

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 528**

51 Int. Cl.:

A61L 27/24	(2006.01)
A61L 27/20	(2006.01)
A61F 2/30	(2006.01)
A61L 27/26	(2006.01)
A61K 38/39	(2006.01)
A61M 5/31	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2012 PCT/KR2012/004524**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13172504**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2012 E 12877065 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2851096**

54 Título: **Composición para reparar tejido de cartílago, procedimiento para producirlo y uso del mismo**

30 Prioridad:

16.05.2012 KR 20120052141

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

06.05.2019

73 Titular/es:

**SEWON CELLONTECH CO., LTD (100.0%)
Yeouido-dong Hanguk HP Building 83 Uisadang-
daero Yeongdeungpo-gu
Seoul 150-724, KR**

72 Inventor/es:

**YEO, SE KEN;
CHANG, CHEONG HO;
YOO, JI CHUL;
SUH, DONG SAM;
LEE, JUN KEUN y
WOO, SANG HUN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 711 528 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición para reparar tejido de cartílago, procedimiento para producirlo y uso del mismo.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición para la reparación de tejido de cartílago, un procedimiento para preparar la misma y un procedimiento para usar la misma, y más particularmente, una composición basada en colágeno se prepara como biomaterial en una forma inyectable que se puede trasplantar a regiones con defecto del cartílago, y por lo tanto, la composición se introduce directamente en los sitios de aplicación a través de una aguja de jeringa sin una incisión quirúrgica para promover la reparación del tejido, lo que induce una regeneración efectiva de tejido de cartílago y, por lo tanto, induce una reparación y regeneración del cartílago relativamente fácil y rápida al tiempo que reduce el estrés relacionado con la cirugía en animales no humanos, de modo que la calidad y confiabilidad de un producto se puede mejorar significativamente, satisfaciendo así distintos deseos (necesidades) de los consumidores como usuarios del mismo y dando así una buena impresión a los pacientes.

Técnica Anterior

20 Como es bien conocido, el daño en el cartílago se produce por un traumatismo como una caída, un golpe directo o una fuerza de giro, o una enfermedad como la artritis, la osteonecrosis, la artritis inflamatoria o la osteocondritis disecante. El cartílago articular es el tejido que no tiene distribución neurovascular, tiene una capacidad notablemente baja de autocuración en comparación con los otros tejidos y presenta diferentes efectos debido a las distintas operaciones quirúrgicas, según el tamaño y la ubicación de la lesión.

25 El cartílago articular es un material suave, extremadamente deslizante y blanco brillante, y se mantiene minimizando la fricción y la resistencia al desgaste en el momento del movimiento de la articulación. Se sabe que, una vez dañado, el cartílago articular no se regenera. El daño del cartílago como tejido del organismo está acompañado por un dolor intenso, que causa dificultades en la vida diaria y, si es crónico, el cartílago dañado avanza a artritis degenerativa. Por lo tanto, el tratamiento para regenerar los tejidos dañados del cartílago debe llevarse a cabo en el momento en que se daña el cartílago, para evitar la progresión a artritis degenerativa.

35 Para el tratamiento de la región con el defecto del cartílago dañado, se realiza inyección de medicamentos, fisioterapia, inyección intraarticular de esteroides o ácido hialurónico, o medidas similares, como procedimiento de tratamiento no quirúrgico, que solo alivia los síntomas y el dolor, pero no tiene efecto sobre el tratamiento de la enfermedad. Como alternativa, se realiza estimulación de la médula ósea y trasplante osteocondral lateral como procedimiento de tratamiento quirúrgico. Después de realizar la estimulación ósea primaria en un sitio donde el cartílago está dañado de forma que se ha reblandecido o el hueso queda expuesto, el cartílago dañado se repara, aliviando así el dolor y evitando que la sangre que fluye del hueso al líquido sinovial descomponga el líquido sinovial y degrade la capacidad del líquido sinovial. Sin embargo, la estimulación ósea no es suficientemente efectiva y el ácido hialurónico reduce temporalmente el dolor, pero no induce la formación de nuevos tejidos de cartílago apropiados. Además, el trasplante osteocondral requiere cirugía, es más complejo y difícilmente habida cuenta del costo. Recientemente, para tratar el cartílago articular dañado, se ha llevado a cabo el implante autólogo de condrocitos de tal manera que el tejido de cartílago de un paciente se extrae para aislar y cultivar células de cartílago del mismo, que luego se trasplantan nuevamente. Este procedimiento lleva mucho tiempo para realizar dos veces la operación y la extracción de tejidos, y por lo tanto no es fácilmente accesible por la carga del costo para los pacientes y los profesionales de la salud.

50 Por lo tanto, se requiere un procedimiento novedoso para trasplantar un biomaterial, que es una composición mixta basada en colágeno, como procedimiento simple para la región del defecto del cartílago. Este procedimiento es útil para tratar la región del defecto del cartílago precozmente y puede disminuir el número de pacientes que requieren cirugías graves, como el trasplante de condrocitos y la cirugía de articulación artificial, posteriormente.

55 Recientemente, hay varios intentos de aplicar biomateriales a la región del defecto del cartílago.

60 La estructura del cuerpo humano consiste en células y polímeros generados biológicamente. Las proteínas que se encuentran en el cuerpo humano son materiales representativos. Si se utilizan como materiales naturales, se pueden aplicar en una forma similar a un estado natural, y se puede esperar la regeneración de los tejidos humanos. Los tejidos naturales se pueden usar como tejidos biológicos médicos, que pueden proporcionar funciones biológicas que los materiales artificiales no pueden, de modo que los tejidos naturales se introducen en el cuerpo humano para proporcionar un entorno biocompatible entre los tejidos circundantes, y funcionar como tejidos biológicos como los tejidos naturales.

En particular, el colágeno es un componente de las proteínas estructurales y representa 1/3 de la proteína total de un mamífero, formando tejidos blandos, como dermis, tendón/ligamento, vasos sanguíneos y cartílago, y tejidos duros del cuerpo humano.

5 El colágeno se usa actualmente para distintos usos médicos, como estético, apósito para heridas y para mejorar las arrugas. Los productos de colágeno que se han usado en medicina durante mucho tiempo se han usado sin problemas de seguridad hasta ahora.

10 El colágeno tiene ventajas, como baja antigenicidad, alta biocompatibilidad y bioabsorbabilidad, adhesión a las células, proliferación celular, inducción de diferenciación celular, coagulación sanguínea, efecto estético y biocompatibilidad con otros polímeros.

15 Además, como material a base de colágeno, una composición en la que se mezclan colágeno, ácido hialurónico y un pegamento de fibrina puede mostrar efectos notables en la reparación y regeneración del cartílago.

20 El ácido hialurónico como biomaterial es un material polisacárido de alta viscosidad que es un tipo de biopolímero, y se ha encontrado en la cresta del pollo, el líquido sinovial, la piel y similares. El ácido hialurónico se utiliza actualmente como adyuvante para la cirugía oftalmológica y como agente de tratamiento de la artritis deformante debido a su alto poder lubricante.

25 Un producto con una concentración de ácido hialurónico de 10 mg/ml actualmente disponible en el mercado es un agente para mejorar la función de las articulaciones que elimina el dolor causado por la gonartrosis y la enfermedad del hombro congelado, y reduce temporalmente el dolor pero causa problemas en el caso de inflamación grave.

