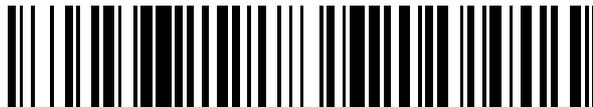


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 672**

51 Int. Cl.:

A61L 27/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2014 PCT/JP2014/054572**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14141877**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2014 E 14765519 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2952214**

54 Título: **Material para reparación de tejidos**

30 Prioridad:

12.03.2013 JP 2013049339

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

06.05.2019

73 Titular/es:

**FUJIFILM CORPORATION (100.0%)
26-30 Nishiazabu 2-chome
Minato-kuTokyo, JP**

72 Inventor/es:

**NAKAHARA, IZUMI;
FUSHIMI, HIDEO;
HIRATSUKA, TAKAHIRO;
OKAMURA, AI;
OYA, SHOJI;
SAKAI, HIDEKAZU y
OONO, YOSHITAKA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 711 672 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

Material para reparación de tejidos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un material para reparación de tejidos.

Antecedentes de la técnica

10

En la actualidad se están realizando progresos en la implementación de la medicina regenerativa para regenerar tejidos biológicos u órganos con funciones deterioradas, o pérdida de funciones. La medicina regenerativa es una nueva tecnología médica que utiliza tres factores de células, la estructura base, y factores de crecimiento en un tejido biológico que ha perdido la capacidad de recuperarse por sus propias capacidades de curación, y restablecer una morfología y una función similar a las del tejido original.

15

20

La regeneración ósea en los campos de la ortopedia y la odontología es un campo de la medicina regenerativa que está despertando mucha atención. En enfermedades óseas que afectan los pies y las caderas, los defectos óseos producidos por la enfermedad pueden dar como resultado la pérdida de la capacidad de deambulación. En el caso de una enfermedad ósea en el tejido periodontal, la enfermedad ósea dificulta la ingesta de alimento. Por tanto, las enfermedades óseas producen una disminución significativa en la calidad de vida.

25

El colágeno o la gelatina, que tienen una elevada biocompatibilidad, se utilizan como sustrato en el campo de la medicina regenerativa.

30

Por ejemplo, la publicación internacional (WO) N.º 2011/027850 divulga un agente para la regeneración del hueso y una formulación protésica ósea que incluye una gelatina recombinante, y en que el soporte protésico es capaz de estimular la regeneración ósea por sí mismo.

35

La solicitud de patente japonesa abierta a consulta (JP-A) N.º H08-196618 divulga una formulación de colágeno que penetra en las células formada por una matriz de colágeno de tipo esponja que tienen numerosos poros. Los documentos JP-A con números 2001-212105 y 2010-046249 divulgan un material protésico óseo en el que se utilizan gránulos biocerámicos como material protésico granulado. El documento EP2543398 divulga sustratos reticulados y criodesecados que comprenden gelatina, que muestran índices de absorción de agua del 1000 % o más y su uso en la regeneración ósea.

Sumario de la invención

40

Problema técnico

45

Sin embargo, cuando se utiliza una esponja en forma de bloque como la formulación de colágeno penetrable descrita en el documento JP-A n.º H08-196618, se necesita un alto grado de comunicación entre los poros de la esponja para garantizar la penetrabilidad de las células en el interior del bloque, y esto dificulta aumentar la elasticidad global del bloque. Cuando se usa colágeno como el material, es difícil preparar una solución de colágeno que tenga concentraciones elevadas, y producir un material de tipo esponja de elevada elasticidad es difícil. Por lo tanto, en el caso en que dicho material se utilice como agente protésico, y cuando el área donde falta hueso está situado en un sitio que está normalmente bajo presión, es posible que no se pueda mantener el volumen del área donde falta hueso. En el caso de agentes protésicos del hueso fabricados a partir de gránulos biocerámicos, existen casos donde los agentes protésicos del hueso permanecen en el cuerpo durante un periodo de tiempo prolongado, y no permiten la sustitución por el hueso regenerado. Por tanto, cada una de las tecnologías anteriormente descritas sigue teniendo hueco para mejoras desde el punto de vista de obtener un material para reparación de tejidos que estimule la regeneración de un tejido tal como el hueso.

50

La invención aborda la provisión de un material para reparación de tejidos que tenga alta capacidad para regenerar un tejido tal como el hueso.

Solución al problema

60

El alcance de la invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones y sustratos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del organismo humano (o animal) mediante terapia.

La invención incluye los siguientes aspectos:

65

[1] Un sustrato que comprende gránulos de gelatina para su uso en la regeneración ósea, presentando el sustrato una absorción de agua del 800 % en masa o más, y una relación residual del 60 % en masa o menos

después de tres horas de tratamiento de descomposición usando 1 mol/l de ácido clorhídrico.

[2] El sustrato de acuerdo con [1], en el que los gránulos de gelatina incluyen una gelatina granulada que atraviesa un tamiz que tiene aberturas de 1400 µm.

5 [3] El sustrato de acuerdo con [1] o [2], en el que los gránulos de gelatina incluyen un producto de gelatina reticulada.

[4] El sustrato de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], en el que los gránulos de gelatina incluyen un producto de gelatina reticulada térmicamente.

[5] El sustrato de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4], en el que el material para reparación de tejidos es granulado.

10 [6] El sustrato de acuerdo con [1] en el que los gránulos de gelatina tienen orificios comunicantes con un diámetro de orificio de 10 µm a 2500 µm.

[7] El sustrato de acuerdo con [1], en el que los gránulos de gelatina comprende una gelatina recombinante que no incluye restos de serina o restos de treonina.

15 [8] El sustrato de acuerdo con [1], en el que los gránulos de gelatina comprenden una gelatina recombinante que no incluye restos de la serina, restos de treonina, restos de asparagina, restos de tirosina, o restos de cisteína.

[9] El sustrato de acuerdo con [1], en el que los gránulos de gelatina comprenden una gelatina recombinante que no incluye secuencias de aminoácidos representadas por Asp-Arg-Gly-Asp.

[10] El sustrato de acuerdo con [1], en el que los gránulos de gelatina comprenden una gelatina recombinante que tiene un punto isoeléctrico de 5 a 10.

20 [11] Un sustrato de acuerdo con [1], que comprende además un agente osteoconductor.

[12] Un material para reparación de tejidos en forma de bloque que comprende gelatina para su uso en la regeneración de la dermis, presentando el material para reparación de tejidos en forma de bloque una absorción de agua del 800 % en masa o más, y una relación residual del 60 % en masa o menos después de tres horas de tratamiento de descomposición usando 1 mol/l de ácido clorhídrico. Efectos ventajosos de la invención

25 De acuerdo con la invención, se puede proporcionar un material para reparación de tejidos que presente una elevada capacidad para regenerar un tejido tal como el hueso.

30 Descripción de las realizaciones

En la presente memoria descriptiva, el término "proceso" no se refiere solamente a un proceso independiente, y un proceso dado no se puede distinguir claramente de otro proceso que también esté incluido en el término siempre que se obtengan los efectos especificados del proceso dado.

35 Los intervalos numéricos indicado por "a" en la presente memoria descriptiva indican intervalos en los que los valores numéricos antes y después del "to" estén incluidos como el respectivo valor inferior y valor superior del intervalo.

40 En la invención, cuando existen sustancias plurales que corresponden a un componente dado en una composición, el contenido del componente dado en la composición se refiere al contenido total de las sustancias plurales presentes en la composición, a menos que se indique otra cosa.

45 En la invención, las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos se denotan, algunas veces, usando los símbolos de una sola letra (por ejemplo, "G" para un resto de glicina) o bien los símbolos de tres letras (por ejemplo, "Gly" en el caso de un resto de glicina), que son conocidos en el campo técnico relevante.

50 En la invención, el uso de "%" con respecto a las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos se basa en el número de restos de aminoácidos (o de iminoácidos) salvo que se indique otra cosa.

55 En la invención, el uso de "identidad" con respecto a las secuencias de aminoácidos de dos polipéptidos que se están comparando se refiere a un valor calculado mediante la ecuación siguiente. La comparación (alineamiento) de los polipéptidos plurales se realiza de acuerdo con métodos convencionales de forma que se maximice el número de aminoácidos que se emparejan.

$$\text{Identidad (\%)} = \{(\text{número de aminoácidos idénticos}) / (\text{longitud de alineación})\} \times 100$$

Sigue la explicación relativa a la invención.

60 El material para reparación de tejidos de acuerdo con la invención incluye gránulos de gelatina y presenta una absorción de agua del 800 % en masa o más, y una relación residual del 60 % en masa o menos después de tres horas de tratamiento de descomposición usando 1 mol/l de ácido clorhídrico.

65 El valor de la relación residual anteriormente especificada indica un índice de descomposición del 40 % en masa o más después de tres horas de tratamiento de descomposición usando 1 mol/l de ácido clorhídrico.

A continuación, la relación residual, tal como se ha definido anteriormente, también se ha denominado como "relación residual en presencia de ácido".

5 El material para reparación de tejidos de acuerdo con la invención está configurado para mostrar una excelente capacidad de regeneración del tejido incluyendo gránulos de gelatina y está fabricado para mostrar una excelente capacidad de regeneración del tejido por su inclusión e gránulos de gelatina, y está hecho para mostrar la absorptividad de agua y la capacidad residual en presencia de ácido, como se ha especificado anteriormente. Más específicamente, se puede pensar en el siguiente mecanismo:

10 el material para reparación de tejidos es capaz de alojar coágulos de sangre en una zona con defecto de tejido debido a tener la absorptividad de agua especificada, y la resistencia del material de reparación de tejidos se garantiza durante un periodo de tiempo deseado debido a tener la relación residual especificada en la presencia de ácido, concretamente, el índice de descomposición especificado, por el cual, el material para reparación de
15 tejidos es capaz de actuar como punto a sustituir por el hueso regenerado, manteniendo al mismo tiempo el volumen de la zona defectuosa; y, como resultado, la colocación del material para reparación de tejidos en la zona defectuosa permite que la regeneración de un tejido tal como el hueso proceda de una manera favorable. Sin embargo, la invención no está restringida por este razonamiento.

20 El material para reparación de tejidos de acuerdo con la invención puede incluir otros componentes, si es necesario.

En la invención, "gránulos de gelatina" se refiere a una colección de gránulos de gelatina, salvo que se indique otra cosa.

25 Tras realizar un proceso para preparar la gelatina granulada, los gránulos de gelatina incluidos en el material para reparación de tejidos de acuerdo con la invención pueden ser independientes entre sí o pueden estar adheridos entre sí; sin embargo, los gránulos de gelatina preferentemente son independientes entre sí.

30 El material para reparación de tejidos de acuerdo con la invención, que incluye gránulos de gelatina, es preferentemente granulado. "El material para reparación de tejidos es granulado" denota que los gránulos que son independientes entre sí o están adheridos entre sí están en un estado que les permite atravesar un tamiz que tiene aberturas de 4 mm.

35 "En forma de bloque" en un material para reparación de tejidos en forma de bloque de acuerdo con la invención denota que el material para reparación de tejidos tiene al menos un eje con una longitud de 5 mm o más. Si hay un eje con una longitud de 5 mm o más, cualesquiera otros ejes pueden tener 5 mm o menos, para proporcionar una forma tal como una forma de varilla o una forma de lámina.

40 "Material para reparación de tejidos" en la invención se refiere a un material que, como resultado de implantarse en un organismo biológico, contribuye a la formación de un tejido en el sitio del implante, y que el material para reparación de tejidos puede incluir una célula o estar exento de células. Por otra parte, el material para reparación de tejidos puede incluir un componente que estimule una respuesta en el organismo biológico, tales como factores de crecimiento o fármacos, o puede estar exento de componentes que estimulen una respuesta en el organismo biológico tales como factores de crecimiento o fármacos. Por otra parte, se puede producir y aplicar una mezcla o
45 material inorgánico con un material inorgánico tal como hidroxiapatito. Sin embargo, cuando se mide la absorptividad de agua y la relación residual en presencia de ácido en la invención, estos se miden con respecto a una masa que excluye cualquiera de dichas células o materiales inorgánicos.

