

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 782**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01)
A61L 27/14 (2006.01)
A61K 47/50 (2007.01)
A61L 27/54 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61F 2/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2015** **PCT/RU2015/000667**
87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2016** **WO16130041**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2015** **E 15882179 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018** **EP 3130342**

54 Título: **Procedimiento para crear un implante personalizado que se activa por genes para regenerar tejido óseo**

30 Prioridad:

10.02.2015 RU 2015104291

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.05.2019

73 Titular/es:

"NEXTGEN" COMPANY LIMITED (100.0%)
ul. Gubkina, 3, korp. 1
Moscow 119333, RU

72 Inventor/es:

DEEV, ROMAN VADIMOVICH;
ISAEV, ARTUR ALEKSANDROVICH;
BOZO, ILYA YADIGEROVICH;
KOMLEV, VLADIMIR SERGEEVICH y
DROBYSHEV, ALEXEY YUREVICH

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 714 782 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para crear un implante personalizado que se activa por genes para regenerar tejido óseo

Técnica anterior

5 El problema de tratar pacientes con defectos óseos o atrofia ósea es muy urgente en la práctica de traumatología y ortopedia, cirugía maxilofacial y oral [1-3]. Existe una variedad de sustitutos óseos (materiales osteoplásticos) para la curación de defectos óseos de tamaño pequeño, existen procedimientos para optimizarlos mediante la mezcla con tejido óseo autógeno; plasma rico en plaquetas; plasma rico en factores de crecimiento, etc. [1].

10 Sin embargo, es particularmente problemático y socialmente importante el problema no resuelto del tratamiento eficiente de pacientes con grandes defectos óseos (más de 1 cm³) que se asocian con deformidades congénitas y desarrollo anormal, traumas, enfermedades inflamatorias, patología oncológica y las primeras etapas de su tratamiento quirúrgico. En estas situaciones clínicas en las que la función ósea como órgano del cuerpo se deteriora en gran medida o se pierde por completo, es imposible reconstruir la continuidad ósea usando sustitutos óseos disponibles comercialmente, dada la pronunciada insuficiencia osteogénica. Solo el hueso autógeno, ya sea libre o vascularizado, un "estándar de oro" del injerto óseo, puede ser eficaz en estos casos [4, 5].

15 El injerto óseo con autotrasplantes se asocia con causar una lesión adicional, expandir o crear un nuevo abordaje quirúrgico, lo que aumenta considerablemente el tiempo de la cirugía, la tasa de complicaciones y la morbilidad del sitio del donante. Además, el injerto óseo autógeno con técnica microvascular se puede realizar solo por profesionales altamente calificados en el contexto de instituciones médicas especializadas que cuentan con el equipo necesario, no solo para llevar a cabo dichas operaciones, sino también para controlar la compatibilidad de las anastomosis vasculares y el desempeño oportuno de los procedimientos de revisualización. Al mismo tiempo, a pesar de todas las dificultades, los recursos y fondos gastados, existe una alta probabilidad de trombosis y falla de la anastomosis vascular que causa la pérdida de los autoinjertos [6].

25 Incluso en el caso de indicaciones absolutas para el injerto de autobone, la retención del injerto y su integración completa en el sitio receptor, el resultado a largo plazo del tratamiento no es siempre exitoso. En primer lugar, esto se explica por un alto grado de biorresorción posterior del material que se injerta (hasta un 40 % e incluso más). En segundo lugar, cuando el defecto óseo o el área de la atrofia ósea tienen una forma irregular, es imposible modelar el autoinjerto (un peroné, una costilla, una escápula, huesos craneales) precisamente con la forma del defecto que se va a sustituir, es decir, con el fin de que no se exceda en 1 mm la diástasis entre toda la superficie del material que se introduce y las paredes del defecto óseo (sitio receptor del hueso). Esto causa una consolidación insuficiente del injerto en el área del lecho receptor y también la incidencia de deformaciones óseas postquirúrgicas, no uniones o una biorresorción excesiva del autoinjerto.

35 Por lo tanto, a pesar de ser un "estándar de oro" de los materiales sustitutos óseos, los autoinjertos óseos tienen un uso limitado, no son siempre eficientes y se asocian con una alta frecuencia de complicaciones. Una de las principales desventajas de su uso y una de las razones de su eficiencia insuficiente es que no se pueden modelar con precisión en forma y tamaño del defecto óseo. Al mismo tiempo, el contacto cercano de cualquier sustituto óseo sobre toda la superficie del defecto óseo o el área de atrofia ósea y la inmovilización completa son los principios fundamentales del injerto óseo [1]. Cuando el injerto de autobone no es factible o resulta ineficiente, los médicos tienen que usar la osteogénesis por distracción, las prótesis o abandonar este tipo de tratamientos que reduce considerablemente la calidad de vida de los pacientes.