30 Para resolver los problemas citados, se han presentado y registrado algunas técnicas anteriores. Es decir, la técnica anterior 1 se ha registrado con el registro de patente coreana n.º 1114773 (2002/12/02, solicitud de patente n.º 2009-0101388, "Procedimiento para preparar composición para el reparador de cartílago articular").

35 Además, se ha publicado la técnica anterior 2 con la publicación de patente coreana n.º 2004-0008125 (2001/04/28, solicitud de patente n.º 2003-7010108, "Composiciones y procedimientos para tratamiento y reparación de defectos o lesiones del cartílago articular utilizando tejido o células derivados del líquido sinovial").

40 Además, el estado de la técnica 3 se ha registrado con en el registro de patente coreana n.º 684932 (2002/07/13, solicitud de patente n.º 2005-0030837, "Procedimiento para regeneración de cartílago usando células madre mesenquimales y estimulación con ultrasonido")

45 El documento WO 02/36147A1 divulga un procedimiento para preparar una matriz para favorecer la reparación de tejido que comprende las etapas de oxidar un polisacárido exógeno para formar un polisacárido exógeno modificado que tiene grupos aldehído, y hacer reaccionar dicho polisacárido exógeno modificado con colágeno mineralizado en condiciones en las que dichos grupos aldehído reaccionan covalentemente entrecruzándose con colágeno mineralizado para formar dicha matriz.

50 Sin embargo, las técnicas mencionadas más arriba de la técnica anterior tienen los siguientes defectos.

55 Es decir, la técnica anterior tiene el grave problema de que no puede proporcionar una composición mixta con colágeno biocompatible para la regeneración de cartílago nuevo.

60 Además, la técnica anterior causa inconvenientes ya que una composición mixta no se aplica en una forma inyectable, por lo que tiene el grave problema de que los sitios de tejido de cartílago dañado no pueden ser estabilizados de forma conveniente y efectiva y, por lo tanto, no puede promover la inducción de la regeneración del cartílago.

65 Descripción detallada de la invención

Problema técnico

La presente invención se ha realizado para resolver los problemas mencionados anteriormente de la técnica anterior, y la presente invención proporciona una composición para la reparación de tejido de cartílago, un procedimiento para preparar la misma y un procedimiento para usar la misma. Por consiguiente, un primer aspecto de la presente invención es proporcionar una composición para la reparación de tejido de cartílago, preparándose la composición mezclando colágeno que tiene una concentración diluida de 5-60 mg/ml de agua o de una solución fisiológica de tampón fosfato; y ácido hialurónico que tiene una concentración diluida de 5-20 mg/ml de agua o de una solución fisiológica de tampón fosfato utilizando una jeringa de dos vías o un mezclador. A través de la característica técnica descrita anteriormente, un segundo aspecto de la presente invención es que, cuando se prepara una composición basada en colágeno como biomaterial en una forma inyectable que se

puede trasplantar a regiones con defectos del cartílago para promover la reparación del tejido, se puede inducir de forma efectiva la regeneración de tejido de cartílago, induciendo así una reparación y regeneración del cartílago relativamente fácil y rápida a la vez que se reduce el estrés relacionado con la cirugía en animales no humanos. Además, un tercer aspecto de la presente invención es desarrollar una composición mixta con colágeno biocompatible para la regeneración de cartílago nuevo. En particular, un cuarto aspecto de la presente invención es que la composición mixta se aplica en una forma inyectable, estabilizando así de forma conveniente y efectiva los sitios de tejido de cartílago dañado sin cirugía. Además, un quinto aspecto de la presente invención es que se puede reducir el dolor debido al defecto del cartílago. Además, un sexto aspecto de la presente invención es que se puede promover la inducción de la regeneración del cartílago. Además, un séptimo objeto de la presente invención es que se puede mejorar significativamente la calidad y la fiabilidad del producto, satisfaciendo así distintos deseos (necesidades) de los consumidores como usuarios del mismo y dando así una buena impresión a los pacientes.

Solución técnica

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición para la reparación de tejido de cartílago, preparándose la composición mezclando colágeno que tiene una concentración diluida de 5-60 mg/ml de agua o de una solución fisiológica de tampón fosfato; y ácido hialurónico que tiene una concentración diluida de 5-20 mg/ml de agua o de una solución fisiológica de tampón fosfato utilizando una jeringa de dos vías o un mezclador.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para preparar una composición para la reparación de tejido de cartílago, el procedimiento incluye: preparar colágeno que tiene una concentración diluida de 5-60 mg/ml de agua o de una solución fisiológica de tampón fosfato; preparar ácido hialurónico que tiene una concentración diluida de 5-20 mg/ml de agua o de una solución fisiológica de tampón fosfato; mezclar el colágeno y el ácido hialurónico usando una jeringa de dos vías o un mezclador; y desgasificar la composición mixta para la reparación de tejido de cartílago usando una centrífuga.

La composición reivindicada es adecuada para ser utilizada en un procedimiento para la reparación de tejido de cartílago, el procedimiento incluye: fijar una pata de cerdo en un soporte, dañar el cartílago articular usando una herramienta quirúrgica y luego inducir regiones con defectos de 2~4cm² usando un taladro; conectar una aguja de jeringa a un cuerpo de jeringa lleno de colágeno; y suturar el sitio de corte con un hilo de sutura, e inyectar directamente en la cavidad glenoidea (un espacio lleno de líquido sinovial) de la rodilla de cerdo colágeno con una concentración de 5 ~ 60 mg/ml contenido en la jeringa, ácido hialurónico con una concentración de 5 ~ 20 mg/ml contenido en la jeringa, y una composición para la reparación de tejido de cartílago en la que se mezclan el colágeno y el ácido hialurónico.

Efectos ventajosos

Como se expuso anteriormente, la presente invención proporciona una composición para la reparación de tejido de cartílago, preparándose la composición mezclando colágeno que tiene una concentración diluida de 5-60 mg/ml de agua o de una solución fisiológica de tampón fosfato; y ácido hialurónico que tiene una concentración diluida de 5-20 mg/ml de agua o de una solución fisiológica de tampón fosfato utilizando una jeringa de dos vías o un mezclador.

A través de la característica técnica descrita anteriormente, de acuerdo con la presente invención, cuando una composición basada en colágeno como biomaterial se prepara en una forma inyectable que se puede trasplantar a regiones con defectos del cartílago, se puede inducir la regeneración de tejido de cartílago de manera efectiva, induciendo así la reparación y regeneración del cartílago de forma relativamente fácil y rápida a la vez que reduce el estrés relacionado con la cirugía en animales no humanos.

Además, de acuerdo con la presente invención, se puede proporcionar una composición mixta con colágeno biocompatible para la regeneración de cartílago nuevo.

En particular, de acuerdo con la presente invención, la composición mixta se aplica en una forma inyectable, estabilizando así de forma conveniente y efectiva los sitios de tejido de cartílago dañado.

Además, de acuerdo con la presente invención, se puede reducir el dolor debido al defecto del cartílago.

Además, de acuerdo con la presente invención, se puede promover la inducción de la regeneración del cartílago.

De acuerdo con la presente invención, la calidad y la fiabilidad del producto se pueden mejorar significativamente debido a los efectos anteriores, satisfaciendo así distintos deseos (necesidades) de los consumidores como usuarios del mismo y dando así una buena impresión a los pacientes. Por lo tanto, la presente invención es muy útil.