50 En la invención, "material para reparación de tejidos" no se refiere necesariamente a un material que contribuye a la formación de un tejido convencional que normalmente estará presente en el sitio del implante; el alcance del "material para reparación de tejidos" también abarca materiales que estimulan la formación de un tejido anómalo tal como tejido de cicatrización.

55 Gelatina

La gelatina puede ser una forma de gelatina natural, o puede ser una forma mutante o recombinante de gelatina que difiera de la forma natural en al menos un resto de aminoácido. La forma de gelatina natural se refiere a una gelatina obtenida a partir de una gelatina de origen natural como materia prima, o un polipéptido que tiene la misma
60 secuencia de aminoácidos que la de una gelatina obtenida a partir de un colágeno de origen natural como materia prima. En la presente memoria descriptiva, formas mutantes de gelatina o formas recombinantes de gelatina se refieren, en ambos casos, a una gelatina recombinante, a menos que se indique otra cosa. Las formas naturales de gelatina y las formas recombinantes de la misma incluyen las derivadas de animales tales como peces y mamíferos, y las gelatinas naturales de animales mamíferos y las gelatinas recombinantes de los mismos son preferibles. Los
65 ejemplos de animales mamíferos incluyen seres humanos, caballos, cerdos, ratones, y ratas, y los seres humanos y los cerdos son más preferibles. La forma natural de gelatina se deriva preferentemente de un cerdo o ser humano, y

la gelatina recombinante es preferentemente una gelatina recombinante derivada de ser humano.

Gelatina se refiere a un polipéptido que incluye consecutivamente 6 o más unidades de secuencia de aminoácidos, cada una representada por Gly-X-Y, y se pueden incluir en el polipéptido uno o más restos de aminoácidos diferentes a la secuencia de aminoácidos representada por Gly-X-Y. En este caso, Gly en Gly-X-Y representa un resto de glicina, y cada X e Y representan cualquier resto de aminoácido diferente a glicina. La secuencia de aminoácidos representada por Gly-X-Y es una secuencia correspondiente a una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de aminoácidos parcial del colágeno, y la repetición de esta secuencia representa una secuencia característica del colágeno.

Las unidades Gly-X-Y en una única molécula de gelatina pueden ser idénticas a otras, o pueden ser diferentes entre sí. Con respecto al X e Y en la secuencia Gly-X-Y, los X e Y, en sus unidades de repetición respectivas, son mutuamente independientes, y X e Y pueden ser idénticos entre sí o diferentes entre sí. Los restos de aminoácidos representados por X e Y incluyen preferentemente muchos restos de iminoácidos, concretamente, restos de prolina o restos de hidroxiprolina. La relación de contenido de restos de iminoácidos, tales como los descritos anteriormente, en una única molécula de gelatina es preferentemente de 10 % al 45 % de la molécula de gelatina. La relación de contenido de Gly-X-Y en una única molécula de gelatina es preferentemente del 80 % o más, más preferentemente del 95 % o más y lo más preferentemente del 99 % o más, con respecto a los restos de aminoácido totales.

La gelatina es, preferentemente, una gelatina recombinante obtenida mediante la introducción de una secuencia de aminoácidos o secuencias de bases en un hospedador adecuado usando un método ordinario y expresar el mismo, la secuencia de aminoácidos o la secuencia de bases que se puede obtener modificando uno o más restos de aminoácidos o de bases de una secuencia de aminoácidos o secuencia de bases de un gen que codifica un colágeno que incluyen consecutivamente 6 o más unidades de secuencia de aminoácidos, cada una de ellas representada mediante Gly-X-Y. El uso de dicha gelatina recombinante aumenta la capacidad de regeneración del hueso, y permite la expresión de diferentes características, en comparación con un caso en el que se utiliza la gelatina natural. El uso de dicha gelatina recombinante tiene la ventaja de, por ejemplo, permitir evitar las consecuencias negativas, tales como una respuesta de rechazo por el organismo biológico.

Los ejemplos de gelatina recombinante que son específicamente preferentemente utilizados incluyen los descritos en los documentos EP 1014176A2, US 6992172B1, WO2004/85473A2, WO2008/103041A1, publicación de patente japonesa en fase nacional (JP-A) números 2010-519293, 2010-519252, 2010-518833, y 2010-519251, WO2010/128672A1, y WO2010/147109A1.

La gelatina recombinante tiene preferentemente un peso molecular de 2 kDa a 100 kDa, preferentemente de 5 kDa a 90 kDa y más preferentemente de 10 kDa a 90 kDa.

Desde el punto de vista de la biocompatibilidad, la gelatina recombinante incluye preferentemente además una señal de adhesión celular, y más preferentemente incluye dos o más señales de adhesión celular en una sola molécula.

Los ejemplos de dicha señal de adhesión celular incluyen una secuencia RGD, una secuencia LDV, una secuencia REDV, una secuencia YIGSR, una secuencia PDSGR, una secuencia RYVVLPR, una secuencia LGTIPG, una secuencia RNIAEIIKDI, una secuencia IKAVAV, una secuencia LRE, una secuencia DGEA, y una secuencia HAV. Los ejemplos preferibles incluyen una secuencia RGD, una secuencia YIGSR, una secuencia PDSGR, una secuencia LGTIPG, una secuencia IKAVAV, y una secuencia HAV. Una secuencia RDG es especialmente preferible.

Entre las secuencias RDG, una secuencia ERGD es más preferible.

La colocación de la secuencia RDG en la gelatina recombinante es tal que hay de 0 a 100 restos de aminoácidos, y más preferentemente de 25 a 60 restos de aminoácidos, entre cada unidad de secuencia RGD. Las unidades de secuencia RDG están preferentemente colocadas de manera no uniforme, dentro del intervalo anteriormente descrito de número de restos de aminoácido que se debe cumplir.

La relación de secuencias RGD con respecto al número total de restos de aminoácidos en la gelatina recombinante (el número total de restos de aminoácidos en la secuencia RGD / el número total de restos de aminoácidos \times 100) es preferentemente al menos del 1,2 %, y cuando la gelatina recombinante incluye 250 restos de aminoácidos o más, es preferible que haya al menos una unidad de secuencia RGD incluida en cada tramo de 250 restos de aminoácidos.

La gelatina recombinante incluye preferentemente al menos dos unidades de secuencia RGD, más preferentemente incluye al menos 3 unidades de secuencia RGD, y aún más preferentemente incluye al menos 4 unidades de secuencia RGD, por cada 250 restos de aminoácidos.

La secuencia de la gelatina recombinante tiene preferentemente cualquiera de las siguientes características: (1) no incluye restos de serina ni restos de treonina, (2) no incluye restos de serina, restos de treonina, restos de asparagina, restos de tirosina, o restos de cisteína, o (3) no incluye secuencias de aminoácidos representadas por Asp-Arg-Gly-Asp. La gelatina recombinante puede tener una de estas características de secuencia preferidas (1) a (3), o puede tener una combinación de dos o más de estas características.

La gelatina recombinante puede estar parcialmente hidrolizada.

La gelatina recombinante incluye preferentemente una secuencia de aminoácidos de A-[(Gly-X-Y)_n]_m-B. En el presente documento, A representa un resto de aminoácido seleccionado libremente o dos o más restos de aminoácidos seleccionados libremente, B representa un resto de aminoácido seleccionado libremente o dos o más restos de aminoácidos seleccionados libremente, Gly representa glicina, X, n en número, cada uno representa independientemente un resto de aminoácido seleccionado libremente, e Y, n en número, cada uno representa independientemente un resto de aminoácido seleccionado libremente. Además, m representa un número entero de 2 a 10, y preferentemente representa un número entero de 3 a 5. Por otra parte, n representa un número entero de 3 a 100, preferentemente representa un número entero de 15 o 70, y más preferentemente representa un número entero de 50 a 60. Las unidades m de Gly-X-Y pueden ser todas idénticas entre sí, o parte, pero no todas, de estas pueden ser idénticas entre sí, o pueden ser diferentes entre sí.

Más preferentemente, la gelatina recombinante incluye una secuencia de aminoácidos de Gly-Ala-Pro-[(Gly-X-Y)₆₃]₃-Gly. En este caso, X, 63 en número, cada uno representa independientemente un resto de aminoácido seleccionado libremente, e Y, 63 en número, cada uno representa independientemente un resto de aminoácido seleccionado libremente. Las 63 unidades Gly-X-Y pueden ser todas idénticas entre sí, o parte, pero no todas, de estas pueden ser idénticas entre sí, o pueden ser diferentes entre sí.

Con respecto a las unidades de repetición de la gelatina recombinante, es preferible que una parte de una secuencia de aminoácidos de un colágeno que existe en la naturaleza sirva como la unidad, y que la gelatina recombinante se forme mediante la unión de dos o más de esta unidad. Los ejemplos preferibles del colágeno que existe en la naturaleza se denominan para incluir los colágenos de tipo I, tipo II, tipo III, tipo IV, y tipo V, y es más preferido que el colágeno sea un colágeno de tipo I, tipo II, o tipo III. Los ejemplos preferibles de fuentes de colágeno incluyen seres humanos, caballos, cerdos, ratones y ratas, y el ser humano es más preferido como la fuente de colágeno.

El punto isoeléctrico de la gelatina recombinante es preferentemente de 5 a 10, más preferentemente de 6 a 10, y aún más preferentemente de 7 a 9,5.

Los ejemplos preferidos de las características que debe tener la gelatina recombinante pueden incluir lo siguiente: (1) grupos carbamóilo que no están hidrolizados, (2) el procolágeno no está incluido, (3) los telopéptidos no están incluidos, y (4) la gelatina recombinante es un material de tipo colágeno prácticamente puro preparado usando un ácido nucleico que codifica un colágeno natural. La gelatina recombinante puede tener una de estas características preferidas (1) a (4), o puede tener una combinación de dos o más de estas características.

Desde el punto de vista del nivel de capacidad de reparación de tejidos, la gelatina recombinante es preferentemente cualquiera de (A) a (C) a continuación.

(A) Un polipéptido representado por la SEQ ID NO: 1 siguiente.

**GAP(GAPGLQGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGAPGLQGMP
GERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGERGAAGLPGPKGE
RGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKG
ERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPP)₃G (SEQ ID NO: 1)**

(B) Un polipéptido que incluye una secuencia parcial que tiene una identidad de secuencia del 80 % o superior con una secuencia de aminoácidos parcial formada desde el 4º hasta el 192º restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos (A), y que tiene la capacidad de regenerar un tejido.

(C) Un polipéptido que se ha formado a partir de una secuencia de aminoácidos que se puede obtener modificando la secuencia de aminoácidos (A) mediante delección, sustitución o adición de uno o más restos de aminoácidos, y que tiene la capacidad de regenerar un tejido.

Desde el punto de vista de la capacidad de regeneración de tejidos de la gelatina recombinante, la identidad de secuencia de (B) es preferentemente el 90 % o más, y es más preferentemente el 95 % o más.

La secuencia de aminoácidos parcial de (B) es una secuencia de aminoácidos parcial correspondiente a la unidad de repetición de la secuencia representada por la SEQ ID NO: 1. Cuando el polipéptido de (B) incluye porciones plurales que tienen una secuencia de aminoácidos parcial correspondiente a la unidad de repetición, el polipéptido puede incluir una, o preferentemente dos o más, unidades de repetición, teniendo cada una de ellas una identidad de secuencia del 80 % o más respecto de la unidad de repetición de la secuencia representada por la SEQ ID NO: 1.