40 En este sentido, es altamente urgente desarrollar un nuevo sustituto óseo más eficiente que sea capaz de reemplazar o al menos convertirse en una alternativa en términos de eficiencia al uso de autoinjertos óseos, incluidos los vascularizados. De acuerdo con los hallazgos de la investigación de los inventores, este problema se puede resolver construyendo materiales biocompatibles y biodegradables porosos que se activan por genes caracterizados por un ajuste exacto con la forma y el tamaño de los defectos óseos para sustituirlos de los que se hicieron usando cualquier tecnología de impresión tridimensional (3D) disponible tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Estado de la técnica

50 Se conoce una variedad de sustitutos óseos comunes, tales como matrices óseas alogénicas y xenogénicas de diversas tecnologías de procesamiento (desmineralizado, desproteinizado, etc.), cerámicos de fosfato de calcio, silicatos, polímeros de ácidos orgánicos y análogos sintéticos o componentes naturales de las sustancias orgánicas y minerales de la matriz ósea. Sin embargo, todos tienen solo la acción osteoconductiva porque no hay componentes biológicamente activos en ellos. En este sentido, se usan solo para sustituir los defectos óseos de tamaño bajo (volumen bajo) debido a su capacidad solo para optimizar la osteogénesis reparadora que no puede proporcionar su inducción [7]. Los productos de dicho grupo en forma de bloques personalizados para la reparación de grandes defectos óseos casi no se usan en la práctica clínica.

Otra categoría son los sustitutos óseos activados que se pueden dividir en grupos de materiales que contienen factores de crecimiento (proteínas), células vivas o construcciones génicas (ácidos nucleicos).

Los sustitutos óseos con los factores de crecimiento tienen una acción osteoinductora moderada que permite activar la osteogénesis reparadora. Sin embargo, dado que los factores de crecimiento son de corta duración y de corta distancia, y se sabe que se degradan rápidamente en la herida operatoria en condiciones inflamatorias, la eficiencia general de los productos parece ser insuficiente para sustituir los grandes defectos óseos. En este sentido, no hay numerosos estudios que usen la tecnología de impresión tridimensional para construir los sustitutos óseos de un tamaño y una forma predeterminados con factores de crecimiento, y en todos los casos se produjeron productos de tamaño bajo (aproximadamente 1 cm³) con mucho menos que eficacia óptima [8].

Los ejemplos de otro enfoque más eficiente se asocian con el desarrollo de injertos óseos personalizados de ingeniería tisular. Los investigadores han fabricado matrices personalizadas que luego se combinaron con células vivas, usando diversas tecnologías para construir andamios con un tamaño y forma predeterminados. De esta manera, los andamios de un tamaño y forma predeterminados obtienen cierta capacidad osteogénica y, en teoría, pueden proporcionar una inducción reparadora pronunciada de la osteogénesis. Sin embargo, el potencial terapéutico de las células vivas que forman parte de los injertos óseos personalizados se limita por la demanda de oxigenación. En otras palabras, muchos estudios han demostrado ser más eficientes en este tipo de injertos óseos de ingeniería de tejidos que se imprimen en 3D de tamaño pequeño (hasta 1 cm³) en comparación con los materiales ordinarios. Sin embargo, en el caso de la sustitución de grandes defectos óseos, no se ha logrado ningún efecto incluso con el modelado ideal de la forma y el tamaño del andamio a la geometría del defecto porque la célula inevitablemente murió sin el suministro de sangre adecuado.

La técnica anterior más cercana de la invención que se reivindica es el sustituto óseo que se activa por genes que consiste en un andamio y ácidos nucleicos, es decir, la construcción génica que codifica el factor o factores de crecimiento [9]. Los andamios que se imprimen en 3D biodegradables que comprenden estructuras de poros internos se conocen a partir del documento WO 2015/002707 A1, en el que los autores de dicho documento determinaron la porosidad del andamio que facilita la siembra de células uniformes y la posterior formación de hueso vascularizado.

Un sustituto óseo que se activa por genes comprende un complejo "andamio-ácido nucleico" cuyos componentes se combinaron mediante diversas técnicas: unión química [7], usar adyuvantes (por ejemplo, biopolímero en gel) [11], inclusión inmediata del ácido nucleico en el andamio durante su proceso de síntesis, etc.

Tales productos tienen la acción osteoinductora, no se limitan por la demanda de oxigenación porque no contenían células vivas en ellos. Sin embargo, muchos investigadores piensan que la intensidad de su acción osteoinductora y, como resultado, su eficiencia cuando se usan para sustituir los defectos óseos es menor que la de los injertos óseos de ingeniería de tejidos. La razón es una baja eficiencia de transfección de las células del sitio receptor mediante las construcciones génicas y también el uso de la "fuerza terapéutica" solo de uno o dos factores que se codifican mediante las construcciones génicas para inducir el proceso reparador, mientras que las células de los materiales de ingeniería tisular tienen de un mecanismo de acción más amplio.