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 es una imagen que ilustra la mezcla de una composición para la reparación de tejido de cartílago.

5 La fig. 2 es una imagen que ilustra el mezclado utilizando una jeringa de dos vías de una composición para la reparación de tejido de cartílago.

La fig. 3 es una imagen que ilustra un material de reparación de cartílago preparado en un tipo inyectable.

10 La fig. 4 es una imagen que ilustra un material de reparación de cartílago con tinción azul para verificar los efectos posteriores a la inyección.

La fig. 5 es una imagen que ilustra los defectos del cartílago inducidos para verificar el efecto de un material de reparación de cartílago inyectable.

15 La fig. 6 es una imagen que ilustra la conexión de una aguja de jeringa para la inyección directa en el organismo.

La fig. 7 es una imagen que ilustra la inyección directa en una región de defecto de cartílago de una rodilla de cerdo.

20 La fig. 8 es una imagen que ilustra la región de defecto del cartílago llena de un material de reparación del cartílago como resultado de la verificación de los efectos posteriores a la inyección.

La fig. 9 es una imagen que ilustra la composición de relleno que se conserva sin que la arrastre el agua.

25 La fig. 10 es una imagen que ilustra la morfología de un trasplante después del trasplante de una composición mixta de colágeno y pegamento de fibrina.

30 Las figs. 11 y 12 son imágenes por microscopía de fluorescencia que ilustran la proliferación de células de cartílago en un pegamento de fibrina.

Las figs. 13 y 14 son imágenes por microscopía de fluorescencia que ilustran la proliferación de células de cartílago en una composición mixta de colágeno y pegamento de fibrina.

35 Las figs. 15 y 16 son imágenes por microscopía de fluorescencia que ilustran la proliferación de células de cartílago en una composición mixta de 6 % de colágeno y pegamento de fibrina.

Modo de realización de la invención

40 A continuación en el presente documento, se describirá en detalle un modo de realización preferente de la presente invención para lograr los efectos anteriores con referencia a los dibujos adjuntos.

45 Una composición para la reparación de tejido de cartílago, un procedimiento para preparar la misma y un procedimiento para usar la misma de acuerdo con la presente invención son los que se muestran en las figs. 1 a 10.

50 En las siguientes descripciones, cuando se determine que las descripciones detalladas de funciones o constituciones conocidas asociadas con la presente invención confunden la esencia de la presente invención, se omitirán las descripciones detalladas de las mismas.

Además, los términos que se describirán más adelante se definen teniendo en cuenta sus funciones en la presente invención, y por lo tanto las definiciones de los términos deben interpretarse durante toda la presente memoria descriptiva, ya que los términos pueden interpretarse por la intención del productor o la costumbre.

55 En primer lugar, la presente invención proporciona una composición para la reparación de tejido de cartílago, preparándose la composición mezclando colágeno que tiene una concentración diluida de 5-60 mg/ml de agua o de una solución fisiológica de tampón fosfato; y ácido hialurónico que tiene una concentración diluida de 5-20 mg/ml de agua o de una solución fisiológica de tampón fosfato utilizando una jeringa de dos vías o un mezclador.

60 La composición para la reparación de tejido de cartílago se prepara mediante los pasos que incluyen: preparar colágeno que tiene una concentración diluida de 5 a 60 mg/ml de agua o de una solución fisiológica de tampón fosfato; preparar ácido hialurónico que tiene una concentración diluida de 5-20 mg/ml de agua o de una solución fisiológica de tampón fosfato; mezclar el colágeno y el ácido hialurónico usando una jeringa de dos vías o un mezclador; y desairear la composición mixta para la reparación de tejido de cartílago usando una centrífuga.

65

En particular, la separación por centrifugado en centrífuga se caracteriza por realizarse a 2000-5000 G mientras se mantiene temperatura ambiente a 1-30 °C.

5 La composición para la reparación de tejido de cartílago preparada como se indica arriba es adecuada para ser utilizada (el procedimiento de tratamiento no forma parte de la invención) pasando por los siguientes pasos: fijar una pata de cerdo en un soporte, dañar el cartílago articular usando una herramienta quirúrgica y luego inducir regiones con defectos de 2~4cm² usando un taladro; conectar una aguja de jeringa a un cuerpo de jeringa lleno de colágeno; y suturar el sitio de corte con un hilo de sutura, e inyectar directamente en la cavidad glenoidea (un espacio lleno de líquido sinovial) de la rodilla de cerdo colágeno con una concentración de 5 ~ 60 mg/ml contenido en la jeringa, ácido hialurónico con una concentración de 5 ~ 20 mg/ml contenido en la jeringa, y una composición para la reparación de tejido de cartílago en la que se mezclan el colágeno y el ácido hialurónico.

15 Paralelamente, de acuerdo con la presente invención, la composición para la reparación de tejido de cartílago se puede preparar mediante etapas que incluyen: preparar colágeno que tiene una concentración diluida de 5-60 mg/ml de agua o de una solución fisiológica de tampón fosfato; preparar ácido hialurónico que tiene una concentración diluida de 5-20 mg/ml de agua o de una solución fisiológica de tampón fosfato; y preparar una muestra en la que se mezclan 60 mg/ml de colágeno y 5 mg/ml de ácido hialurónico en una proporción de 9:1 a 1:9 o una muestra en la que 60 mg/ml de colágeno y 20 mg/ml de ácido hialurónico se mezclan en una proporción de 5:5.

20 La composición adecuada para la reparación de tejido de cartílago es adecuada para ser utilizada siguiendo los pasos:

25 (1) preparar una solución de colágeno contenida en un cuerpo de jeringa y un producto de pegamento de fibrina;

(2) fijar una pata de cerdo en un soporte, dañar el cartílago articular usando una herramienta quirúrgica, y luego inducir regiones con defectos de 2~4cm² usando un taladro;

30 (3) inyectar el producto de colágeno contenido en la jeringa en la región del defecto del cartílago de la rodilla de cerdo para llenar la región del defecto del cartílago con el producto de colágeno, y permitir que el pegamento de fibrina cubra el colágeno y luego se gelifique, fijando así firmemente el colágeno;

35 (4) al contrario que en el paso (3), recubrir el pegamento de fibrina sobre la región de defecto del cartílago del cerdo para que gelifique, y luego inyectar colágeno en el gel de pegamento de fibrina para llenar la región de defecto del cartílago;

(5) rociar agua para inyección estéril hacia abajo en una posición de 10 cm por encima del lugar de la inyección utilizando una jeringa (25 ml), para verificar la resistencia al agua que fluye y observar el estado del gel.

40 Además, de acuerdo con la presente invención, se prepara la composición para la reparación de tejido de cartílago tal que se inyecta ácido hialurónico y colágeno de alta viscosidad, o una composición mixta de colágeno y ácido hialurónico, como una composición para la reparación del cartílago, en una jeringa precargada, utilizándola así en una forma inyectable.

45 Además, de acuerdo con la presente invención, la composición para la reparación de tejido de cartílago se usa de manera que una aguja de jeringa se conecta a un agente de inyección de cartílago de tipo inyectable, y la aguja de jeringa se introduce en un sitio de aplicación utilizando la aguja de jeringa sin incisión quirúrgica, inyectando así directamente la composición para la reparación de cartílago en la cavidad glenoidea (un espacio lleno de líquido sinovial) de la rodilla de cerdo.

