Un último aspecto de la presente invención se refiere al uso del material inyectable para la regeneración de cartílago articular.

El material inyectable descrito en esta invención, presenta ventajas (Figura 7) en comparación con cada una de las otras terapias actualmente aplicadas en fases clínicas o en el mercado:

10 - Combina la estimulación del hueso subcondral para conducir las células madre al sitio del daño y el implante de un biomaterial de apoyo en forma de microesferas inyectables que suministran factores de crecimiento y crean el entorno biomecánico adecuado para que las células migrantes se diferencien y originen un cartílago articular funcional.

15 - No necesita la manipulación de células fuera del organismo como sí pasa tanto en el caso del implante de condrocitos autólogos como en el de células madre mesenquimales que implican procesos e instalaciones muy complejos, lo cual facilita la traslación a la aplicación clínica. Las técnicas de estimulación del hueso subcondral y la extracción y manipulación del PRP son bien conocidas en la clínica.

20 - Uso como soporte para la regeneración. Las microesferas descritas en esta memoria, una vez inyectadas dejan caminos de migración de las células madre desde el hueso subcondral. Esto supone una ventaja respecto al implante de un gel inyectable que rellene el defecto del cartílago donde se ha de producir la regeneración porque en tal caso la estructura del gel bloquea el paso de nuevas células provenientes del hueso subcondral. Las células en este caso deben inyectarse junto con los precursores de gel, lo que añade la complejidad descrita en el párrafo anterior.

25 - Uso como soporte para la regeneración. Las microesferas descritas en esta memoria, una vez inyectadas dejan caminos de migración de las células madre desde el hueso subcondral. Esto supone una ventaja respecto al implante de un gel inyectable que rellene el defecto del cartílago donde se ha de producir la regeneración porque en tal caso la estructura del gel bloquea el paso de nuevas células provenientes del hueso subcondral. Las células en este caso deben inyectarse junto con los precursores de gel, lo que añade la complejidad descrita en el párrafo anterior.

30 - Contra el uso de andamios macroporosos, llamados *scaffolds* en la literatura científica, como soporte para la regeneración hemos encontrado en el modelo animal que las microesferas se mueven fácilmente durante el crecimiento del tejido nuevo, lo que le permite organizarse de forma similar a la natural. En los

35

poros del andamio, el crecimiento está restringido por las paredes de los poros. El desplazamiento de las microesferas deja espacio libre para el tejido recién formado antes de que el material sintético se bioabsorba, de esta manera, se pueden usar materiales con tiempos de degradación largos.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 **Figura 1.** Muestras de microesferas sintéticas y de PRP y manejabilidad o mezclado de las mismas: a) microesferas de ácido poliláctico, PLA, b) mezcla de microesferas de quitosano con microesferas de PLA, c) microesferas de PRP y d) mezcla de microesferas de PRP con microesferas de PLA.

15 **Figura 2.** a) Micrografía FESEM (microscopía electrónica de barrido de emisión de campo) de las microesferas de PLA con barra de escala 50 μm . b) Micrografía realizada en microscopio óptico de las microesferas de quitosano liofilizadas e hidratadas (aumentos 20x). c) Micrografía realizada en microscopio óptico de las microesferas de PRP tras 12 días de criopreservación (aumentos 10x). d) Micrografía SEM (microscopía electrónica de barrido), con barra de escala 40 μm , de las membranas de PLA obtenidas por electrohilado.

20

Figura 3. Esquema de la cirugía con el implante o (material) de microesferas soporte inyectadas en un defecto de cartílago articular y microfractura del hueso subcondral y una membrana sintética cubre el defecto y queda adherida al coágulo tapando el defecto. Se muestra la migración de las células mesenquimales (MSC).

25

Figura 4. Membranas de PLA: a) membrana de PLA antes de esterilizar y troquelar y b) membranas de PLA esterilizadas, troqueladas y previas a su implantación.

30 **Figura 5.** Cóndilos femorales en un modelo de rodilla de conejo 3 meses después de la cirugía. a) PLA; b) PLA+PRP; c) control de cirugía; d) control nativo.