Debido a la ineficiencia y los inconvenientes de los enfoques técnicos que se mencionan anteriormente, muchos grupos de investigación han emprendido el camino de complicar los productos al producir los sustitutos óseos que comprenden portadores complejos y combinaciones de componentes biológicamente activos: construcciones génicas y células, células y factores de crecimiento, factores de crecimiento y construcciones génicas, e incluso factores de crecimiento, construcciones génicas y células en un solo elemento. Sin embargo, la producción de dichos materiales es excesivamente costosa y su eficiencia para sustituir los grandes defectos óseos sigue siendo insuficiente.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra esquemáticamente un material personalizado que se activa por genes adecuado para sustituir un defecto del hueso craneal en el conejo: A: vista superior; B: vista transversal a través del centro en el plano frontal.

La Fig. 2 muestra un material personalizado construido que se activa por genes adecuado para sustituir un defecto del hueso craneal en el conejo.

La Fig. 3 muestra un material personalizado que se activa por genes que sustituye un defecto óseo; 6,5 meses después de la implantación: 1 - implante; 2 - tejido óseo recién formado; A - tomografía computarizada; reconstrucción 3D; B - imagen histológica (tinción: hematoxilina, eosina).

La Fig. 4 muestra un material personalizado que no se activa por construcciones génicas que sustituyen un defecto óseo; 6,5 meses después de la implantación: 1 - implante, 2 - tejido óseo recién formado. Imagen histológica (tinción: hematoxilina, eosina).

La Fig. 5 muestra esquemáticamente un material personalizado que se activa por genes con dispositivos de localización, adecuado para sustituir un gran defecto de los huesos de la canilla del conejo.

La Fig. 6 muestra un implante personalizado que se activa por genes, que se fija en un defecto óseo con miniplaca y minitornillos.

La Fig. 7 muestra un material personalizado que se activa por genes con dispositivos de localización que sustituyen un defecto óseo; 3 meses después de la implantación: 1 - implante, 2 - tejido óseo recién formado. Imagen histológica (tinción: hematoxilina, eosina).

Descripción detallada de la invención

5 La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no están dentro del alcance de dichas reivindicaciones se proporcionan solo con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención.

10 En vista de la experiencia de otros investigadores y de la técnica anterior, sería lógico suponer que los materiales, tanto ordinarios como activados, que comprenden los factores de crecimiento o células o construcciones génicas no pueden ser eficientes en la reparación de defectos óseos grandes debido a los aspectos que se mencionan anteriormente del mecanismo de acción de los productos y la eficiencia impredecible en la sustitución de defectos de tamaño bajo y moderado.

15 Sin embargo, a pesar de la opinión común y las tendencias (que se dirigen a producir materiales osteoplásticos más complejos y de componentes múltiples) en desarrollo, nuestro grupo de investigación ha adoptado una forma diferente de combinar los enfoques quirúrgicos y biomédicos para lograr el resultado óptimo.

20 La esencia del producto y el proceso para su fabricación que se propone en la presente invención es la construcción de una matriz personalizada de materiales biocompatibles y biorreabsorbibles y su combinación con un componente biológicamente activo, las construcciones génicas. Un aspecto clave de la invención que lo distingue de la técnica anterior más cercana [9] es el uso de procesos de impresión 3D para producir un producto personalizado que se ajusta exactamente con la forma y el tamaño al sitio receptor, es decir, el área del defecto óseo o atrofia ósea. En otras palabras, el producto se produce de una manera que después de la implantación en el área del receptor, la diastasis entre el material y las paredes óseas congruentes no excedió 1 mm. Los procesos de impresión 3D se usan para lograr los parámetros personalizados y la correspondencia precisa de un tamaño y forma. Un componente adicional del producto puede ser una estructura de fijación (placas de reconstrucción, tornillos, miniplacas, minitornillos, alambres, pasadores, etc.) que se incorporan en el material en alguna etapa de la fabricación del implante. La presencia de este componente es obligatoria si se eligió un material bioabsorbible con características mecánicas insuficientes como un andamio para construcciones génicas que impidió la fijación confiable en el sitio receptor con cualquier técnica estándar (construcciones metálicas, etc.).

30 El proceso que se propone para la construcción de materiales personalizados que se activan por genes incluye las siguientes etapas, cuyo orden puede variar:

1. Determinar la forma y el tamaño exactos de un defecto óseo o área de atrofia ósea. Para este fin se pueden usar procedimientos radiológicos estándar, como tomografía computarizada, examen de rayos X, radiografía, etc.
- 35 2. Producir un andamio personalizado de la forma y el tamaño predeterminados a partir de materiales biorreabsorbibles usando cualquier proceso de impresión 3D que incluya estereolitografía, fotopolimerización, etc.
3. Combinar el andamio con las construcciones génicas en cualquier etapa de producción del andamio personalizado o después de producirlo.