50 La composición para la reparación de tejido de cartílago es adecuada para ser utilizada de tal manera que se prepara un espécimen formando artificialmente una región de defecto del cartílago de 2-4 cm²; una composición para la reparación del cartílago se tiñe de azul y se inyecta en el espécimen; y luego el sitio trasplantado se abre, verificando así la morfología de la composición que llena la región de defecto del cartílago y verificando la capacidad de lavado con agua de la composición por el grado de adhesión a la región de defecto del cartílago.

55 Sin embargo, se debe tener en cuenta que no se pretende limitar la presente invención a modos de realización específicos descritos en la descripción detallada, sino que pretende cubrir todas las modificaciones, equivalentes o sustituciones que pertenecen a la idea técnica y al alcance técnico de la presente invención, que se definen por las reivindicaciones adjuntas.

60 La composición para la reparación de tejido de cartílago, el procedimiento para preparar la misma y el procedimiento para usar la misma se describirán a continuación.

65 En primer lugar, de acuerdo con la presente invención, cuando se prepara una composición basada en colágeno como biomaterial en un tipo de inyección capaz de ser trasplantada a regiones con defectos del cartílago, se

puede inducir efectivamente la regeneración de tejido de cartílago, haciendo así posible reducir el estrés relacionado con la cirugía en animales no humanos, mientras que se induce la reparación y regeneración del cartílago de forma relativamente fácil y rápida.

5 Además, no es parte de la presente invención, el tratamiento del defecto del cartílago es posible a través de un procedimiento simple, y mediante un procedimiento cómodo en el que se realiza un trasplante de una composición de tipo inyectable simple sin cirugía con incisión quirúrgica, el tratamiento del defecto del cartílago es posible precozmente, disminuyendo así el número de pacientes que requieren cirugía articular. Además, el tratamiento preventivo anterior puede conseguir reducir el número de pacientes con artrosis.

10

Ejemplos de la presente invención para ello son los siguientes.

(Ejemplo 1)

15 **Aplicación del producto mixto de colágeno y ácido hialurónico a la región de defecto del cartílago del animal**

Objetivo: Verificación de la aplicabilidad de la composición mixta de colágeno y ácido hialurónico de tipo inyectable en la región de defecto del cartílago de la rodilla de cerdo

20

1. Se prepara colágeno con concentraciones de 5, 10, 20, 30 y 60 mg/ml y ácido hialurónico con concentraciones de 5, 10 y 20 mg/ml.

25

Concentración de colágeno: Para la reparación del cartílago como uso del presente producto, es necesario que el colágeno tenga una concentración de 5 mg/ml o más para mantener un estado en el que la región de defecto del cartílago esté llena de colágeno. Debido a las características del procedimiento (preparación aséptica) en la preparación de un producto para uso médico (forma inyectable), es difícil preparar colágeno de más de 60 mg/ml con una viscosidad ultra alta, y realmente usar y aplicar dicho colágeno. Por esta razón, la concentración de colágeno se establece en 5 mg/l a 60 mg/l inclusive.

30

35

Concentración de ácido hialurónico: Es difícil preparar (preparar asépticamente) ácido hialurónico de 20 mg/ml para uso médico debido a las características naturales del ácido hialurónico (viscosidad, etc.), y la mezcla del ácido hialurónico con colágeno no es fácil. Además, es necesario que el ácido hialurónico tenga una concentración de al menos 5 mg/ml para mantener la característica (viscosidad) requerida para el producto. Además, el ácido hialurónico añadido a la base de colágeno actúa en el sitio del cartílago y así mejora la potencia de lubricación, ayudando a la flexión del cartílago. Por las razones anteriores, el ácido hialurónico se añade al colágeno y la concentración de ácido hialurónico se establece en 5 mg/l a 20 mg/l inclusive.

40

Preparación de composición mixta de colágeno y ácido hialurónico y colágeno

Procedimiento de mezclado A: Procedimiento de mezclado de solución de colágeno y solución de materias primas

45

1) El colágeno preparado se diluye con agua o una solución fisiológica de tampón fosfato para preparar una solución de colágeno que tenga una concentración deseada.

2) El ácido hialurónico preparado (de tipo en polvo) se diluye con agua o una solución fisiológica de tampón fosfato para que tenga una concentración apropiada.

50

3) Las soluciones preparadas se mezclan usando una jeringa de dos vías que permite mezclar durante un corto tiempo o mediante un mezclador (de rodillo) (figuras 1 y 2).

55

4) Cuando las materias primas y las soluciones utilizadas para la mezcla se almacenan en condiciones de refrigeración (2 ~ 8 °C) previamente, la mezcla se realiza de manera fácil y sin problemas.

Procedimiento de mezclado B: Procedimiento de mezclado directo de materia prima (polvo) con solución de colágeno

60

1) El colágeno preparado se diluye con agua o una solución fisiológica de tampón fosfato para preparar una solución de colágeno que tenga una concentración deseada.

2) El ácido hialurónico (de tipo en polvo) se introduce en la solución de colágeno que tiene una concentración apropiada y después se mezcla.

3) La solución preparada se mezcla directamente mediante el uso de una jeringa de dos vías que permite mezclar durante un breve período de tiempo o usando una varilla de mezcla.

5 4) La forma de mezclado anterior es necesaria para preparar un producto de alta concentración, y el mezclado se realiza fácilmente y sin problemas mientras el ambiente circundante se mantenga a una temperatura baja en el momento del mezclado.

Preparación de la composición a base de colágeno en forma inyectable

10 1) El colágeno y una composición mixta a base de colágeno se desairean usando una centrífuga.

2) Las condiciones de centrifugado son mantener la temperatura ambiente (1~ 30 °C) y el efecto de centrifugado (valor de G) de 22.000 a 5000 G.

15 3) Un cuerpo de jeringa se llena usando una bomba de alta viscosidad. Aquí se toma la precaución de no generar espacios vacíos elevando gradualmente la boquilla de abajo a arriba.

20 4) Se coloca una junta en la superficie trasera del cuerpo de la jeringa mediante vacío para sellar completamente la jeringa, evitando así la fuga de un líquido del cuerpo de la jeringa.

5) El cuerpo de jeringa lleno se almacena a temperatura ambiente para conservar las características únicas del colágeno (1-30 °C).

No es necesario congelar la solución ni desnaturalizarla a alta temperatura.

25 2. Para verificar el efecto después de la inyección en el organismo, una muestra preparada se tiñe con una pequeña cantidad de un agente de tinción azul (azul tripano, que se une a proteínas) (fig. 4).

30 3. Procedimiento de uso y verificación de efecto (no forma parte de la invención)

1) Después de fijar una pata de cerdo en un soporte, se daña el cartílago articular de la rodilla usando una herramienta quirúrgica y se inducen regiones de defectos grandes (aproximadamente 4 cm²) y pequeños (aproximadamente 2 cm²) usando un taladro (fig. 5).

35 2) Una aguja de jeringa está conectada a un cuerpo de jeringa lleno de colágeno o similar. Aquí la aguja de la jeringa tiene una longitud de al menos 1,5 pulgadas (38 mm).

40 3) El sitio de corte se sutura con un hilo de sutura, y el producto con cada concentración contenido en la jeringa se inyecta directamente en la cavidad glenoidea (un espacio lleno de líquido sinovial) de la rodilla de cerdo (fig. 7).