El polipéptido definido en (B) incluye preferentemente una o más secuencias parciales, teniendo cada una de ellas

una identidad de secuencia del 80 % o más respecto de la secuencia de aminoácidos parcial correspondiente a la unidad de repetición de la secuencia representada por la SEQ ID NO: 1, en un número global de restos de aminoácidos del 80 % o más con respecto al número total de restos de aminoácidos.

- 5 La longitud del polipéptido definido por (B) se puede configurar a un número de restos de aminoácidos de 151 a 2260, y el número de restos de aminoácido es preferentemente 193 o más desde el punto de vista de la degradabilidad después de la reticulación, es preferentemente de 944 o menos desde el punto de vista de la estabilidad, y es más preferentemente de 380 a 756 restos de aminoácidos.
- 10 En el polipéptido definido por (C), el número de restos de aminoácidos que se eliminan, sustituyen, o se añaden, pueden ser un resto o varios restos. El número de restos de aminoácidos que se eliminan, sustituyen o añaden varía dependiendo del número total de restos de aminoácidos de la gelatina recombinante, y es, por ejemplo, de 2 a 15, preferentemente de 2 a 5.
- 15 La gelatina recombinante se puede producir por técnicas de recombinación genética conocidas de los expertos en la materia y, por ejemplo, se pueden producir según los métodos descritos en los documentos EP 1014176A2, US 6992172B1, y WO números 2004/85473A2 y 2008/103041A1.

- 20 La evaluación de la capacidad de regeneración de los polipéptidos definidos por (B) y (C) se puede se puede realizar usando un material para reparación de tejidos obtenido usando la gelatina recombinante. El método de evaluación varía con el tejido diana.

- 25 Por ejemplo, la capacidad de regeneración del hueso se puede evaluar mediante: producción de una zona con pérdida de hueso de un tamaño específico en el hueso parietal de una rata, rellenar con el material para reparación de tejidos el interior de la zona con pérdida de hueso y después suturar la piel, medir la cantidad de hueso cuatro semanas después del procedimiento quirúrgico usando microCT, y evaluar la capacidad de regeneración del hueso como la relación entre el volumen de hueso regenerado y el volumen de la zona con pérdida de hueso.

- 30 Los gránulos de gelatina preferentemente incluyen un producto reticulado de gelatina desde el punto de vista de poder mantener el volumen de la capa de preparación proporcionada en una zona con pérdida de hueso durante el periodo de tiempo necesario. Los ejemplos del producto reticulado incluyen un producto químicamente reticulado formado usando un agente de reticulación, y un producto térmicamente reticulado, y producto térmicamente reticulado es preferible desde el punto de vista de no utilizar un agente de reticulación. La inclusión del producto reticulado en los gránulos de gelatina se puede confirmar basándose en un estado en el que los gránulos de gelatina no se disuelven en agua caliente. En este caso, "no se disuelven en agua caliente" denota que la solubilidad en agua a 37 °C es 50 % en masa o menor.

- 35 En la presente memoria descriptiva, la expresión "capa de preparación" se refiere a una capa formada por la colocación del material para reparación de tejidos en un espacio específico, y, análogamente al término técnico "lecho de partículas", la capa de preparación se refiere a una estructura global que incluye tanto la pluralidad de partículas de la preparación que rellena un espacio específico, y los huecos entre las partículas de la preparación.

Gránulos de gelatina

- 45 Los gránulos de gelatina incluidos en el material para reparación de tejidos son partículas que atraviesan un tamiz que tiene aberturas de 4 mm. Desde el punto de vista de la invasión celular, los gránulos de gelatina son preferentemente las partículas que atraviesan un tamiz que tiene aberturas de 1400 µm, y más preferentemente partículas que atraviesan un tamiz que tiene aberturas de 1000 µm, y son más preferentemente, partículas que atraviesan un tamiz que tiene aberturas de 710 µm. Desde el punto de vista de mantener la elasticidad de la capa de preparación, los gránulos de gelatina son preferentemente partículas que permanecen en un tamiz que tiene aberturas de 75 µm tras el tamizado, y son más preferentemente partículas que permanecen en un tamiz que tiene aberturas de 300 µm tras el tamizado.

- 55 El tamizado de los gránulos de gelatina se realiza usando un tamiz de ensayo según la norma ISO 3310, y el método de tamizado se basa en el método de tamizado descrito en la Japanese Pharmacopoeia 16ª edición, sección 3.04, Segundo método. Concretamente, se realizan varias veces cinco minutos de agitación con intervalos entre medias, y el tamizado se completa cuando la masa de las partículas presentes en el tamiz después del tamizado resulta ser el 5 % o menos de la masa de las partículas situadas sobre el tamiz antes de la agitación. En la invención, la expresión "que atraviesa" denota que la masa de las partículas presentes en el tamiz al finalizar el tamizado es de un 10 % o menos de la masa total de las partículas antes del tamizado, y el término "permanece" denota que la masa de las partículas que permanecen en el tamiz al finalizar el tamizado es de un 95 % o más de la masa total de las partículas antes del tamizado.

- 65 Cuando la gelatina incluida en el material para reparación de tejidos es granulada en lugar de tener un cuerpo en forma de bloque (agrupado) o similar, se puede preparar y utilizar una solución de gelatina de alta densidad, y se puede garantizar una invasión celular hasta el centro de la zona de pérdida, incluso aunque el sustrato tenga una

densidad mayor. Debido a esta configuración, cuando el material para reparación de tejidos se coloca en la zona con pérdida para formar una capa de preparación, una excelente capacidad de regeneración del tejido, especialmente, capacidad de regeneración del hueso, se puede mostrar sin una disminución en el volumen de la capa de preparación, incluso bajo presión.

5 En la actualidad se están realizando progresos en la implementación de la medicina regenerativa para regenerar tejidos biológicos u órganos con funciones deterioradas, o pérdida de funciones, los gránulos de gelatina individuales del material para reparación de tejidos son preferentemente cuerpos porosos que tienen espacios. Desde el punto de vista de la invasión celular, existen preferentemente espacios entre las partículas de la capa de preparación
10 formada mediante la colocación de los gránulos de gelatina en la zona con pérdida, y la relación de huecos de la capa de preparación en su conjunto es preferentemente de 70 % al 96,5 %, y es más preferentemente de 80 % al 90 %. La relación de huecos se obtiene como una relación de huecos ($P = (1 - pt / pc) \times 100(\%)$) calculada a partir de una densidad compactada (pt) y una densidad verdadera (pc) del sólidos, que se describen a continuación. La densidad compactada (pt) se obtiene usando el método descrito a continuación. La densidad verdadera (pc) del sólido se obtiene con el método del picnómetro, usando un picnómetro de tipo Hubbart.

15 Los gránulos de gelatina individuales en el material para reparación de tejidos pueden tener orificios comunicantes. La presencia de orificios comunicantes permite que los espacios sean continuos desde el exterior del material para reparación de tejidos a la parte interior profunda del material para reparación de tejidos, de manera que las células en contacto con el exterior del material para reparación de tejidos puedan dispersarse o difundirse al interior del
20 material para reparación de tejidos. Para que se muestre la funcionalidad anterior, el diámetro del orificio de los orificios comunicantes está comprendido preferentemente de 10 µm a 2500 µm, más preferentemente de 50 µm a 2500 µm y especialmente preferentemente de 100 µm a 1000 µm.

Densidad compactada

25 La densidad compactada es un valor que representa la extensión a la cual los gránulos pueden empaquetarse densamente en un volumen dado. Cuanto más pequeño sea este valor, más compleja tiende a ser la estructura de los gránulos, más amplia tiende a ser la distribución del tamaño de los gránulos, y más disperso tiende a ser el medio. La forma de los gránulos obtenidos después de la pulverización varía por diferencias en la estructura de la
30 gelatina creada durante la congelación, y se obtienen varios tamaños de gránulos mediante la pulverización. Teniendo esto en cuenta, la densidad compactada, tal como se define en la presente memoria descriptiva, es preferentemente de 10 mg/cm³ a 500 mg/cm³, es más preferentemente de 30 mg/cm³ a 450 mg/cm³, es aún más preferentemente de 50 mg/cm³ a 420 mg/cm³, y es incluso más preferentemente de 140 mg/cm³ a 280 mg/cm³. Una densidad compactada de 10 mg/cm³ o más tiende a facilitar un aumento en la elasticidad de la capa de preparación,
35 y para facilitar el mantenimiento del volumen de la zona con pérdida. Una densidad compactada de 500 mg/cm³ o menos tiende a facilitar la supresión de una menor invasión de células, y a facilitar la obtención suficientes efectos de cicatrización.

40 El método utilizado para medir la densidad compactada es el siguiente. Un recipiente cilíndrico (denominado como tapón a partir de ahora en el presente documento) de 6 mm de diámetro y 21,8 mm de longitud (volumen de 0,616 cm²) se preparó para realizar la medición. En primer lugar, se mide la masa (wt) del tapón solo. A continuación, se conecta un embudo al tapón, y los gránulos se vierten en el tapón mediante el embudo de forma que los gránulos se recojan en el tapón. Después de verter una cantidad suficiente de gránulos, la parte del tapón se golpea contra un objeto duro, tal como una encimera, 200 veces, se retira el embudo, y los posible gránulos por encima del borde del
45 tapón se nivelan con una espátula, retirando el exceso. La masa (wg) se mide en un estado en el que los gránulos están completamente nivelados en el tapón. La masa de los gránulos solos se calcula a partir de la diferencia entre la masa del tapón en solitario, y la densidad compactada se obtiene dividiéndola por el volumen del tapón.

$$\text{Densidad compactada: } pt = (wg - wt) / 0,616$$

50 Absortividad del agua

El material para reparación de tejidos presenta una absortividad del agua del 800 % o más en masa. No se obtiene una capacidad de regeneración del tejido elevada si la absortividad del agua es menor del 800 %. Desde el punto de
55 vista de mantener coágulos de sangre durante la recuperación del tejido, la absortividad del agua del material para reparación de tejidos es preferentemente un 900 % o más, es más preferentemente 1200 % o más y aún más preferentemente 1400 % o más. Aunque sin ninguna limitación en particular, el valor máximo de la absortividad del agua del material para reparación de tejidos es preferentemente un 9900 % o menos, es más preferentemente 5000 % o menos, y aún más preferentemente un 3000 % o menos. Cuando solo se incluyen gránulos de gelatina en
60 el material para reparación de tejidos, la absortividad del agua del material para reparación de tejidos es la absortividad del agua de los gránulos de gelatina.

"Absortividad del agua" del material para reparación de tejidos en la invención se refiere a una característica física medida como se describe a continuación. La medición se realiza en una sala con una humedad relativa de 30 % al
65 60 %, preferentemente el 40 %, en un intervalo de temperatura de 21 °C a 26 °C, preferentemente a 25 °C.