Figura 6. Cóndilos femorales de conejo 3 meses después de la cirugía en fresco y tras su procesamiento histológico y tinción con hematoxilina-eosina. Nuestra solución originó

un tejido funcional con todas las características del cartílago articular que sufría el defecto reparado.

Figura 7. Tabla resumen de las ventajas que ofrece el material inyectable de la invención y comparación con otras terapias regenerativas actualmente en uso clínico.

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, en un modelo de regeneración del cartílago articular en rodilla de conejo, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1

Se centrifugó sangre de conejo de raza *New Zealand* durante 8 minutos a 1800 rpm, separando las fases de PPP y PRP. En un vaso de precipitados se introdujeron 250 mL de aceite de oliva y se introdujo una varilla de cuatro paletas de un agitador mecánico. Se controló la temperatura a 37°C y se agitó a 360 rpm. Al PRP se le añadió 5 µL de una disolución acuosa de cloruro cálcico al 10% por cada 100 µL de PRP y la mezcla se hizo gotear sobre el aceite, manteniendo la agitación controlando el flujo de disolución de PRP mediante una bomba de jeringa a razón de 0,5 mL/min. Se mantuvo la agitación durante 5 horas tras acabar de añadir la disolución de PRP. Trascurrido este tiempo se interrumpió la agitación, se dejó posar las microesferas formadas y se aspiró el aceite. Se realizó un lavado con acetona 5 minutos bajo agitación seguidos de otros 5 minutos en reposo y aspirado de la acetona. Las microesferas obtenidas presentan diámetros entre 50 y 150 micras (Figura 2c).

Ejemplo 2

Para la formación de esferas de PRP sin activación de las plaquetas con hidrogeles de gelatina o ácido hialurónico por entrecruzamiento enzimático el procedimiento seguido fue el siguiente:

- se preparó una disolución del precursor del hidrogel consistente en una disolución al 4% de gelatina o ácido hialurónico modificados con tiramina o mezclas de ambos conteniendo el 50% en masa de cada uno de ellos en el buffer Krebs Ringer Buffer

(formado por 115 mM de cloruro sódico, 5 mM de cloruro de potasio, 1 mM de potasio dihidrógeno fosfato y 25 Mm HEPES (ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinaetanosulfónico);

- 5 - se mezcló el PRP con esta disolución en relación PRP/disolución del precursor del hidrogel 15/85 en volumen, añadiendo un 10% del volumen de una disolución de 12 U/mL de *horseradish* peroxidasa y un 10% del volumen de una disolución 20 mM de peróxido de hidrógeno;
- 10 - se formaron las microesferas en emulsión en medio consistente en aceite de oliva y se mantuvo la emulsión 10 minutos (la gelificación se produce en 5 minutos) para la formación de microesferas,
- posteriormente se extrajeron las microesferas eliminando el aceite con etapas sucesivas que incluyeron: añadir un tampón fosfato salino, PBS (una solución acuosa salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio, fosfato de potasio), centrifugar para separar la fase acuosa que contiene las microesferas de PRP del aceite, aspirar el aceite, se repitió la operación una vez más;
- 15 - inmediatamente antes de mezclar las microesferas de PRP con las microesferas sintéticas, se añadió cloruro cálcico o una mezcla de cloruro cálcico y trombina a la suspensión de microesferas de PRP para activar las plaquetas.

20 **Ejemplo 3**

En el procedimiento quirúrgico (Figura 3), el cirujano produce el sangrado en el lugar del defecto mediante microfractura, nanofractura o *drilling* del hueso subcondral. El material inyectable de la invención se inyecta y empapa en la sangre quedando embebido en el coágulo de sangre. A continuación, el defecto se cubre con una membrana sintética que queda adherida al coágulo tapando el defecto (Figuras 2d y 4). En una aplicación particular la membrana puede ser producida por electrohilado de los mismos polímeros empleados para producir las microesferas. Todo el procedimiento quirúrgico puede ser realizado por artroscopia.

30 El papel de las microesferas de PRP es liberar factores quimiotácticos y de crecimiento, que actúan de estímulo para la migración y diferenciación de células mesenquimales desde el hueso al lugar del defecto. El papel de las microesferas sintéticas, rígidas, es el de crear el entorno biomecánico adecuado.