45 4) Se mueve la articulación de la rodilla (movimiento pasivo continuo (CMP)) para promover la acción del material inyectado que, de forma natural, llena las regiones de defecto. Además, el sitio suturado se corta para exponer la porción de cartílago en la que se inyecta el producto y observar.

4. Resultados: El producto inyectado en las regiones con defecto de cartílago llena de forma natural las regiones de los defectos inducidos, mostrando así un efecto preferido por un usuario (fig. 8).

(Ejemplo 2)

Experimento para verificar la adherencia de la composición mixta de colágeno y ácido hialurónico

55 1. Se prepara colágeno con concentraciones de 10, 30 y 60 mg/ml (1, 3 y 6 %) y ácido hialurónico con concentraciones de 5, 10 y 20 mg/ml (0,5, 1,0 y 2,0 %), contenidos en jeringas por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1. Además, se prepara una muestra en la que se mezclan 60 mg/ml de colágeno y 5 mg/ml de ácido hialurónico en una proporción de 9:1 a 1:9 y una muestra en la que se mezclan 60 mg/ml de colágeno y 20 mg/ml de ácido hialurónico en una proporción de 5:5. Aquí el efecto de la composición mixta de colágeno y ácido hialurónico corresponde a la suma de un efecto debido a las características del colágeno (componentes de cartílago biocompatibles y biodegradación) y un efecto debido a las características del ácido hialurónico (potencia de lubricación), y por lo tanto, una composición adecuada para la reparación del cartílago.

60 2. Medición de la viscosidad en función de la proporción de mezcla de colágeno y ácido hialurónico
La viscosidad de cada muestra se mide utilizando un viscosímetro (DV-1 + PRO).

65

ES 2 711 528 T3

Elemento medido: viscosidad

Temperatura de medición: 4 °C

5 RPM de medición: 0,5

Huso: # SC4-15

[Tabla 1]

10

Muestra	Viscosidad (CP, 10 ³)	Nota
6 % de colágeno	147	Viscosidad máxima
6 % de colágeno + 0,5 % de ácido hialurónico (9:1)	142	-
6 % de colágeno + 0,5 % de ácido hialurónico (8:2)	106	-
6 % de colágeno + 0,5 % de ácido hialurónico (7:3)	79	-
6 % de colágeno + 0,5 % de ácido hialurónico (6:4)	64	-
6 % de colágeno + 0,5 % de ácido hialurónico (5:5)	57	-
6 % de colágeno + 0,5 % de ácido hialurónico (4:6)	46	-
6 % de colágeno + 0,5 % de ácido hialurónico (3:7)	22	-
6 % de colágeno + 0,5 % de ácido hialurónico (2:8)	15	-
6 % de colágeno + 0,5 % de ácido hialurónico (1:9)	3	-
0,5 % de ácido hialurónico	0,5	Viscosidad mínima

3. Prueba de adhesividad en función de la proporción de mezcla de colágeno y ácido hialurónico

15 La comparación de la adherencia se realiza midiendo la distancia de adhesión del material para cada muestra usando un reómetro (CR-500 DX).

Velocidad de desplazamiento del portamuestras (10 mm/s)

20 Se mide la distancia de desplazamiento hasta el punto en el que se rompe la adhesión durante el desplazamiento del portamuestras.

[Tabla 2]

Muestra	Distancia de adhesión del material (mm)	Nota
1 % de colágeno	19	-
3 % de colágeno	47	-
6 % de colágeno	61	Adherencia máxima
6 % de colágeno + 0,5 % de ácido hialurónico (9:1)	55	-
6 % de colágeno + 0,5 % de ácido hialurónico (8:2)	49	-
6 % de colágeno + 0,5 % de ácido hialurónico (7:3)	42	-
6 % de colágeno + 0,5 % de ácido hialurónico (6:4)	39	-
6 % de colágeno + 0,5 % de ácido hialurónico (5:5)	36	-
6 % de colágeno + 0,5 % de ácido hialurónico (4:6)	35	-
6 % de colágeno + 0,5 % de ácido hialurónico (3:7)	32	-

Muestra	Distancia de adhesión del material (mm)	Nota
hialurónico (3:7)		
6 % de colágeno + 0,5 % de ácido hialurónico (2:8)	25	-
6 % de colágeno + 0,5 % de ácido hialurónico (1:9)	19	-
6 % de colágeno + 2,0% de ácido hialurónico (5:5)	43	-
0,5 % de ácido hialurónico	13	Adherencia mínima
1,0 % de ácido hialurónico	19	-
2,0 % de ácido hialurónico	23	-

Resultados: Se confirmó la adhesión de la composición mixta de colágeno y ácido hialurónico, y se observó que, cuanto mayor es la concentración de colágeno, mayor es la viscosidad.

5 (Ejemplo 3)

Ensayo para verificar la capacidad de lavado con agua de colágeno y ácido hialurónico después del trasplante de los mismos

10 Objetivo: Verificación de la resistencia contra un factor que interrumpe la adherencia (fijación) continua y el relleno del producto inyectado con respecto a las regiones con defecto

15 1. Se prepara colágeno con concentraciones de 30 y 60 mg/ml (3 y 6 %) y ácido hialurónico con concentraciones de 10 y 20 mg/ml (1,0 y 2,0 %), contenidos en jeringas, por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1.

20 2. Después de fijar una pata de cerdo en un soporte, se daña el cartílago articular usando una herramienta quirúrgica y se inducen regiones de defectos grandes (aproximadamente 4 cm²) y pequeños (aproximadamente 2 cm²) usando un taladro.

3. Se inyecta un producto con cada concentración de la jeringa y se llenan las regiones con defectos del cartílago de la rodilla de cerdo.

25 4. El agua para inyección se rocía hacia abajo en una posición de 10 cm por encima del lugar de inyección usando una jeringa (25 ml).

5. La resistencia del producto que llena las regiones de defecto del cartílago al agua que fluye se observa a simple vista.

30 6. Resultados: El producto que llenaba las regiones de defecto del cartílago resistía el flujo de agua (no lavable) y, por lo tanto, se adhería continuamente a las regiones de defecto, manteniendo así un estado en el que las regiones de defecto estaban llenas del producto (fig. 9).

(Ejemplo 4) No forma parte de la presente invención

35 Procedimiento de aplicación de colágeno y pegamento de fibrina en las regiones con defectos del cartílago y ensayo de proliferación celular en la composición

40 Objetivo: Verificación de la aplicabilidad del pegamento de fibrina y colágeno de tipo inyectable y de la reparación de defectos del cartílago mediante la aplicación de pegamento de fibrina y colágeno

45 1. Se prepara una solución de colágeno al 6 % contenida en un cuerpo de jeringa mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, y se prepara un producto de pegamento de fibrina. Las especificaciones básicas del pegamento de fibrina producido y utilizado en el presente documento son una concentración de fibrinógeno de 71-127 mg/ml y una concentración de trombina de 400-600 UI/ml (especificaciones habituales del producto comercial).

2. Después de fijar una pata de cerdo en un soporte, se daña el cartílago articular de la rodilla usando una herramienta quirúrgica y se inducen regiones de defectos grandes (aproximadamente 4 cm²) y pequeños (aproximadamente 2 cm²) usando un taladro.

3. El producto de colágeno que tiene una concentración del 6 % contenido en la jeringa se inyecta y llena las regiones de defectos del cartílago de la rodilla de cerdo, y luego se deja que la pegamento de fibrina cubra el colágeno y luego se gelifique, fijando así firmemente el colágeno.