La masa (A) se mide en una bolsa de malla hecha de nailon para medición (denominada en lo sucesivo como bolsa de malla) que tiene un tamaño de 3 cm x 3 cm y un espesor de 106 µm y que tiene una malla de 150 hebras en 2,54 cm, un diámetro de hebra de 6 µm, una abertura equivalente a 108 µm, y un área de abertura del 41 %. En el caso de un material para reparación de tejidos granulado, 15,0 (± 1,0) mg del mismo se pesan en la forma para colocación en la zona con defecto de tejido, sin procesamiento. En el caso de un material para reparación de tejidos en forma de bloque, se prepara una muestra del mismo en forma paralelepípeda rectangular con un tamaño de aproximadamente 1,5 mm x aproximadamente 2 mm x aproximadamente 12 mm, se mide la masa (B) del mismo, y la muestra se introduce en la bolsa de malla para medición. La bolsa de malla para medición se utiliza vacía sin introducir el material para reparación de tejidos como bolsa de malla blanco, y se mide la masa (C) de la misma. Se colocan pinzas sobre las caras superiores de ambas bolsas de malla, y las bolsas de malla se suspenden en vasos de precipitados de 100 ml que contenían 80 ml de agua ultrapura. Ambas bolsas de malla se sujetan en la posición en la que todo el material para reparación de tejidos de la bolsa quede humedecido con agua, y se deja durante dos horas o más tiempo. Después de pasar dos horas o más, se descarta el agua de los vasos de precipitados, y ambas bolsas de malla se extraen, ambas se cuelgan con el mismo ángulo de inclinación, y se dejan reposar durante 10 minutos para drenar el exceso de agua. A continuación, se miden la masa (D) de la bolsa de malla blanco, y la masa (E) de la bolsa de malla que contiene material para reparación de tejidos, y la absorptividad del agua se calcula usando la Ecuación (1) y la Ecuación (2) siguientes.

$$\text{Absorptividad del agua del blanco (F)} = D/C \quad \dots (1)$$

$$\text{Absorptividad del agua} = (E-A \times F)/B \times 100 (\%) \quad \dots (2)$$

La absorptividad del agua del material para reparación de tejidos varía dependiendo de los componentes incluidos en el material para reparación de tejidos, especialmente, los tipos de gránulos de gelatina y la forma de los gránulos de gelatina individuales. La absorptividad del agua del material para reparación de tejidos se puede regular, por ejemplo, dependiendo de la temperatura, tiempo de procesamiento o similar durante el proceso de congelación o el proceso de reticulación en el método de fabricación del material para reparación de tejidos descrito a continuación. En general, la absorptividad del agua tiende a aumentar a medida que aumenta la temperatura de del proceso de congelación, disminuye la temperatura de reticulación, o se acorta el tiempo de reticulación.

Degradabilidad al ácido

El material para reparación de tejidos presenta una relación residual del 60 % en masa o menos después de tres horas de tratamiento de descomposición usando 1 mol/l (litro) de ácido clorhídrico. La capacidad de regeneración del tejido no es suficiente cuando la relación residual es superior al 60 % en masa después de tres horas de tratamiento de descomposición usando 1 mol/l de ácido clorhídrico. Desde los puntos de vista de mantener el volumen de la capa de preparación en la zona del defecto, y la sustitución por un tejido en regeneración, la relación residual del material para reparación de tejidos en presencia del ácido es preferentemente del 5 % en masa o más, es más preferentemente del 20 % en masa o más, y es aún más preferentemente del 40 % en masa o más. Cuando el material para reparación de tejidos incluye solo gránulos de gelatina, la relación residual del material para reparación de tejidos en presencia del ácido es la relación residual de los gránulos de gelatina en presencia del ácido.

La "relación residual en presencia de ácido" del material para reparación de tejidos de acuerdo con la invención se refiere a un valor de la característica física medido como se describe a continuación. Se mide la masa (A) de un microtubo de medición (nombre comercial MINI SUPERTUBE, fabricado por Ibis, capacidad 2 ml, denominado como tubo en lo sucesivo). En el caso de un material de reparación granulado, 5,0 (± 0,2) mg del mismo se pesan en la forma para colocación en la zona con defecto de tejido, sin procesamiento. En el caso de un material para reparación en forma de bloque, se prepara una muestra cilíndrica que tiene un tamaño de 6 mm de diámetro x aproximadamente 1 mm de espesor, se mide la masa del mismo (B), y la muestra se introduce en el tubo para su medición. A continuación se añaden 1,0 ml de 1 mol/l de HCl al tubo que contiene el material para reparación de tejidos, y se agita en un agitador termostático (un HB-80 (fabricado por Taitec Corporation) con un movimiento de vaivén con 60 movimientos alternativos por minuto) a 37 °C durante tres horas. Transcurrido el tiempo estipulado, el tubo se guarda sobre hielo para detener las reacciones, y después se centrifuga a 10.000xg durante un minuto en una centrifuga preconfigurada a 4 °C. La precipitación del material para reparación de tejidos se confirma, el sobrenadante se elimina por succión, 1 ml de agua ultrapura, previamente enfriada sobre hielo, se añade a lo anterior, y se vuelve a realizar la centrifugación en las mismas condiciones que anteriormente. El sobrenadante se elimina por succión, se vuelve a añadir agua ultrapura, y se vuelve a realizar la centrifugación en las mismas condiciones que anteriormente. A continuación, el sobrenadante se elimina por succión, a continuación se realiza el criodesecado. Una vez que el tubo se extrae del aparato de criodesecado, el tapón del tubo se cierra rápidamente para evitar que el material para reparación de tejidos absorba la humedad del aire. La masa (C) del tubo que incluye su contenido se mide, y la relación residual en presencia de ácido se calcula usando la Ecuación de cálculo (3) siguiente.

$$\text{Relación residual en presencia de ácido} = (C - A)/B \times 100 (\%) \dots (3)$$

La relación residual del material para reparación de tejidos en presencia de ácido varía dependiendo de los

componentes incluidos en el material para reparación de tejidos, especialmente, el tipo y la forma de los gránulos de gelatina. La residual ratio del material para reparación de tejidos en presencia de ácido se puede regular, por ejemplo, dependiendo de la temperatura, el tiempo de procesamiento o similar durante el proceso de reticulación en el método de fabricación del material para reparación de tejidos descrito a continuación. En general, la relación residual en presencia de ácido tiende a ser menor cuando el tiempo de procesamiento del proceso de reticulación es más corto.

Otros componentes

Además de los gránulos de gelatina, el material para reparación de tejidos puede incluir otros componentes que pueden contribuir a la reparación o reparación de un tejido. Los ejemplos de dichos componentes adicionales incluyen componentes relacionados con la regeneración del hueso, u osteoneogénesis, tales como factores osteoinductivos. Los ejemplos de agentes osteoinductivos incluyen, aunque no de forma limitativa, proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF).

Método para fabricar el material para reparación de tejidos

Siempre que el material para reparación de tejidos incluya gránulos de gelatina y presente la absortividad del agua y la relación residual en presencia de ácido especificadas anteriormente mencionadas, el método utilizado para fabricar el mismo no está especialmente limitado. El material para reparación de tejidos se puede obtener, por ejemplo, por el método siguiente.

Un método para fabricar un material para reparación de tejidos incluye:

- (a) preparar una solución de gelatina que incluye gelatina disuelta en un medio acuoso (denominada en lo sucesivo como proceso de preparación de la solución de gelatina);
- (b) obtener un producto criodesecado mediante criodesecación de la solución de gelatina (denominado en lo sucesivo como proceso de criodesecación);
- (c) obtener un producto pulverizado mediante la pulverización del producto de gelatina criodesecado (denominado en lo sucesivo como proceso de pulverización); y
- (d) obtener un sustrato mediante reticulación del producto pulverizado (denominado en lo sucesivo como proceso de reticulación).

El medio acuoso en la solución de gelatina preparado en el proceso de preparación de la solución de gelatina no está especialmente limitado siempre que el medio acuoso pueda disolver la gelatina y sea útil con respecto a un tejido biológico. Los ejemplos del medio acuoso incluyen soluciones habitualmente utilizadas en este campo, tal como agua, solución salina fisiológica y soluciones de tampón fosfato.

El contenido de gelatina en la solución de gelatina no está especialmente limitado siempre que el la gelatina sea soluble a dicho contenido. Por ejemplo, el contenido de gelatina en la solución de gelatina es preferentemente del 0,5 % en masa al 20 % en masa, es más preferentemente de 2 % en masa al 16 % en masa, y es aún más preferentemente de 4 % en masa al 12 % en masa. Existe una tendencia hacia el aumento de la resistencia cuando el contenido es de un 0,5 % en masa o más, y una estructura de malla que tiene una elevada uniformidad tiende a formarse más fácilmente y la capacidad de regeneración del tejido tiende a ser excelente cuando el contenido es un 20 % en masa o menos.

En el proceso de preparar la solución de gelatina, la gelatina se prepara como materia prima, y la preparación se lleva a cabo disolviendo la gelatina en el medio acuoso. La gelatina como materia prima puede estar en forma pulverulenta, o puede estar en forma sólida. La solución de gelatina puede ser una solución de gelatina previamente preparada.

La temperatura utilizada cuando se prepara la solución de gelatina no está especialmente limitada, y puede ser una temperatura utilizada normalmente, por ejemplo, de 0°C a 60 °C, y es preferentemente de aproximadamente 3 °C a aproximadamente 30 °C.

En caso necesario, la solución de gelatina puede incluir componentes necesarios para los procesos descritos a continuación, tal como un agente de reticulación, y componentes útiles para transmitir características específicas al material para reparación de tejidos.

Cuando se desea obtener gránulos de gelatina que tienen espacios, es preferible proporcionar un proceso, antes del proceso de criodesecado, en el que la solución de gelatina se enfríe a una temperatura que sea igual o inferior a la temperatura de formación de cristales de hielo.

Cuando se proporciona este proceso, se puede obtener un producto intermedio que contiene gelatina que contiene cristales de hielo del tamaño adecuado. La formación de cristales de hielo produce no uniformidad con respecto a la densidad de las cadenas peptídicas de la gelatina cuando el producto intermedio que contiene gelatina se solidifica

y, por lo tanto, se forman espacios en la malla del producto intermedio que contiene gelatina tras la eliminación de los cristales de hielo. La eliminación de los cristales de hielo se lleva a cabo fácilmente mediante el proceso de criodesecado a realizar posteriormente. El tamaño de poro en la malla del producto intermedio que contiene gelatina se puede regular mediante la temperatura de los cristales de hielo, tiempo de enfriamiento, o una combinación de los mismos.

La temperatura de formación de cristales de hielo se refiere a una temperatura a la cual al menos una parte de la solución de gelatina se congela. Aunque la temperatura de formación de cristales de hielo varía dependiendo de la concentración de sólidos, incluida la gelatina, en la solución de gelatina, la temperatura de formación de cristales de hielo puede configurarse en general a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ o menos. La solución de gelatina se enfría preferentemente a una temperatura de $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, más preferentemente de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, y más preferentemente de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cuando la temperatura de formación de cristales de hielo es $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ o mayor, el tamaño de mata tiende a ser suficientemente grande, y cuando la temperatura de formación de cristales de hielo es $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ o menor, la uniformidad de los tamaños de poro de la malla del producto intermedio que contiene gelatina tiende a ser alta, y tiene tendencia a posibilitar una elevada capacidad para regenerar hueso.

Desde el punto de vista de facilitar la formación de cristales de hielo uniformes, el tiempo para mantener la solución de gelatina a una temperatura igual o menor que la temperatura de formación de cristales de hielo es preferentemente de 1 hora a 6 horas.

El producto intermedio que contiene gelatina tiene una estructura de malla que se puede obtener realizando el tratamiento a la temperatura de formación de cristales de hielo. La expresión "estructura de malla", en la presente memoria descriptiva, se refiere a una estructura que incluye muchos espacios internos, y no está limitada a estructuras planas. Por otra parte, el alcance de la estructura de malla incluye estructuras en las que el marco tiene forma de pared, así como estructuras en las que el marco es fibroso. Por otra parte, el alcance de la estructura de malla se refiere a la estructura del marco formado por el material que contiene gelatina, pero no abarca estructuras a nivel molecular, tales como las fibras de colágeno.

"Tener una estructura de malla" denota que se forman espacios del orden de micrómetros o mayores debido a la estructura en forma de pared formada en un material que contiene gelatina, concretamente, que la estructura tiene un diámetro de orificio de $1\text{ }\mu\text{m}$ o más.