En los ensayos realizados en un modelo animal de rodilla de conejo, se ha demostrado que, en el plazo de tres meses, las microesferas de PRP se han reabsorbido mientras que tanto la membrana como las microesferas sintéticas se han desplazado desde el lugar del implante hasta el hueso (donde acabarán de ser biorreabsorbidas), dejando
5 en el lugar donde se practicó el defecto de cartílago un tejido funcional con todas las características del cartílago articular (Figuras 5 y 6). Se ha comprobado la capacidad de regeneración del cartílago articular con el implante de microesferas unido a la microfractura del hueso subcondral en un modelo de rodilla de conejo en el que se han
10 inyectado microesferas de PLA y PRP en una relación 1/1 en volumen y se cubrió el defecto con una membrana de PLA como la mostrada en la Figura 4.

REIVINDICACIONES

1. Un material inyectable que comprende una mezcla de:

- 5
- microesferas de un polímero biodegradable – microesferas sintéticas -
 - microesferas de plasma rico en plaquetas – microesferas PRP -.

2. Un material inyectable según la reivindicación 1, en el que las microesferas sintéticas comprenden un polímero seleccionado entre ácido poliláctico, copolímeros de ácido poliláctico y poliglicólico, policaprolactona, polihidroxibutirato, polihidroxi valerato, copolímeros de los dos anteriores, polipéptidos, polianhídridos biodegradables, poliuretanos biodegradables, y, quitosano, alginato, sulfato de condroitina, ácido hialurónico, almidón, dextrano y, gelatina, colágeno, derivados biodegradables de la celulosa, fibrina, fibrinógeno y mezclas de microesferas de varios de los materiales anteriores.

10

15

3. Un material inyectable según la reivindicación 1, en el que la relación en volumen de microesferas sintéticas a microesferas de PRP está comprendida entre el 0,1 y el 80%, más preferentemente entre el 0,2 y el 70%.

20

4. Un procedimiento para preparar el material inyectable definido en una de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende:

- obtener microesferas PRP en un medio oleoso y
- mezclar dichas microesferas con microesferas sintéticas.

5. Un procedimiento para preparar el material inyectable según la reivindicación 4, en el que la etapa de obtención de las microesferas PRP comprende:

- 25
- a) centrifugar sangre extraída de un paciente,
 - b) extraer una fracción de plasma rico en plaquetas, PRP, y separar y conservar la
 - 30 fracción de plasma pobre en plaquetas, PPP,
 - c) formación de microesferas de PRP.

6. Un procedimiento para preparar el material inyectable según la reivindicación 5, que comprende, además:

- d) extraer las microesferas de PRP eliminando el medio oleoso mediante la adición de un medio salino y centrifugar para separar la fase acuosa que contiene las microesferas de PRP, de la oleosa,
- 5 e) lavar las microesferas de PRP sucesivamente en mezclas de etanol y medio salino estéril, con concentraciones crecientes de medio salino hasta acabar con la suspensión de las microesferas en el medio salino estéril, o alternativamente lavar una vez en acetona antes de realizar los lavados en mezclas de etanol y medio salino estéril.
- 10 f) mezclar las microesferas de PRP con las microesferas sintéticas antes de implantarlas.
7. Un procedimiento para preparar el material inyectable según la reivindicación 5, en el que las microesferas de PRP obtenidas en la etapa c) presentan diámetros entre 30 y 400 micras, más preferentemente entre 50 y 200 micras.
- 15 8. Un procedimiento para preparar el material inyectable según la reivindicación 6, en el que el medio salino utilizado en la etapa d) es un tampón fosfato salino, PBS.
9. Un procedimiento para preparar el material inyectable según la reivindicación 5, en el que en la etapa c) se forman microesferas de PRP con activación de plaquetas.
- 20 10. Un procedimiento para preparar el material inyectable según la reivindicación 5, en el que en la etapa c) se forman microesferas de PRP sin activación de plaquetas.
- 25 11. Un procedimiento para preparar el material inyectable según la reivindicación 9, en el que la etapa c) comprende las siguientes etapas:
- 30 - añadir al PRP de la etapa b) una disolución acuosa de una sal de calcio, o una disolución acuosa de una mezcla de la sal de calcio y una enzima coagulante de fibrinógeno, capaz de inducir la activación de las plaquetas para que inicien la coagulación del fibrinógeno contenido en el plasma y dejar gotear la mezcla obtenida en un medio oleoso,
- dejar la mezcla coagular bajo agitación, obteniendo una emulsión a una temperatura inferior o igual a 37°C, obteniendo las microesferas de PRP.