5 4. Al contrario que en el punto "3", el pegamento de fibrina se recubre sobre las regiones de defecto del cartílago del cerdo y luego se gelifica, y luego se inyecta colágeno al 6 % en el gel de pegamento de fibrina para llenar las regiones de defecto del cartílago.

10 5. Se rocía agua para inyección estéril hacia abajo en una posición de 10 cm por encima del lugar de la inyección mediante el uso de una jeringa (25 ml), para verificar la resistencia al agua que fluye y, por lo tanto, el estado del gel.

15 Resultados: El producto que llenaba las regiones de defecto del cartílago mantuvo una forma firme de gel, y resistió el agua que fluía, y por tanto se adhirió continuamente a las regiones de defecto, manteniendo así un estado en el que las regiones de defecto estaban llenas del producto (figura 10).

6. Se lleva a cabo un ensayo de la proliferación de células de cartílago en la composición mixta de colágeno y pegamento de fibrina.

20 Las células de cartílago preparadas ($1,2 \times 10^{70}$ células/2 ml) se mezclan con la composición mixta.

Se lleva a cabo un cultivo en CO₂ durante 7 días.

25 La proliferación de células de cartílago por análisis de calceína AM se observa mediante un microscopio de fluorescencia.

(De izquierda a derecha, pegamento de fibrina, composición mixta de colágeno al 3 %/pegamento de fibrina y composición mixta de colágeno al 6 %/pegamento de fibrina)

30 Tabla 3

Número (Día 0)	Fig. 11	Fig. 13	Fig. 15
Día 7	Fig. 12	Fig. 14	Fig. 16

35 Resultados: Como resultado de la verificación de la proliferación celular en la composición, se observó que la proliferación celular era mayor en la composición mixta de colágeno al 3 % y pegamento de fibrina y la composición de composición mixta de colágeno al 6 % y pegamento de fibrina que en la que solo contenía pegamento de fibrina.

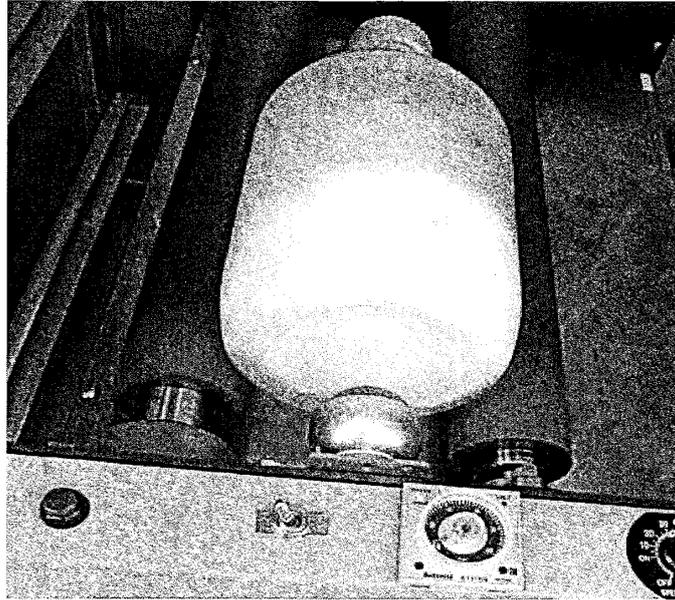
Aplicabilidad industrial

40 Dentro del espíritu técnico de la composición para la reparación de tejido de cartílago, el procedimiento para preparar la misma y su uso de acuerdo con la presente invención, los mismos resultados son sustancialmente reproducibles. Particularmente, la presente invención se lleva a cabo para promover el desarrollo tecnológico y contribuir al desarrollo industrial y, por lo tanto, los derechos de la presente invención deben estar protegidos por la ley de patentes.

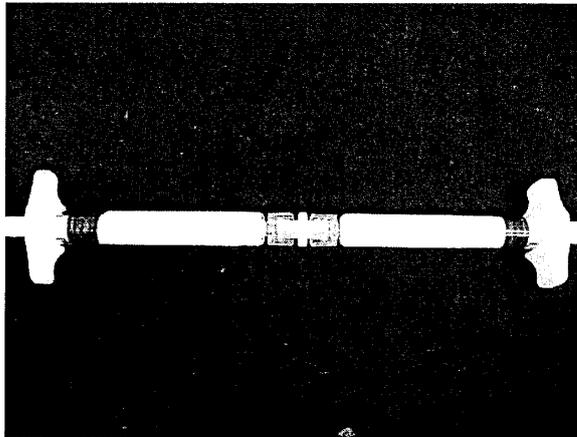
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para la reparación de tejido de cartílago, preparándose la composición mezclando colágeno que tiene una concentración diluida de 5 a 60 mg/ml de agua o de una solución fisiológica de tampón fosfato; y ácido hialurónico que tiene una concentración diluida de 5-20 mg/ml de agua o de una solución fisiológica de tampón fosfato utilizando una jeringa de dos vías o un mezclador.
- 10 2. Un procedimiento para preparar una composición para la reparación de tejido de cartílago, comprendiendo el procedimiento: preparar colágeno que tiene una concentración diluida de 5-60 mg/ml de agua o de una solución fisiológica de tampón fosfato; preparar ácido hialurónico que tiene una concentración diluida de 5-20 mg/ml de agua o de una solución fisiológica de tampón fosfato; mezclar el colágeno y el ácido hialurónico usando una jeringa de dos vías o un mezclador; y desairear la composición mixta para la reparación de tejido de cartílago usando una centrífuga.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la separación por centrifugado en centrífuga se realiza a 2000-5000 G mientras se mantiene temperatura ambiente a 1-30 °C.
- 20 4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en un procedimiento para la reparación de tejido de cartílago, que comprende: fijar una pata de cerdo en un soporte, dañar el cartílago articular usando una herramienta quirúrgica y luego inducir regiones de defectos de 2-4 cm² usando un taladro; conectar una aguja de jeringa a un cuerpo de jeringa lleno de colágeno; y suturar el sitio de corte con un hilo de sutura, e inyectar directamente en la cavidad glenoidea (un espacio lleno de líquido sinovial) de la rodilla de cerdo colágeno con una concentración de 5-60 mg/ml contenido en la jeringa, ácido hialurónico con una concentración de 5-20 mg/ml contenido en la jeringa, y una composición para la reparación de tejido de cartílago en la que están mezclados el colágeno y el ácido hialurónico.
- 25 5. Un procedimiento para preparar una composición para la reparación de tejido de cartílago de acuerdo con la reivindicación 2, comprendiendo además el procedimiento: preparar una muestra en la que se mezclan 60 mg/ml de colágeno y 5 mg/ml de ácido hialurónico en una proporción de 9:1 a 1:9 o una muestra en la que se mezclan 60 mg/ml de colágeno y 20 mg/ml de ácido hialurónico en una proporción de 5:5.
- 30 6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en un procedimiento para la reparación de tejido de cartílago, comprendiendo el procedimiento: (1) preparar una solución de colágeno contenida en un cuerpo de jeringa y un producto de pegamento de fibrina; (2) fijar una pata de cerdo en un soporte, dañar el cartílago articular utilizando una herramienta quirúrgica y luego inducir regiones de defectos de 2-4 cm² usando un taladro; (3) inyectar el producto de colágeno contenido en la jeringa en la región del defecto del cartílago de la rodilla de cerdo para rellenar la región del defecto del cartílago con el producto de colágeno, y permitir que el pegamento de fibrina cubra el colágeno y luego se gelifique, fijando así firmemente el colágeno; (4), al contrario que en la etapa (3), recubrir el pegamento de fibrina sobre la región de defecto del cartílago del cerdo para que gelifique, y luego inyectar colágeno en el gel de pegamento de fibrina para llenar la región de defecto del cartílago; y (5) rociar agua para inyección estéril hacia abajo en una posición de 10 cm por encima del lugar de la inyección utilizando una jeringa (25 ml), para verificar la resistencia al agua que fluye y observar el estado del gel.
- 35 40 7. Un procedimiento para preparar una composición para la reparación de tejido de cartílago de acuerdo con la reivindicación 2, en el que se inyecta ácido hialurónico y colágeno de alta viscosidad, o una composición mixta de colágeno y ácido hialurónico, como una composición para la reparación del cartílago, en una jeringa precargada, utilizándolo así en una forma inyectable.
- 45 50 8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en un procedimiento para la reparación de tejido de cartílago, en la que una aguja de jeringa se conecta a un agente de inyección de cartílago de tipo inyectable, y la aguja de jeringa se introduce en un sitio de aplicación usando la aguja de jeringa sin incisión quirúrgica, inyectando así la composición directamente para la reparación de cartílago en la cavidad glenoidea (un espacio lleno de líquido sinovial) de la rodilla de cerdo.
- 55 60 9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en un procedimiento para la reparación de tejido de cartílago, en la que se prepara un espécimen formando artificialmente una región de defecto de cartílago de 2-4 cm²; una composición para la reparación del cartílago se tiñe de azul y se inyecta en el espécimen; y luego el sitio trasplantado se abre, verificando así la morfología de la composición que llena la región de defecto del cartílago y verificando la capacidad de lavado con agua de la composición por el grado de adhesión a la región de defecto del cartílago.