Aunque sin ninguna limitación en particular, la forma de la malla en el producto intermedio que contiene gelatina puede ser una estructura bidimensional tal como un panal de abeja, o puede ser una estructura tridimensional como la del hueso trabecular. La forma de la sección transversal de la malla puede ser poligonal, circular, o elíptica. La forma tridimensional de la malla en el producto intermedio que contiene gelatina puede ser una forma de pilar o una forma globular.

En el producto intermedio que contiene gelatina pueden estar presentes orificios comunicantes formados por espacios continuos. Cuando hay orificios comunicantes, se forman espacios continuos que se extienden desde el exterior del producto intermedio que contiene gelatina hacia el interior profundo del producto intermedio que contiene gelatina. Cuando dichas conexiones entre orificios están presentes, las células pueden dispersarse o difundirse hacia el interior del material poroso cuando las células entran en contacto con el exterior del material para reparación de tejidos formado a partir del producto intermedio que contiene gelatina. Los orificios comunicantes tienen preferentemente un diámetro de orificio de $10\text{ }\mu\text{m}$ o más, para que dicha funcionalidad esté presente.

El diámetro de orificio de la malla del producto intermedio que contiene gelatina se evalúa como el diámetro promedio a lo largo de la dirección del eje mayor (diámetro según el eje mayor). El diámetro según el eje mayor promedio se evalúa de la siguiente forma.

En primer lugar, un producto intermedio seco obtenido una vez que el producto intermedio que contiene gelatina se ha secado se corta según las direcciones horizontal y vertical. A continuación, cada cara de la sección transversal se tiñe poniéndola en contacto cercano con una almohadilla de tinción, y una región de $2,0\text{ mm} \times 2,0\text{ mm}$ de la misma se examina usando un microscopio óptico. De entre los rectángulos que circunscriben un área de la región observada rodeada por el material teñido (una abertura de malla), se selecciona el rectángulo circunscriptor cuya distancia entre dos caras opuestas del rectángulo sea más grande. Se realizan 50 mediciones en el área observada para cada sección transversal en dirección horizontal y sección transversal en dirección vertical, con respecto a la longitud de la cara larga del rectángulo circunscriptor para el cual la distancia entre dos caras opuestas es la más grande, y el valor promedio de la misma se toma como el valor promedio del diámetro según el eje mayor de la malla del producto intermedio que contiene gelatina.

El valor promedio del diámetro según el eje mayor en la sección transversal en dirección horizontal y el valor promedio del diámetro según el eje mayor en la sección transversal en dirección vertical se obtienen a partir de mediciones de las aberturas de malla individuales, y el valor más pequeño de las mismas se denota como $d1$ y el otro valor se denota como $d2$, y el cociente $d2/d1$ se denomina relación de aspecto de la malla. Una relación de aspecto de la malla de 1 a 3 representa una forma "globular", y una relación de aspecto de la malla fuera de este

intervalo representa una "forma de pilar".

5 Cuando la forma de la malla es una forma de pilar (cuando la relación de aspecto de la malla está fuera del intervalo de 1 a 3), la relación de aspecto de la malla es preferentemente 4 o 5 desde el punto de vista de la adhesión del hueso. La adhesión del hueso tiende a aumentar cuando la relación de aspecto de la malla es 5 o menos.

La forma de la malla es preferentemente globular (una relación de aspecto de la malla de 1 a 3) desde el punto de vista de la capacidad de reparación de tejidos.

10 Cuando la forma de la malla es una forma de pilar, el diámetro de orificio de la malla en el producto intermedio que contiene gelatina es preferentemente 10 μm o más, es más preferentemente 50 μm o más, y es aún más preferentemente 100 μm o más, desde el punto de vista de la adhesión del hueso. Aunque sin ninguna limitación en particular, el límite superior del diámetro de orificio en la malla del producto intermedio que contiene gelatina es preferentemente 2500 μm o menos, y es más preferentemente 1000 μm o menos, desde el punto de vista de la estabilización de la resistencia del material.

15 Las células tienden a invadir fácilmente el interior de la estructura de la malla cuando el diámetro a lo largo de la dirección del eje mayor es 10 μm o más, y la afinidad con los cuerpos biológicos tiende a aumentar cuando el diámetro a lo largo del la dirección del eje mayor es 2500 μm o menos.

20 Cuando la malla tiene forma globular, el diámetro de orificio en la malla del producto intermedio que contiene gelatina es preferentemente 10 μm o más, es más preferentemente 50 μm o más, y es aún más preferentemente 100 μm o más, desde el punto de vista de la adhesión del hueso. Aunque sin ninguna limitación en particular, el límite superior del diámetro de orificio en la malla del producto intermedio que contiene gelatina es preferentemente, por lo general, de 2500 μm o menos y, desde el punto de vista de la adhesión del hueso, el límite superior del diámetro de orificio en la malla del producto intermedio que contiene gelatina es preferentemente 1000 μm o menos.

25 Cuando la forma de la malla es globular, las células tienden a invadir fácilmente el interior de la estructura de la malla cuando el diámetro de orificio de la malla (e diámetro en la dirección del eje mayor cuando la relación de aspecto es mayor de 1) es 10 μm o más, y la afinidad con los cuerpos biológicos tiende a ser mayor cuando el diámetro de orificio de la malla es 2500 μm o menos.

30 La relación de huecos en el producto intermedio que contiene gelatina es preferentemente de 80 % al 99,99 %, y es más preferentemente de 95,01 % al 99,9 %. La relación de huecos se obtiene como relación de huecos ($P = (1 - p / pc) \times 100 (\%)$) a partir de la densidad aparente (p) y la densidad verdadera (pc). La densidad aparente (p) se calcula a partir de la masa seca y el volumen, y la densidad verdadera (pc) se obtiene según el método del picnómetro usando un picnómetro de tipo Guy-Lussac.

35

En el proceso de criodesecación, se obtiene un producto criodesecado mediante criodesecación de la solución de gelatina. Cuando se lleva a cabo el proceso de formación de cristales de hielo en la solución de gelatina, el producto intermedio que contiene gelatina se puede someter a criodesecación tal cual.

40 Las condiciones habitualmente utilizadas en la criodesecación de proteínas se pueden aplicar como condiciones de criodesecación. La duración de la criodesecación puede ser, por ejemplo, de 0,5 horas a 300 horas. No existen limitaciones específicas para los aparatos de criodesecación que se pueden utilizar.

45 En el proceso de pulverización, se obtiene un producto pulverizado por pulverización del producto de gelatina criodesecado. El producto pulverizado obtenido se puede incluir como gránulos de gelatina en el material para reparación de tejidos. En la pulverización, se puede usar una máquina de pulverización tal como un molino de martillos o un molino de tamiz, y se prefiere un molino de tamiz (por ejemplo, un COMIL, fabricado por Quadro Engineering Corp.), teniendo en cuenta que el uso de un molino de tamiz proporciona pequeñas variaciones en el tamaño de partícula entre los ensayos, porque se recogen los productos pulverizados que se han pulverizado hasta un grano dado. Para mantener la estructura de la superficie del producto pulverizado, un método de corte es más preferible que un método de trituración para las condiciones de pulverización. Para mantener la estructura interna de los gránulos, es preferible un método que no aplique compresión fuerte durante la pulverización.

50 Se puede incluir un proceso de clasificación después del proceso de pulverización, de forma que se regulen los tamaños de grano. Cuando se incluye el proceso de clasificación, se puede obtener un producto de gelatina pulverizada que tenga diámetros de partícula uniformes. En la clasificación, se utiliza preferentemente un tamiz que tiene aberturas de, por ejemplo, de 300 μm a 710 μm .

55 Un proceso de reticulación en el que la gelatina del producto pulverizado obtenido se reticula se incluye preferentemente después del proceso de pulverización. Puede utilizarse un método de reticulación preferido para la reticulación, tal como la reticulación térmica, reticulación mediante enzimas, reticulación usando varios agentes de reticulación químicos, o reticulación mediante UV. La reticulación usando un agente de reticulación química, o la reticulación térmica, es preferible como método de reticulación. Un producto con una estructura de orden superior debido a al menos uno de interacción hidrófoba, enlace de hidrógeno, o interacciones iónicas, es preferible además de las reticulaciones (enlaces covalentes).

60

65

Cuando la reticulación se realiza mediante una enzima, la enzima no está especialmente limitada siempre que la enzima produzca la reticulación entre materiales biodegradables. La reticulación se realiza preferentemente usando transglutaminasa o lacasa, lo más preferentemente transglutaminasa.

5 En la invención, la temperatura de mezclado cuando la gelatina se trata con un agente de reticulación tal como un aldehído o un agente de condensación no está especialmente limitada siempre que la solución se pueda agitar de manera uniforme, y la temperatura está especialmente comprendida de 0 °C a 40 °C, más preferentemente de 0 °C a 30 °C, más preferentemente de 3 °C a 25 °C, más preferentemente de 3 °C a 15 °C, más preferentemente de 3 °C a 10 °C, y especialmente preferentemente de 3 °C a 7 °C.

15 La temperatura se puede aumentar después de mezclar con el agente de reticulación y la agitación. Aunque la temperatura de reacción no está especialmente limitada siempre que tenga lugar la reticulación, al considerar la desnaturalización o la descomposición de la gelatina, la temperatura de reacción puede ser de 0 °C a 60 °C en la práctica, es más preferentemente de 0 °C a 40 °C, es más preferentemente de 3 °C a 25 °C, es más preferentemente de 3 °C a 15 °C, es aún más preferentemente de 3 °C a 10 °C, y es especialmente preferentemente de 3 °C a 7 °C.

20 En el caso de un método de reticulación usando un agente de reticulación química, la reticulación se lleva a cabo más preferentemente usando un glutaraldehído como agente de reticulación química. En el caso de adoptar un método de reticulación usando un método de reticulación química, la reticulación se puede llevar a cabo antes del proceso de secado, mediante la adición del agente de reticulación química a la solución de gelatina.

25 La temperatura de reticulación aplicada al método de reticulación química es preferentemente de 100 °C a 200 °C, es más preferentemente de 120 °C a 170 °C, y es aún más preferentemente de 130 °C a 160 °C. El uso de los agentes de reticulación se puede evitar mediante la aplicación del método de reticulación térmica.

30 La duración del tratamiento de la reticulación térmica varía dependiendo de la temperatura de reticulación, el tipo de gelatina, y el grado deseado de capacidad de descomposición. Por ejemplo, las condiciones de reticulación térmica, cuando se utiliza CBE3 como gelatina recombinante derivada de ser humano, como en los ejemplos que se describen posteriormente, son las siguientes. Cuando la temperatura real del tratamiento es de aproximadamente 136 °C, la duración del tratamiento es preferentemente de 2 horas a 20 horas, más preferentemente de 3 horas a 18 horas, y aún más preferentemente de 5 horas a 8 horas. El proceso de reticulación térmica se lleva a cabo preferentemente a presión reducida, un vacío o en una atmósfera de gas inerte desde la perspectiva de prevenir la oxidación. La presión se reduce preferentemente a 4 hPa o menos. El nitrógeno es preferible como el gas inerte, y la reticulación bajo una atmósfera de gas inerte es más preferible que al vacío desde el punto de vista del calentamiento uniforme. El medio de calentamiento no está especialmente limitado, y los ejemplos de los mismos incluyen un horno de vacío tal como un DP-43 fabricado por Yamato Scientific Co., Ltd.

40 El material para reparación de tejidos puede incluir gránulos de gelatina obtenidos según el método de fabricación descrito en solitario, o se puede obtener por composición con otros componentes con los gránulos de gelatina.