12. Un procedimiento para preparar el material inyectable según la reivindicación 11, en el que la sal utilizada es cloruro de calcio.
- 5 13. Un procedimiento para preparar el material inyectable según la reivindicación 11, en el que la enzima utilizada es trombina.
14. Un procedimiento para preparar el material inyectable según la reivindicación 11, en el que el medio oleoso se selecciona entre un aceite mineral o un aceite vegetal.
- 10 15. Un procedimiento para preparar el material inyectable según la reivindicación 14, en el que el aceite mineral se selecciona entre un aceite parafínico, nafténico, un aceite aromático y aceite de silicona.
- 15 16. Un procedimiento para preparar el material inyectable según la reivindicación 14, en el que el aceite vegetal se selecciona entre un aceite de oliva, girasol, soja, maíz.
17. Un procedimiento para preparar el material inyectable según la reivindicación 10, que comprende, además, obtener un hidrogel a partir de un precursor de dicho hidrogel por vía química o enzimática.
- 20 18. Un procedimiento para preparar el material inyectable según la reivindicación 17, en el que el precursor del hidrogel se selecciona entre ácido hialurónico, gelatina, fibrinógeno, sulfato de condroitina, dextrano y el PPP extraído en la etapa b).
- 25 19. Un procedimiento para preparar el material inyectable según la reivindicación 17, en el que la formación del hidrogel por vía química comprende las siguientes etapas:
- modificar un precursor del hidrogel mediante una reacción con moléculas que contienen grupos acrilato o metacrilato, para obtener un precursor modificado (PRECmod),
 - 30 - mezclar el PRECmod con el PRP, en relaciones PRP/disolución PRECmod entre 5/95 y 50/50 en volumen, añadir un monómero conteniendo grupos acrilato o metacrilato tales como el metacrilato de etilenglicol, acrilato de etilenglicol, metacrilato de hidroxietilo, acrilato de hidroxietilo, acrilamidas, metacrilamidas y con un fotoiniciador capaz de iniciar la reacción por vía radical,
 - 35 - formar una emulsión del producto de la etapa anterior en un medio oleoso,

- exponer la emulsión a luz ultravioleta para producir la coagulación de las microgotas de plasma que constituyen el hidrogel.

5 20. Un procedimiento para preparar el material inyectable según la reivindicación 17, en el que la formación del hidrogel por vía enzimática comprende las siguientes etapas:

- preparar una disolución de un precursor del hidrogel con tiramina,
- mezclar el PRP extraído en la etapa b) con la disolución anterior en relaciones PRP/disolución precursora del hidrogel entre 5/95 y 50/50 en volumen, y añadir *horseradish* peroxidasa,

10 - emulsión en medio oleoso con peróxido de hidrógeno durante el tiempo necesario para la formación del hidrogel.

15 21. Un procedimiento para preparar el material inyectable según la reivindicación 20, en el que la disolución del precursor del hidrogel comprende macromoléculas modificadas con tiramina que se seleccionan entre conjugados tiramina de: gelatina, de ácido hialurónico, de sulfato de condroitina, de dextano y mezcla de ellos.

20 22. Un procedimiento para preparar el material inyectable según la reivindicación 6, que comprende, además, las siguientes etapas después de obtener las microesferas de PRP en medio salino, después de la etapa e):

- eliminar el medio salino por decantación y aspiración,
- transferir las microesferas de PRP a una disolución de dimetilsulfóxido y el PPP obtenido en el paso b), y congelar la suspensión de microesferas obtenida, en nitrógeno líquido para criopreservar hasta su uso posterior,
- 25 - descongelar la suspensión de las microesferas,
- acondicionar mediante centrifugación y adición de PPP a las microesferas de PRP.