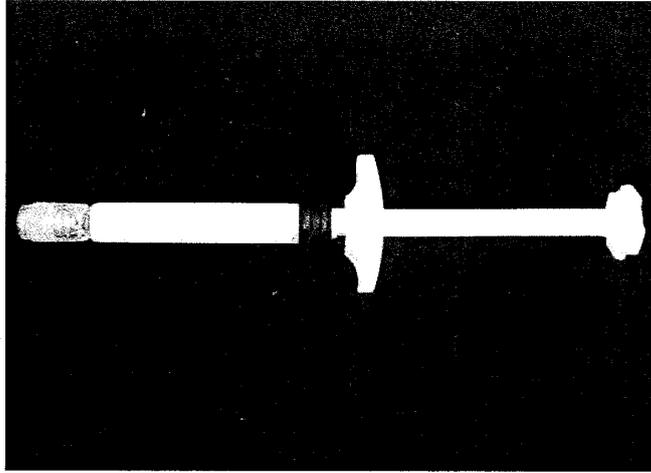
[Fig. 1]



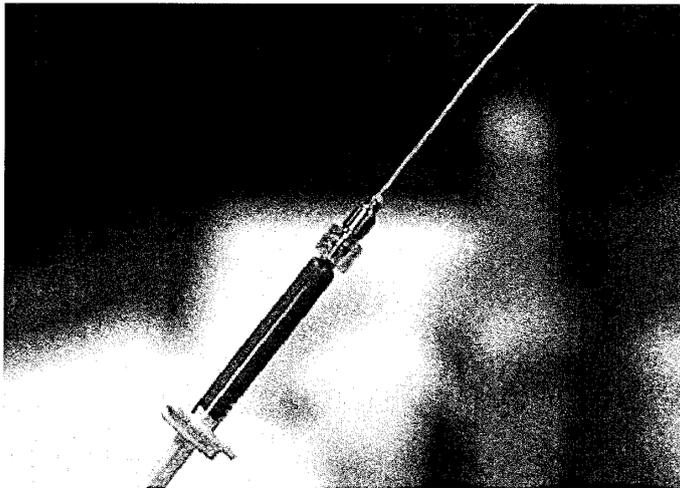
[Fig. 2]



[Fig. 3]



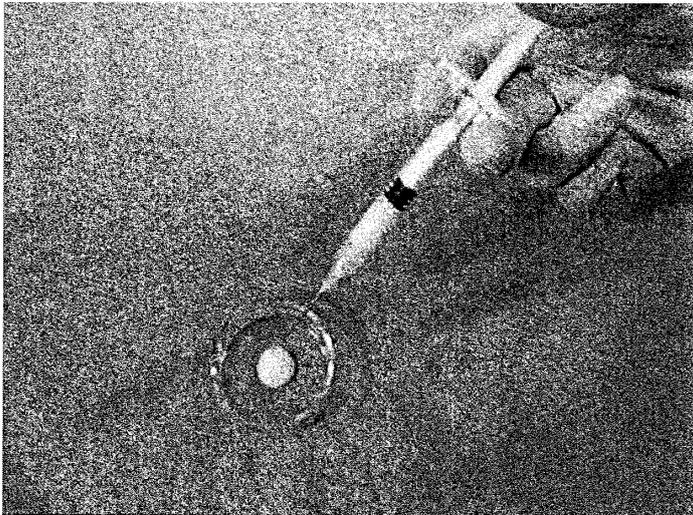
[Fig. 4]



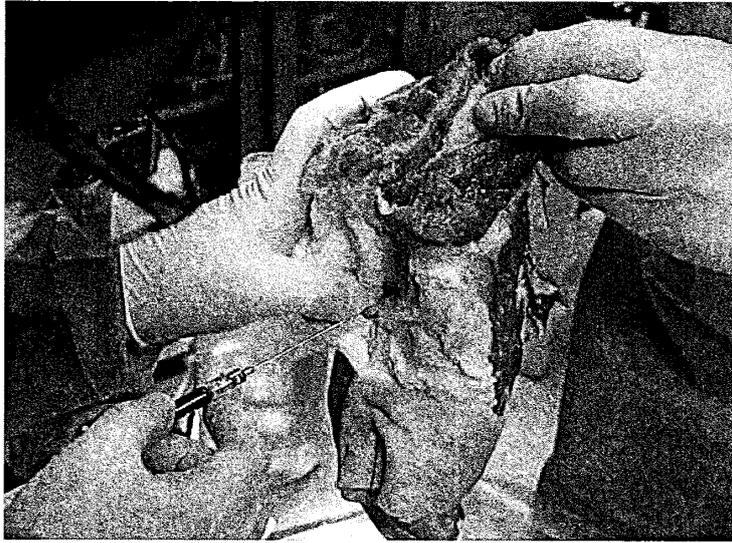
[Fig. 5]



[Fig. 6]



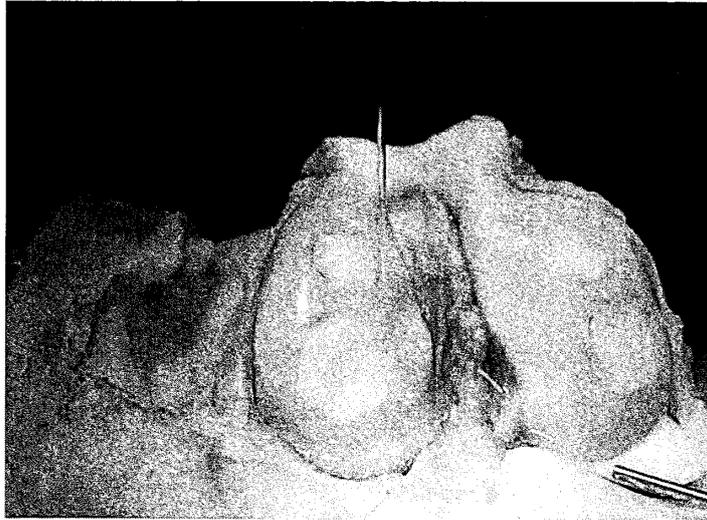
[Fig. 7]