45 Desde el punto de vista de una elevada capacidad para regenerar un tejido, por ejemplo, elevada capacidad para regenerar hueso, el método para fabricar un material para reparación de tejidos incluye preferentemente obtener un producto criodesecado de gelatina realizando un tratamiento de criodesecación tras enfriar la solución de gelatina que incluye gelatina desde 7 % en masa al 9 % en masa hasta una temperatura de -40 °C a -60 °C durante de 1 hora a 6 horas, obteniendo un producto pulverizado mediante pulverización del producto criodesecado, y reticular térmicamente el producto pulverizado de 140 °C a 160 °C bajo atmósfera de nitrógeno durante de 3 horas a 7 horas, en el caso del CBE3 anteriormente descrito, que es una gelatina recombinante derivada de ser humano, o reticulando térmicamente el producto pulverizado de 140 °C a 160 °C bajo atmósfera de nitrógeno durante de 24 horas a 72 horas, en el caso de la gelatina de cerdo.

Método terapéutico y método de reparación

55 La invención puede proporcionar un material para reparación de tejidos con elevada capacidad para regenerar un tejido. Por lo tanto, el ámbito de la invención incluye un método para reparar un tejido, y un método para tratar una enfermedad o similar acompañado de daño tisular.

60 Específicamente, un método para reparar un tejido de acuerdo con la invención incluye aplicar el material para reparación de tejidos a un sitio en el que hay un defecto de tejido diana o está dañado, e incluye otros procesos en caso necesario.

65 El tejido que el material para reparación de tejidos de acuerdo con la invención es capaz de reparar es hueso. El material para reparación de tejidos es bien adecuado como sustrato para la regeneración del hueso. El material para reparación de tejidos de acuerdo con la invención se puede utilizar como agente terapéutico por sí mismo en la regeneración del hueso. La enfermedad a la que se aplica este agente terapéutico no está especialmente limitada,

siempre que la enfermedad requiera la regeneración del hueso, u osteoneogénesis, para su tratamiento.

5 El método para tratar un tejido dañado o el método para reparar un tejido dañado de acuerdo con la invención incluye aplicar el material para reparación de tejidos a un sitio en el que hay un defecto de tejido diana o está dañado, e incluye otros procesos en caso necesario. Los ejemplos de otros procesos incluyen aplicar una célula para trasplante y/o un agente osteoinductor a un sitio de aplicación del material para reparación de tejidos, bien antes, después, o simultáneamente con la aplicación del material para reparación de tejidos.

10 El método de tratamiento o el método para reparación se puede aplicar preferentemente a defectos periodontales, defectos de implantes, y similares, en la región maxilofacial, métodos GBR, métodos de aumento de arista, métodos de elevación de seno, y métodos de reserva de cavidades, que se utilizan como tratamientos suplementarios durante la colocación de implantes, y similares.

15 Material para reparación de tejidos en forma de bloque

El material para reparación de tejidos de acuerdo en forma de bloque con la invención incluye gelatina, y es un material para reparación de tejidos que presenta una absortividad del agua del 800 % en masa o más, y una relación residual del 60 % en masa o menos después de tres horas de tratamiento de descomposición usando 1 mol/l de ácido clorhídrico. Este material para reparación de tejidos permite una excelente regeneración de la dermis.

20 Por consiguiente, el material para reparación de tejidos de acuerdo en forma de bloque con la invención se aplica a la regeneración de la dermis.

25 Las características preferibles, intervalos numéricos, y similares para cada componente del material para reparación de tejidos en forma de bloque son los mismos que para el material para reparación de tejidos que incluye gránulos de gelatina.

30 El material para reparación de tejidos en forma de bloque se puede fabricar de la misma forma que en el método de fabricación de un material para reparación de tejidos que incluye gránulos de gelatina, salvo que el proceso de pulverización no se realice.

La descripción detallada sigue va seguida por ejemplos relativos a la invención; sin embargo, la invención no está limitada en forma alguna a estos ejemplos.

35 **Ejemplo 1**

Se fabricó un sustrato para regeneración del hueso del Ejemplo 1 usando el péptido recombinante CBE3 como gelatina recombinante.

40 Se empleó lo siguiente como CBE3 (tal como se describe en el documento WO2008/103041A1).
CBE3

Peso molecular: 51,6 KD

Estructura: GAP [(GXY)₆₃]₃G

Número de restos de aminoácidos: 571 unidades

45 Secuencia RGD: 12 unidades

Contenido en iminoácidos: 33 %

Aproximadamente el 100 % de los aminoácidos participan en las estructuras de repetición GXY.

Los restos de serina, restos de treonina, restos de asparagina, restos de tirosina, y los restos de cisteína no están incluidos en la secuencia de aminoácidos del CBE3.

50 El CBE3 incluye una secuencia ERGD.

Punto isoeléctrico: 9,34

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1)

GAP(GAPGLQGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGAPGLQGMP
GERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGERGAAGLPGPKGE
55 RGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGPAGAPGAPGLQGMPGERGAAGLPGPKG
ERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPP)₃G

60 Explicación del recipiente utilizado durante la congelación

Se preparó un recipiente de aluminio en forma de una taza cilíndrica con un espesor de 1 mm y un diámetro de

47 mm. Cuando la cara curvada de la copa cilíndrica se toma como la cara lateral, la cara lateral está formada por 1 mm de aluminio, y la cara inferior (una placa circular plana) también está formada por 1 mm de aluminio. Sin embargo, la cara superior se deja abierta. Solamente la cara lateral de la cara interna está uniformemente revestida con TEFLON (marca comercial registrada) con un espesor de 1 mm, como resultado de lo cual, el diámetro interno del cilindro es de 45 mm. Este recipiente se denomina en lo sucesivo como recipiente cilíndrico.

Aproximadamente 4 ml de una solución acuosa de gelatina que incluía gelatina recombinante al 8 % en masa se vertió dentro del recipiente cilíndrico, y se dejó reposar en un congelador (un congelador de temperatura ultrabaja RS-U30T fabricado por Hitachi Ltd.) a -50 °C durante 1 hora o más, mediante lo cual se obtuvo una gelatina congelada. Este bloque de gelatina se criodesecó (usando un TF5-85ATNNN fabricado por Takara Bio Inc.), se pulverizó usando un pulverizador (un COMIL U5 fabricado por Quadro Engineering Corp.), y a continuación una fracción del mismo que pasaba por un tamiz que tenía aberturas de 710 µm, pero que no pasaba por un tamiz que tenía aberturas de 500 µm, se recogió. Estos gránulos de gelatina obtenidos se trataron durante 3,5 horas a 130 °C bajo atmósfera de nitrógeno (usando un DP-43 fabricado por Yamato Scientific Co., Ltd.), obteniendo de este modo la Muestra 1.

La absorptividad del agua, relación residual en presencia de ácido, y relación de regeneración del hueso de la Muestra 1 se evaluaron de la siguiente forma.

20 (1) Absortividad del agua

El siguiente ensayo se realizó a 25 °C en una humedad relativa del 30 %.

La masa (A) se midió en una bolsa de malla de 3 cm x 3 cm para medición fabricada en nailon y que tiene un espesor de 106 µm, estando formada la bolsa de malla por una malla que tiene 150 hebras por 2,54 cm, un diámetro de hebra de 6 µm, una abertura equivalente a 108 µm, y un área de abertura del 41 %, y donde esta bolsa de malla se denomina en lo sucesivo como "bolsa de malla". La Muestra 1 se pesó para dar 15,0 (± 1,0) mg (B), y se introdujo en la bolsa de malla para medición. Una bolsa de malla para medición vacía, en la que no se introdujo la Muestra 1, se usó como la bolsa de malla de blanco, y se midió la masa de la misma (C). Se colocaron pinzas sobre las caras superiores de ambas bolsas de malla, y las bolsas de malla se suspendieron en vasos de precipitados de 100 ml que contenían 80 ml de agua ultrapura. Ambas bolsas de malla se sujetaron en la posición en la que toda la Muestra 1 de la bolsa de malla queda humedecido con agua, y se dejó durante dos horas o más tiempo. A continuación, después de pasar dos horas o más, se descartó el agua de los vasos de precipitados, y ambas bolsas de malla se extrajeron y se colgaron con el mismo ángulo de inclinación, y se dejaron reposar durante 10 minutos para drenar el exceso de agua. A continuación, se midieron la masa (D) de la bolsa de malla blanco, y la masa (E) de la bolsa de malla que contiene la Muestra 1, y se calculó la absorptividad del agua usando la Ecuación (1) y la Ecuación (2) siguientes. Los resultados se indican en la Tabla 1.

$$40 \quad \text{Absortividad del agua del blanco (F) = D/C} \quad \dots (1)$$

$$\text{Absortividad del agua} = (E-A \times F)/B \times 100 (\%) \quad \dots (2)$$

(2) Relación residual en presencia de ácido

45 El siguiente ensayo se realizó a 25 °C con una humedad relativa del 30 %. Se midió la masa (A) de un microtubo de medición (denominado en lo sucesivo como tubo). 5,0 (± 0,2) mg (B) de Muestra 1 se pesaron y se introdujeron en el tubo para su medición. 1,0 ml de HCl a una concentración de 1 mol/l se añadieron a continuación al tubo que contenía la Muestra 1, y se agitó en un agitador termostático (un HB-80 fabricado por Taitec Corporation, con un movimiento de vaivén con 60 movimientos alternativos por minuto) a 37 °C durante tres horas. Transcurrido el tiempo estipulado, el tubo se guardó sobre hielo para detener las reacciones, y después se centrifuga a 10.000xg durante un minuto en una centrífuga preconfigurada a 4 °C. La precipitación de la Muestra 1 se confirmó, el sobrenadante se eliminó por succión, 1 ml de agua ultrapura, que se había enfriado previamente sobre hielo, se añadió al anterior, y se repitió la centrifugación en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente. El sobrenadante se eliminó por succión, se volvió a añadir agua ultrapura, y se volvió a realizar la centrifugación en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente. El sobrenadante se retiró seguidamente por succión, y se llevó a cabo la criodesecación. El tapón del tubo se cerró rápidamente tras extraer el tubo del aparato de criodesecado, para evitar que la Muestra 1 absorbiere humedad del aire. La masa (C) del tubo, incluido el contenido del mismo, se determinó, y se calculó la relación residual en presencia del ácido usando la Ecuación de cálculo (3) siguiente. Los resultados se enumeran en la Tabla 1.

$$60 \quad \text{Relación residual en presencia de ácido} = (C - A) / B \times 100 (\%) \dots (3)$$

(3) Evaluación de la regeneración del hueso

65 Una zona con pérdida de hueso en forma circular con un diámetro de 5 mm se practicó en el hueso parietal de una rata SD (macho, de 10 a 12 semanas de edad, de 0,3 a 0,5 kg), aproximadamente 3,6 mg de la Muestra 1 se

introdujeron en la zona con pérdida de hueso producida, y después se realizó la sutura. La cantidad de hueso en el hueso parietal de la rata se midió usando microCT dos semanas y cuatro semanas después de la intervención. El cociente entre el volumen óseo en la zona con pérdida de hueso y el volumen de la zona con pérdida se tomó como la relación de regeneración del hueso. Los resultados se enumeran en la Tabla 1.

5

Ejemplo 2

Aproximadamente 4 ml de una solución acuosa de gelatina que incluía la gelatina recombinante descrita en el Ejemplo 1 al 7,5 % en masa se vertió dentro del recipiente cilíndrico, y se dejó reposar en un congelador (un congelador de temperatura ultrabaja RS-U30T fabricado por Hitachi Ltd.) a -40 °C durante 1 hora o más, mediante lo cual se obtuvo una gelatina congelada. Este bloque de gelatina se criodesecó (usando un TF5-85ATNNN fabricado por Takara Bio Inc.), se pulverizó usando un pulverizador (un COMIL U5 fabricado por Quadro Engineering Corp.), y a continuación una fracción del mismo que pasaba por un tamiz que tenía aberturas de 1400 µm, pero que no pasaba por un tamiz que tenía aberturas de 300 µm, se recogió. La fracción recogida se trató a 130 °C durante 6 horas bajo atmósfera de nitrógeno (usando un DP-43 fabricado por Yamato Scientific Co., Ltd.), obteniendo de este modo la Muestra 2.