30 23. Uso del material inyectable definido en una de las reivindicaciones 1 a 3, para la regeneración de cartílago articular.

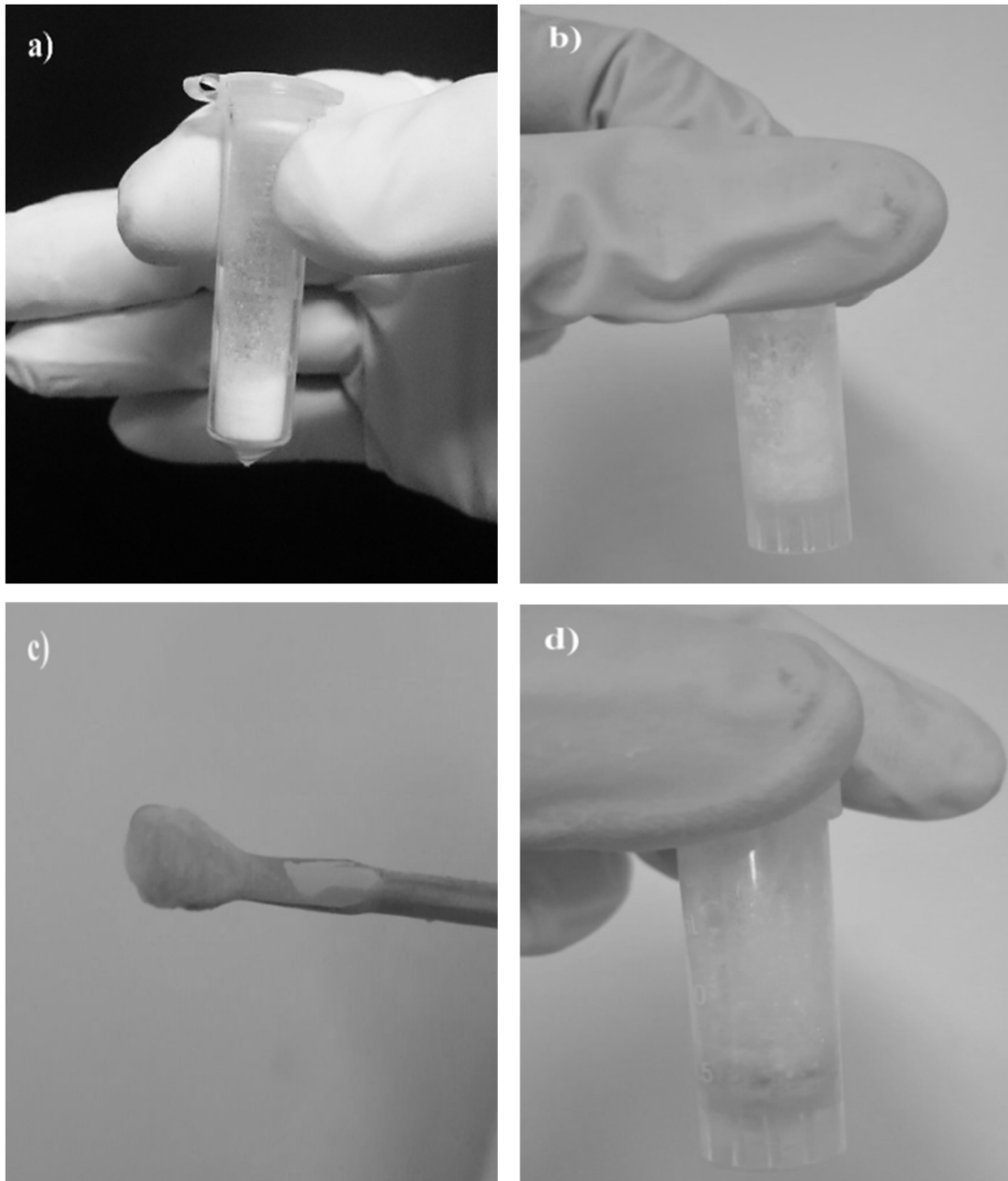


Figura 1

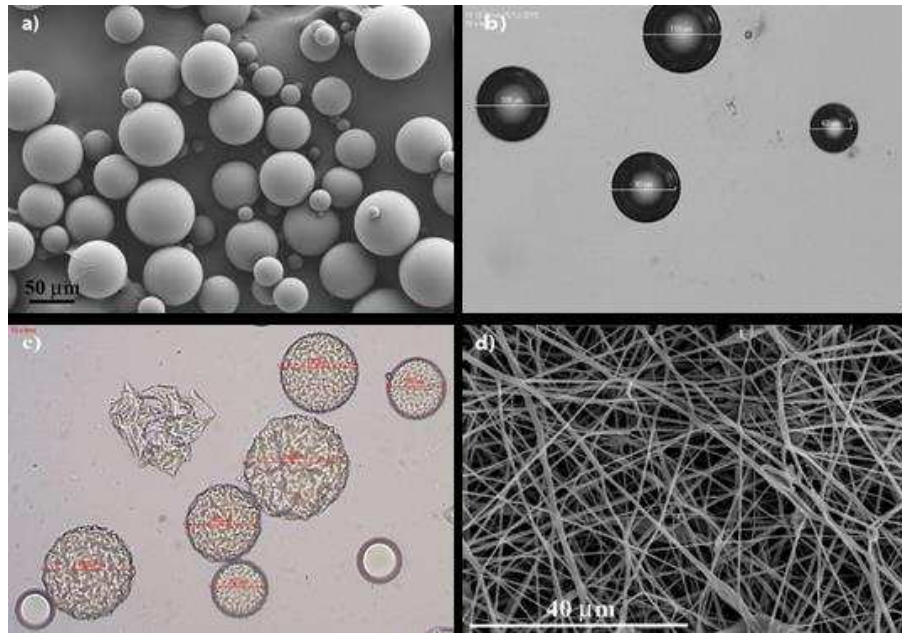


Figura 2

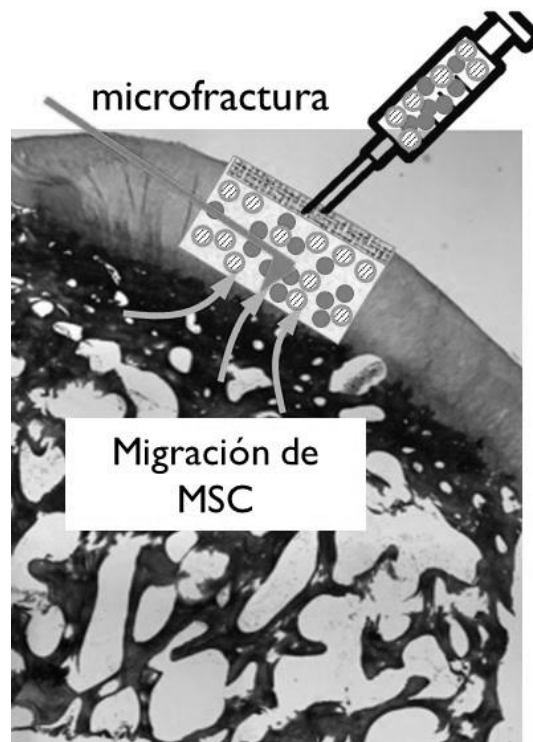


Figura 3