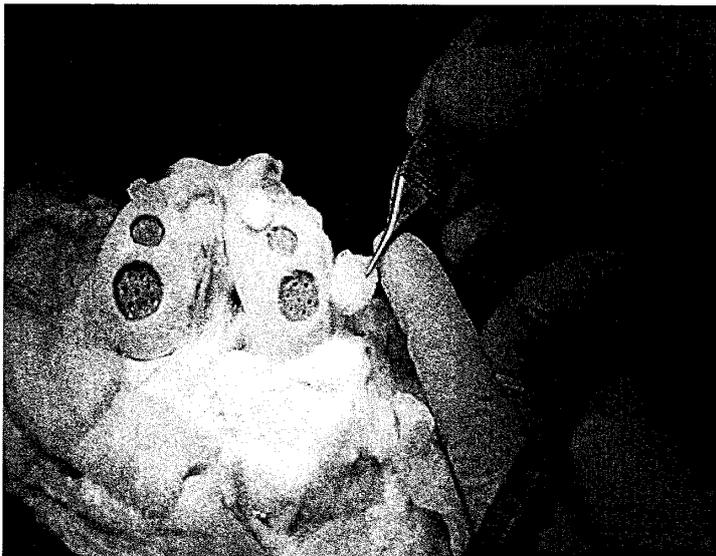
[Fig. 8]



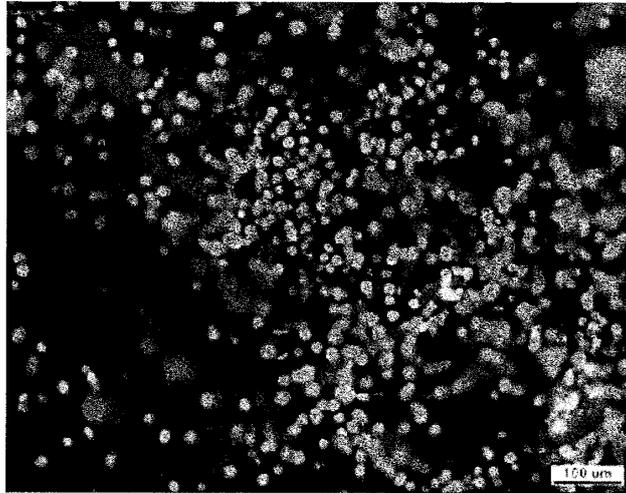
[Fig. 9]



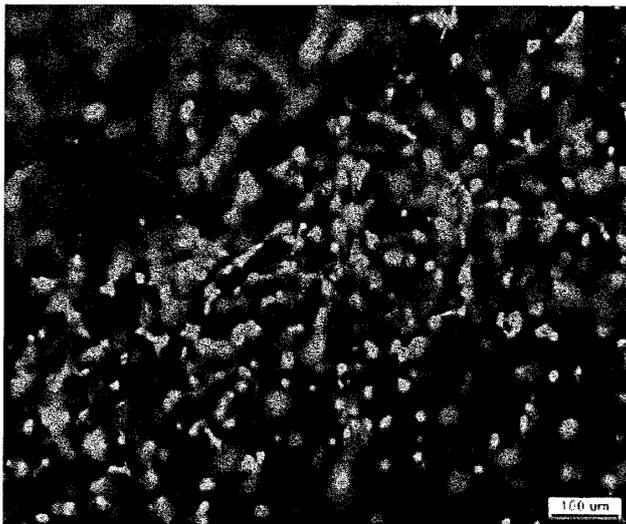
[Fig. 10]



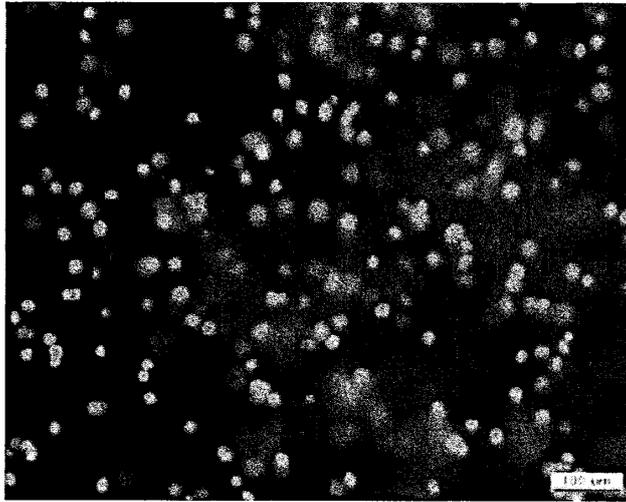
[Fig. 11]



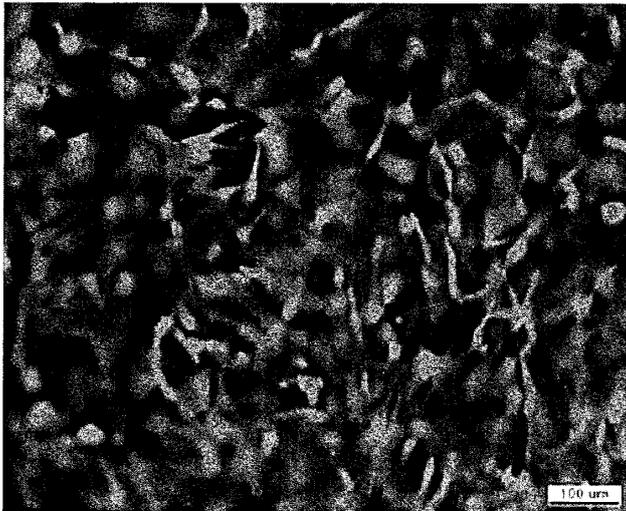
[Fig. 12]



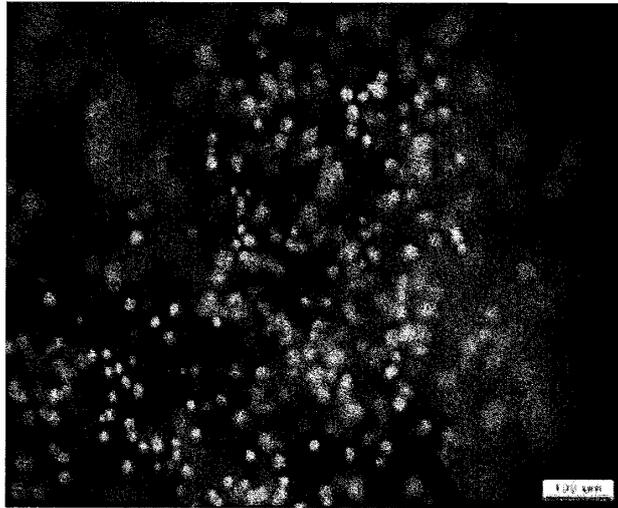
[Fig. 13]



[Fig. 14]



[Fig. 15]



[Fig. 16]