10

15

La absorptividad del agua, relación residual en presencia de ácido, y relación de regeneración del hueso de la Muestra 2 se evaluaron de la misma forma que en el Ejemplo 1. Los resultados se enumeran en la Tabla 1.

20

Ejemplo 3

Aproximadamente 4 ml de una solución acuosa de gelatina que incluía la gelatina recombinante descrita en el Ejemplo 1 al 8 % en masa se vertió dentro del recipiente cilíndrico, y se dejó reposar en un congelador (un congelador de temperatura ultrabaja RS-U30T fabricado por Hitachi Ltd.) a -50 °C durante 1 hora o más, mediante lo cual se obtuvo una gelatina congelada. Este bloque de gelatina se criodesecó (usando un TF5-85ATNNN fabricado por Takara Bio Inc.), se pulverizó usando un pulverizador (un COMIL U5 fabricado por Quadro Engineering Corp.), y a continuación una fracción del mismo que pasaba por un tamiz que tenía aberturas de 710 µm, pero que no pasaba por un tamiz que tenía aberturas de 500 µm, se recogió. La fracción recogida se trató a 130 °C durante 7 horas bajo atmósfera de nitrógeno (usando un DP-43 fabricado por Yamato Scientific Co., Ltd.), obteniendo de este modo la Muestra 3.

25

30

La absorptividad del agua, relación residual en presencia de ácido, y relación de regeneración del hueso de la Muestra 3 se evaluaron de la misma forma que en el Ejemplo 1. Los resultados se enumeran en la Tabla 1.

35

Ejemplo 4

Aproximadamente 4 ml de una solución acuosa de gelatina que incluía gelatina de cerdo (Nippi High Grade Gelatin® APAT fabricada por Nippi Inc.) al 7,5 % en masa se vertió en el recipiente cilíndrico, y se dejó reposar en un congelador (un congelador de temperatura ultrabaja RS-U30T fabricado por Hitachi Ltd.) a -40 °C durante 1 hora o más, mediante lo cual se obtuvo una gelatina congelada. Este bloque de gelatina se criodesecó (usando un TF5-85ATNNN fabricado por Takara Bio Inc.), se pulverizó usando un pulverizador (un COMIL U5 fabricado por Quadro Engineering Corp.), y a continuación una fracción del mismo que pasaba por un tamiz que tenía aberturas de 710 µm, pero que no pasaba por un tamiz que tenía aberturas de 500 µm, se recogió. Estos gránulos de gelatina obtenidos se trataron a 130 °C durante 72 horas bajo atmósfera de nitrógeno (usando un DP-43 fabricado por Yamato Scientific Co., Ltd.), obteniendo de este modo la Muestra 4.

40

45

La absorptividad del agua, relación residual en presencia de ácido, y relación de regeneración del hueso de la Muestra 4 se evaluaron de la misma forma que en el Ejemplo 1. Los resultados se enumeran en la Tabla 1.

50

Ejemplo comparativo 1

Aproximadamente 4 ml de una solución de gelatina que incluía la gelatina recombinante descrita en el Ejemplo 1 al 7,5 % en masa se vertió dentro del recipiente cilíndrico, y se dejó reposar en un congelador (un congelador de temperatura ultrabaja RS-U30T fabricado por Hitachi Ltd.) a -40 °C durante 1 hora o más, mediante lo cual se obtuvo una gelatina congelada. Este bloque de gelatina se criodesecó (usando un TF5-85ATNNN fabricado por Takara Bio Inc.), y posteriormente se trató a una temperatura de 142 °C y una presión de 4 hPa o menos durante 5 horas (usando un DP-43 fabricado por Yamato Scientific Co., Ltd.), obteniendo de este modo la Muestra 5.

55

La Muestra 5 se conformó en formas específicas para los respectivos ensayos (véase a continuación), y la absorptividad del agua, relación residual en presencia de ácido, y relación de regeneración del hueso se evaluaron de la misma forma que en el Ejemplo 1, usando las muestras de ensayo obtenidas. Los resultados se enumeran en la Tabla 1.

60

Absorptividad del agua: un paralelepípedo rectangular de aproximadamente 1,5 mm x aproximadamente 2 mm x aproximadamente 12 mm

65

Capacidad de descomposición: un cilindro sólido de aproximadamente 6 mm (diámetro) x aproximadamente 1 mm

(espesor)

Relación de regeneración del hueso: un cilindro sólido de aproximadamente 5 mm (diámetro) x aproximadamente 1 mm (espesor)

5 Ejemplo comparativo 2

Aproximadamente 4 ml de una solución acuosa de gelatina que incluía gelatina de cerdo (Nippi High Grade Gelatin® APAT fabricada por Nippi Inc.) al 7,5 % en masa se vertió en el recipiente cilíndrico, y se dejó reposar en un congelador (un congelador de temperatura ultrabaja RS-U30T fabricado por Hitachi Ltd.) a -40 °C durante 1 hora o más, mediante lo cual se obtuvo una gelatina congelada. Este bloque de gelatina se criodesecó (usando un TF5-85ATNNN fabricado por Takara Bio Inc.), después se trató a una temperatura de 142 °C y una presión de 4 hPa o menos durante 33 horas (usando un DP-43 fabricado por Yamato Scientific Co., Ltd.), obteniendo de este modo la Muestra 6.

15 La Muestra 6 se conformó en formas específicas para los respectivos ensayos (véase a continuación), y la absorptividad del agua, relación residual en presencia de ácido, y relación de regeneración del hueso se evaluaron de la misma forma que en el Ejemplo 1, usando las muestras de ensayo obtenidas. Los resultados se enumeran en la Tabla 1.

20 Absorptividad del agua: un paralelepípedo rectangular de aproximadamente 1,5 mm x aproximadamente 2 mm x aproximadamente 12 mm

Capacidad de descomposición: un cilindro sólido de aproximadamente 6 mm (diámetro) x aproximadamente 1 mm (espesor)

Relación de regeneración del hueso: un cilindro sólido de aproximadamente 5 mm (diámetro) x aproximadamente 1 mm (espesor)

25 Ejemplo comparativo 3

Aproximadamente 4 ml de una solución acuosa de gelatina que incluía la gelatina recombinante descrita en el Ejemplo 1 al 8 % en masa se vertió dentro del recipiente cilíndrico, y se dejó reposar en un congelador (un congelador de temperatura ultrabaja RS-U30T fabricado por Hitachi Ltd.) a -50 °C durante 1 hora o más, mediante lo cual se obtuvo una gelatina congelada. Este bloque de gelatina se criodesecó (usando un TF5-85ATNNN fabricado por Takara Bio Inc.), se pulverizó usando un pulverizador (un COMIL U5 fabricado por Quadro Engineering Corp.), y a continuación una fracción del mismo que pasaba por un tamiz que tenía aberturas de 710 µm, pero que no pasaba por un tamiz que tenía aberturas de 500 µm, se recogió. La fracción recogida se trató a 130 °C durante 18 horas bajo atmósfera de nitrógeno (usando un DP-43 fabricado por Yamato Scientific Co., Ltd.), obteniendo de este modo la Muestra 7.

La absorptividad del agua, relación residual en presencia de ácido, y relación de regeneración del hueso de la Muestra 7 se evaluaron de la misma forma que en el Ejemplo 1. Los resultados se enumeran en la Tabla 1.

40 Ejemplo comparativo 4

Aproximadamente 4 ml de una solución acuosa de gelatina que incluía la gelatina recombinante descrita en el Ejemplo 1 al 8 % en masa se vertió dentro del recipiente cilíndrico, y se dejó reposar en un congelador (un congelador de temperatura ultrabaja RS-U30T fabricado por Hitachi Ltd.) a -50 °C durante 1 hora o más, mediante lo cual se obtuvo una gelatina congelada. Este bloque de gelatina se criodesecó (usando un TF5-85ATNNN fabricado por Takara Bio Inc.), se pulverizó usando un pulverizador (un COMIL U5 fabricado por Quadro Engineering Corp.), y a continuación una fracción del mismo que pasaba por un tamiz que tenía aberturas de 710 µm, pero que no pasaba por un tamiz que tenía aberturas de 500 µm, se recogió. La fracción recogida se trató a 130 °C durante 15 horas bajo atmósfera de nitrógeno (usando un DP-43 fabricado por Yamato Scientific Co., Ltd), obteniendo de este modo la Muestra 8.

La absorptividad del agua, relación residual en presencia de ácido, y relación de regeneración del hueso de la Muestra 8 se evaluaron de la misma forma que en el Ejemplo 1. Los resultados se enumeran en la Tabla 1.

55 Ejemplo comparativo 5

En un recipiente enfriado a 9 °C, una solución acuosa de gelatina que incluía gelatina de cerdo (Nippi High Grade Gelatin ® APAT fabricado por Nippi Inc.) a 12 % en masa se agitó a 1400 rpm usando un T. K. HOMO DISPER modelo 2.5, y se dejó reposar en un congelador a -50 °C durante 8 horas, mediante lo cual se obtuvo una gelatina congelada. Las condiciones de agitación correspondían a un número de agitación de Froude Fr de 2,22, y un número de Reynolds de agitación de 3700. El bloque de gelatina se criodesecó, y se pulverizó con un pulverizador (un New Power Mill PM-2005 fabricado por Osaka Chemical Co. Ltd). Una fracción del mismo que pasaba por un tamiz que tenía aberturas de 710 µm, pero que no pasaba por un tamiz que tenía aberturas de 500 µm, se recogió y después se trató a una temperatura de 160 °C y una presión de 4 hPa o menos durante 19 horas (usando un DP-43 fabricado por Yamato Scientific Co., Ltd.) para dar la Muestra 9.

La absorptividad del agua, relación residual en presencia de ácido, y relación de regeneración del hueso de la Muestra 9 se evaluaron de la misma forma que en el Ejemplo 1. Los resultados se enumeran en la Tabla 1.

5 Ejemplo comparativo 6

Aproximadamente 20 ml de una solución acuosa de gelatina que incluía la gelatina recombinante descrita en el Ejemplo 1 al 7,5 % en masa se vertió en el recipiente cilíndrico, se dejó reposar a -2 °C, y después se enfrió a -30 °C. Tras confirmar la formación de núcleos de hielo, la temperatura se aumentó a -4,5 °C. A continuación, se llevó a cabo el enfriamiento a una velocidad de 0,3 °C por minuto, mediante lo cual se obtuvo una gelatina congelada. Este bloque de gelatina se criodesecó, y se pulverizó con un pulverizador (un New Power Mill PM-2005 fabricado por Osaka Chemical Co. Ltd). A continuación, una fracción del mismo que pasaba por un tamiz que tenía aberturas de 710 µm, pero que no pasaba por un tamiz que tenía aberturas de 500 µm, se recogió y después se trató a una temperatura de 142 °C y una presión de 4 hPa o menos durante 3,5 horas (usando un DP-43 fabricado por Yamato Scientific Co., Ltd), obteniendo de este modo la Muestra 10.

La absorptividad del agua, relación residual en presencia de ácido, y relación de regeneración del hueso de la Muestra 10 se evaluaron de la misma forma que en el Ejemplo 1. Los resultados se enumeran en la Tabla 1.