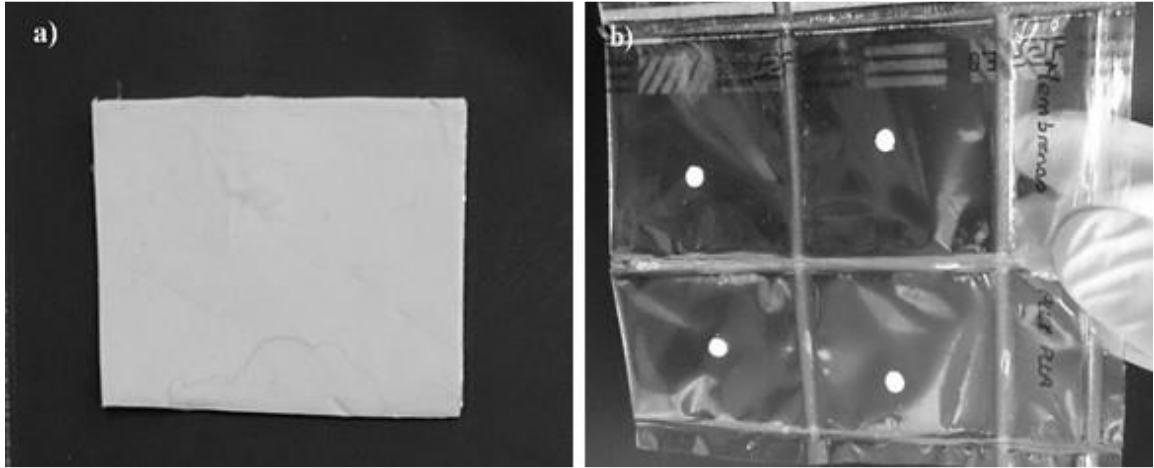


Figura 4

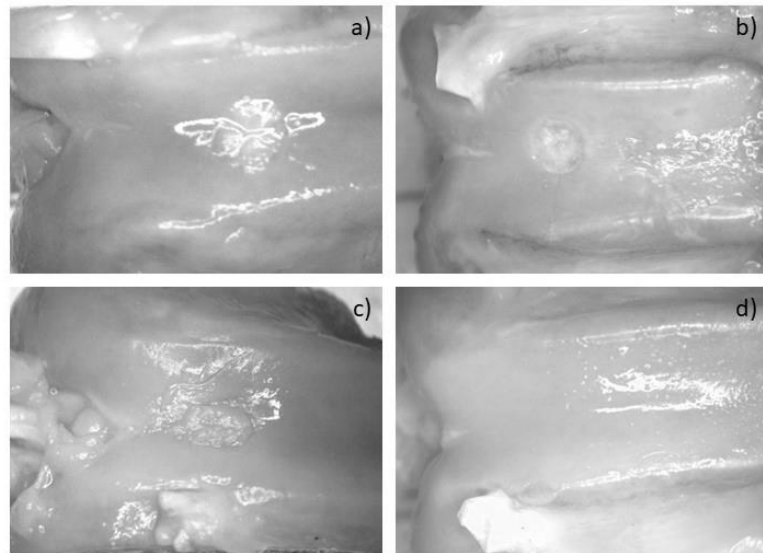
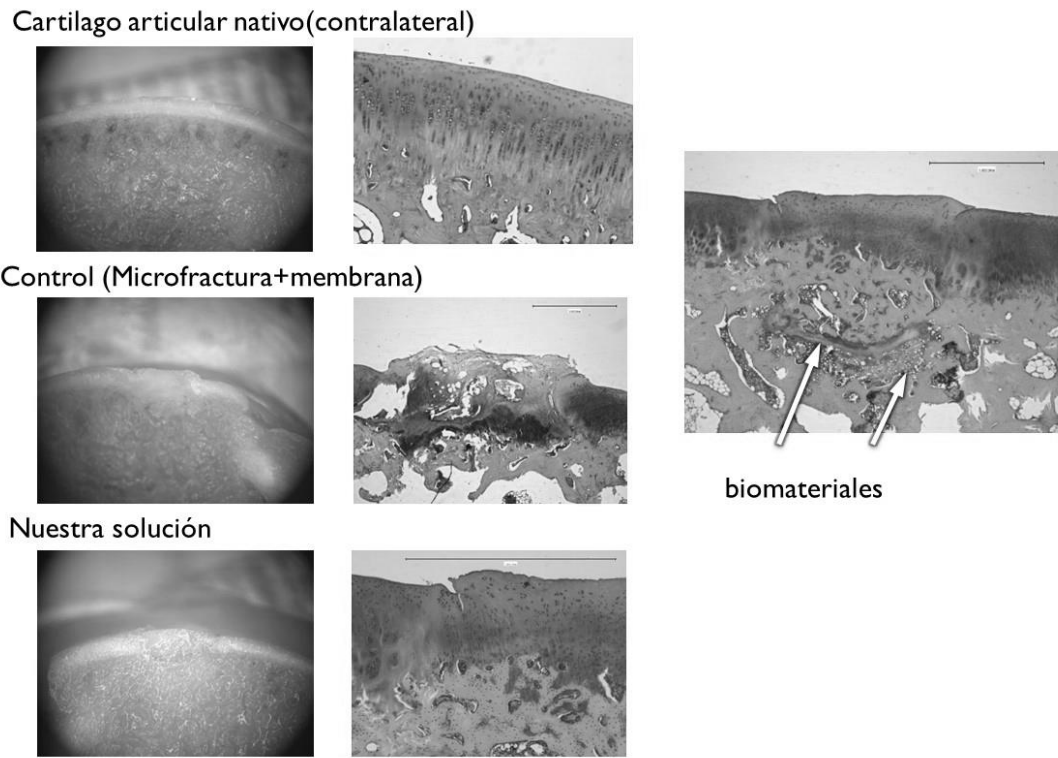