20 Ejemplo comparativo 7

Aproximadamente 20 ml de una solución acuosa de gelatina que incluía la gelatina recombinante descrita en el Ejemplo 1 al 7,5 % en masa se vertió en el recipiente cilíndrico, se dejó reposar a -2 °C, después se enfrió a -30 °C. Tras confirmar la formación de núcleos de hielo, la temperatura se aumentó a -6 °C. A continuación, se llevó a cabo el enfriamiento a una velocidad de 0,5 °C por minuto, mediante lo cual se obtuvo una gelatina congelada. Este bloque de gelatina se criodesecó, y se pulverizó usando un pulverizador (un COMIL U5 fabricado por Quadro Engineering Corp.). A continuación, una fracción del mismo que pasaba por un tamiz que tenía aberturas de 710 µm, pero que no pasaba por un tamiz que tenía aberturas de 500 µm, se recogió y se trató a 130 °C durante 18 horas bajo atmósfera de nitrógeno (usando un DP-43 fabricado por Yamato Scientific Co., Ltd), obteniendo de este modo la Muestra 11.

La absorptividad del agua, relación residual en presencia de ácido, y relación de regeneración del hueso de la Muestra 11 se evaluaron de la misma forma que en el Ejemplo 1. Los resultados se enumeran en la Tabla 1.

35

Tabla 1

		Relación residual en presencia de ácido		
		≤60 %		> 60 %
Absorptividad del agua	≥ 800 %	Ejemplo 1 (1775 %, 8 %) 2 semanas 24 % 4 semanas 51 %	Ejemplo 3 (1463 %, 59 %) 2 semanas 28 % 4 semanas 59 %	Ejemplo comparativo 3 (1516 %, 84 %) 2 semanas 14 % 4 semanas 28 %
		Ejemplo 2 (2579 %, 30 %) 2 semanas 17 % 4 semanas 48 %	Ejemplo 4 (1208 %, 54 %) 2 semanas 18 % 4 semanas 51 %	Ejemplo comparativo 4 (931 %, 84 %) 2 semanas 17 % 4 semanas 33 %
				Ejemplo comparativo 5 (1451 %, 90 %) 2 semanas 19 % 4 semanas 40 %
		Ejemplo comparativo 1 (1169 %, 60 %) 2 semanas 12 % 4 semanas 19 %	Ejemplo comparativo 2 (2945 %, 55 %) 2 semanas 13 % 4 semanas 21 %	Ejemplo comparativo 7 (847 %, 68 %) 2 semanas 9 % 4 semanas 21 %
	< 800 %	Ejemplo comparativo 6 (785 %, 47 %) 2 semanas 10 % 4 semanas 23 %		
		Ejemplo N.º (absorptividad del agua, relación residual en presencia de ácido) relación de regeneración del hueso (semanas)		

En la Tabla 1, el material para reparación de tejidos de las Muestras 1 a 4, que incluía gránulos de gelatina y presentaba una absorptividad del agua del 800 % en masa o más y una relación residual del 60 % en masa o menos

en presencia de ácido, presentó elevada capacidad para regenerar hueso y, en particular, sus relaciones de regeneración del hueso superaron el 45 % después de 4 semanas. Las capacidades de regeneración del hueso para las Muestras 7 a 11, que bien no tienen una absorptividad del agua del 800 % en masa o más, o tienen una relación residual superior al 60 % en masa en presencia de ácido, fueron todas inferiores a las de las Muestras 1 a 4.

5 La relación residual en presencia de ácido de la Muestra 1, Muestra 3, y Muestra 7 fue del 8 % para la Muestra 1, 59 % para la Muestra 3, y 84 % para la Muestra 7 (véase la Tabla 1). Estos resultados demuestran que el acortamiento de la duración de la reticulación da como resultado una mayor capacidad de descomposición con ácido y menor relación residual en presencia de ácido. Esto demuestra que el tiempo de reticulación contribuye a la
10 regulación de la capacidad de descomposición con ácido del material para reparación de tejidos.

Las absorptividades del agua y las relaciones residuales en presencia de ácido de las Muestras 3 y 4 granuladas, y de las Muestras 5 y 6 en forma de bloque, demuestran que la relación de regeneración del hueso varía con la forma del material para reparación de tejidos, incluso cuando la absorptividades del agua y las relaciones residuales en
15 presencia de ácido fueron similares (véase la Tabla 1).

Se puede pensar que estos resultados se producen porque:
por ejemplo, cuando la resistencia para mantener los espacios en la zona con pérdida se transmite por regulación de la duración de la reticulación, el uso de un sustrato en forma de bloque obliga a que las células descompongan el
20 sustrato para proliferar, lo que dificulta que las células lleguen al interior de la zona con pérdida, por el contrario, el uso de un sustrato granulado permite que las células alcancen el interior de la zona con pérdida pasando entre los gránulos, y esto por tanto permite que la regeneración del hueso proceda sin problemas. Esto demuestra que la granularidad del sustrato contribuye al control para proporcionar una excelente relación de regeneración del hueso para un sustrato de regeneración del hueso, y a mantener el volumen de la zona con pérdida.

25 **Ejemplo 5**

Preparación Muestra

30 Se preparó una solución acuosa de gelatina recombinante al 3 % usando la gelatina recombinante descrita en el Ejemplo 1, y la solución acuosa se vertió en el recipiente cilíndrico. Posteriormente, el recipiente cilíndrico se dejó reposar a -80 °C durante 1 hora. A continuación, la solución acuosa se criodesecó, y se reticuló térmicamente a una temperatura de 160 °C y una presión de 4 hPa o menos durante tres horas, mediante lo cual se obtuvo un bloque de
35 gelatina que tenía una absorptividad del agua del 2600 % y una relación residual del 50 % en presencia de ácido.

Ensayo de tejido de tipo dérmico (tejido tipo granulación) en espalda de rata

Una rata Wistar (macho, al menos 10 semanas de edad) se anestesió mediante la administración de 90 mg/kg de clorhidrato de ketamina y 10 mg/kg de clorhidrato de xilazina, en la cavidad abdominal. Se produjo una zona de pérdida de dermis circular de 19 mm de diámetro después de afeitar la espalda de la rata. El bloque de gelatina anterior, que tenía un diámetro de 19 mm y un espesor de aproximadamente 1,5 mm, se fijó a la zona con pérdida de dermis, y una gasa impregnada con vaselina (ADAPTIC (marca comercial registrada) fabricada por Johnson & Johnson), algodón húmedo, y una gasa, se aplicaron y se fijaron en su sitio. En la segunda semana tras la fijación, el tejido de la espalda se retiró junto con el apósito bajo anestesia.

45 El tejido retirado se tiñó con HE y se observó histológicamente, como resultado de lo cual se observó la formación de un tejido de tipo dermis (tejido tipo granulación).

Esto demuestra que la muestra es especialmente bien adecuada para la regeneración de la dermis.

50 Como se ha demostrado en lo anterior, el material para reparación de tejidos de acuerdo con los ejemplos de la invención fueron sustratos para la regeneración de tejido que presenta un excelente comportamiento de regeneración del hueso.

55 Por tanto, de acuerdo con la invención, se puede proporcionar un material para reparación de tejidos que tiene una excelente capacidad de regeneración del tejido,.

LISTADO DE SECUENCIAS

60 <110> FUJIFILM CORPORATION

<120> Material para reparación de tejidos

<130> FS-F06057-02

65 <140> PCT/JP2014/054572

ES 2 711 672 T3

<141> 25/02/2014

<150> JP 2013-049339

<151> 12/03/2013

5

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

10

<210> 1

<211> 571

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> CBE3

<400> 1

Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Leu Gln Gly Ala Pro Gly Leu Gln Gly
1 5 10 15

Met Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu
20 25 30

Arg Gly Asp Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asp Gly Ala Pro Gly Ala Pro
35 40 45

Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly
50 55 60

Pro Lys Gly Glu Arg Gly Asp Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asp Gly Ala
65 70 75 80

Pro Gly Lys Asp Gly Val Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ile Gly Pro Pro
85 90 95

Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Arg Gly
100 105 110

Asp Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asp Gly Ala Pro Gly Lys Asp Gly Val
115 120 125

Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ala Pro
130 135 140

ES 2 711 672 T3

Gly Ala Pro Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Arg Gly Asp Ala Gly Pro Lys Gly Ala
 165 170 175

Asp Gly Ala Pro Gly Lys Asp Gly Val Arg Gly Leu Ala Gly Pro Pro
 180 185 190

Gly Ala Pro Gly Leu Gln Gly Ala Pro Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly
 195 200 205

Glu Arg Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Arg Gly Asp
 210 215 220

Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asp Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Leu Gln
 225 230 235 240

Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly
 245 250 255

Glu Arg Gly Asp Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asp Gly Ala Pro Gly Lys
 260 265 270

Asp Gly Val Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Glu Arg
 275 280 285

Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Arg Gly Asp Ala Gly
 290 295 300

Pro Lys Gly Ala Asp Gly Ala Pro Gly Lys Asp Gly Val Arg Gly Leu
 305 310 315 320

Ala Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ala Pro Gly Ala Pro
 325 330 335

Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly
 340 345 350

Pro Lys Gly Glu Arg Gly Asp Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asp Gly Ala
 355 360 365

Pro Gly Lys Asp Gly Val Arg Gly Leu Ala Gly Pro Pro Gly Ala Pro
 370 375 380

Gly Leu Gln Gly Ala Pro Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly
 385 390 395 400

ES 2 711 672 T3

Ala Ala Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Arg Gly Asp Ala Gly Pro
 405 410 415

Lys Gly Ala Asp Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Leu Gln Gly Met Pro
 420 425 430

Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Arg Gly
 435 440 445

Asp Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asp Gly Ala Pro Gly Lys Asp Gly Val
 450 455 460

Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala
 465 470 475 480

Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Arg Gly Asp Ala Gly Pro Lys Gly
 485 490 495

Ala Asp Gly Ala Pro Gly Lys Asp Gly Val Arg Gly Leu Ala Gly Pro
 500 505 510

Ile Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Leu Gln
 515 520 525

Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly
 530 535 540

Glu Arg Gly Asp Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asp Gly Ala Pro Gly Lys
 545 550 555 560

Asp Gly Val Arg Gly Leu Ala Gly Pro Pro Gly
 565 570

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un sustrato que comprende gránulos de gelatina para su uso en la regeneración ósea, presentando el sustrato una absorción de agua del 800 % en masa o más, y una relación residual del 60 % en masa o menos después de tres horas de tratamiento de descomposición usando 1 mol/l de ácido clorhídrico.
- 10 2. Un sustrato de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que los gránulos de gelatina comprenden una gelatina granulada que atraviesa un tamiz que tiene aberturas de 1400 µm.
- 10 3. Un sustrato de acuerdo con la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2, en el que los gránulos de gelatina comprenden un producto de gelatina reticulada.
- 15 4. Un sustrato de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones anteriores, en el que los gránulos de gelatina comprenden un producto de gelatina térmicamente reticulado.
- 15 5. Un sustrato de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones anteriores, en el que el material para reparación de tejidos es granuloso.
- 20 6. Un sustrato de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que los gránulos de gelatina tienen orificios comunicantes con un diámetro de orificio de 10 µm a 2500 µm.
- 25 7. Un sustrato de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que los gránulos de gelatina comprenden una gelatina recombinante que no incluye restos de serina o restos de treonina.
- 25 8. Un sustrato de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que los gránulos de gelatina comprenden una gelatina recombinante que no incluye restos de serina, restos de treonina, restos de asparagina, restos de tirosina o restos de cisteína.
- 30 9. Un sustrato de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que los gránulos de gelatina comprenden una gelatina recombinante que no incluye secuencias de aminoácidos representadas por Asp-Arg-Gly-Asp.
- 30 10. Un sustrato de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que los gránulos de gelatina comprenden una gelatina recombinante que tiene un punto isoeléctrico de 5 a 10.
- 35 11. Un sustrato de acuerdo con la Reivindicación 1, que comprende además un agente osteoconductor.
- 40 12. Un material para reparación de tejidos en forma de bloque que comprende gelatina para su uso en la regeneración de la dermis, presentando el material para reparación de tejidos en forma de bloque una absorción de agua del 800 % en masa o más, y una relación residual del 60 % en masa o menos después de tres horas de tratamiento de descomposición usando 1 mol/l de ácido clorhídrico.