Figura 5



7

Figura 6

	Estimulación del hueso subcondral + membrana	Implante de condrocitos autólogos	Geles inyectables	La solución propuesta por la presente invención
Necesita manipulación de células fuera del organismo	NO	SI	NO	NO
Inyectable	NO	SI	NO	SI
Entorno biomecánico adecuado	NO	SI	NO	SI
Invasión de células en el lugar de la regeneración	SI	NO	NO	SI
Liberación de factores de crecimiento	NO	NO	NO	SI

Figura 7



- ②① N.º solicitud: 201830730
②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.07.2018
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SAITO M et al. Intraarticular administration of platelet-rich plasma with biodegradable gelatin hydrogel microspheres prevents osteoarthritis progression in the rabbit knee. Clinical and experimental rheumatology Italy. , 28/02/2009, Vol. 27, N° 2, Páginas 201 - 207, ISSN 0392-856X (Print), <DOI: pubmed: 19473558>. todo el documento	1-23
A	SANCHO-TELLO M et al. Poly (L-lactic acid) microspheres induce $\frac{1}{2}$ in vivo $\frac{1}{2}$ articular cartilage regeneration in rabbits. Artificial Organs 20170901 Blackwell Publishing Inc. nld. , 01/09/2017, Vol. 41, N° 9, Páginas A79, ISSN 1525-1594 (print). Todo el documento.	1-23
A	WO 2006023803 A2 (ARTES MEDICAL USA INC et al.) 02/03/2006, Todo el documento, en especial reivindicaciones 27, 50, 52 y 56.	1-23
A	MEHEUX CARLOS J et al. Efficacy of Intra-articular Platelet-Rich Plasma Injections in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review. Arthroscopy MAR 2016. , 29/02/2016, Vol. 32, N° 3, Páginas 495-505, ISSN 0749-8063(print) ISSN 1526-3231(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.arthro.2015.08.005>. Todo el documento, en especial página 503, tabla 4.	1-23
A	WO 2013116791 A1 (MOSAIC BIOSCIENCES INC) 08/08/2013, <p>Todo el documento en especial párrafos [0241-0245], reivindicación 33.</p>	1-23
A	WO 2011150328 A1 (UNIV PITTSBURGH et al.) 01/12/2011, <p>Todo el documento en especial reivindicaciones 3, 10-12.</p>	1-23
A	WO 0200272 A2 (BIOSYNTECH CANADA INC et al.) 03/01/2002, <p>Todo el documento.</p>	1-23
A	EP 2591812 A1 (UNIV TWENTE INST FOR BIOMEDICAL TECHNOLOGY AND TECHNICAL MEDICINE MIRA) 15/05/2013, Todo el documento.	1-23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
05.11.2018

Examinador
E. Albarrán Gómez

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61L27/36 (2006.01)

A61L27/58 (2006.01)

A61K35/16 (2015.01)

A61K47/30 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61L, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, NPL