40 La primera etapa se dirige a la planificación de los parámetros morfométricos del producto que se fabricará y requiere los mismos procedimientos de investigación que los que se usan habitualmente en la planificación de una intervención quirúrgica. La opción que más se prefiere es la tomografía computarizada, una parte esencial del diagnóstico de patología de los huesos del esqueleto que proporciona los datos para la planificación de los procedimientos de reparación ósea. La información que se obtiene en el curso de la tomografía computarizada estándar se puede usar para modelar la forma y el tamaño del defecto óseo y, en consecuencia, la forma y el tamaño del implante personalizado que se activa por genes usando un software que se configura especialmente (por ejemplo, "3D Slicer" disponible en NHI, USA). Sobre la base de la información morfométrica que se obtiene, se forma un archivo maestro para la impresora 3D o cualquier otro aparato capaz de producir un implante tridimensional con parámetros predeterminados a partir del material bioabsorbible que se requiere. Teniendo en cuenta la organización morfológica y funcional y la regeneración del tejido óseo, los materiales más preferidos para construir el andamio pueden comprender fosfatos de calcio, hidroxapatita, colágeno, materiales cerámicos de vidrio bioactivo, polímeros de ácidos orgánicos y otros materiales que incluyen combinaciones de los mismos. Los materiales bioabsorbibles que se eligen para construir los implantes personalizados que se activan por genes pueden tener cualquier estado agregativo y las propiedades físicas solo influyen en la elección de un proceso de impresión 3D particular.

55 La impresión 3D de un andamio se puede realizar mediante dos procedimientos fundamentalmente diferentes. El primero es la impresión directa de un andamio a partir del material elegido. El segundo involucra la impresión de los elementos de conformación, las guías, (de materiales adecuados) y su uso como moldes para "moldear" (síntesis) un andamio de forma y tamaño predeterminados.

Una etapa crucial para producir un material personalizado que se activa por genes es combinar los andamios y las construcciones génicas (por ejemplo, ADN plasmídico). Esta parte del proceso se puede implementar también mediante una serie de procedimientos que se pueden definir en parte por la naturaleza del material bioabsorbible que se elige para producir el andamio. Si el portador se produce a partir de un material líquido (gel, sol, solución) o un material que se encuentra temporalmente en una fase líquida, la construcción génica se puede introducir allí antes o durante la impresión 3D. Si se usa un material sólido (por ejemplo, granulado), se pueden agregar construcciones génicas en una solución líquida o como parte de cualquier material de gel que las contenga antes o durante la impresión 3D. El procedimiento más simple y factible en la mayoría de los casos es combinar el andamio personalizado que se produce con las construcciones génicas después de la impresión 3D. Con este fin, las construcciones génicas en diversas concentraciones en forma de solución o como parte de un gel se pueden incubar bajo diferentes condiciones (temperatura, tiempo de exposición, impacto mecánico) con el andamio "impreso".

Si las construcciones génicas se combinan con el andamio antes o durante su impresión 3D, se prefiere realizar la impresión 3D en condiciones estériles, es decir, en salas limpias de clase A o B. Sin embargo, si las construcciones génicas se combinan con el andamio después de que se haya producido, la impresión 3D se podría realizar en las salas de cualquier clase con la posterior esterilización del andamio personalizado resultante que se combina con las construcciones génicas en condiciones estériles más adelante.

Se ha descubierto sorprendentemente en las investigaciones, que se describen en parte en los ejemplos, que los resultados óptimos se podrían lograr usando material personalizado que se activa por genes, que se produce mediante el proceso de impresión 3D incluso en caso de reparación de defectos óseos grandes. En otras palabras, es precisamente la congruencia y la adherencia estrecha del material que se activa por genes a todas las superficies del sitio receptor lo que permite su eficiencia. Al mismo tiempo, el andamio personalizado idéntico sin construcciones génicas era completamente ineficiente y el implante que se activa por genes no personalizado que se hace de los mismos materiales y que tenía un tamaño y forma estándar no era lo suficientemente eficiente.

El efecto ventajoso que los presentes inventores obtienen se explicará posiblemente por el hecho de que una vez que se implantan en el área de un gran defecto óseo, las construcciones génicas del material que se activa por genes no personalizado de tamaño estándar, no se pusieron directamente en contacto con las células del lecho receptor y no logran alcanzar las células objetivo. Además, la diastasis de más de 1 mm entre las paredes óseas y el material que se activa por genes permite que la mayoría de las construcciones génicas que se liberan se destruyan y eliminen rápidamente mediante las enzimas de coágulo de sangre y el líquido inflamatorio que se siente en este espacio. Al mismo tiempo, la migración de células residentes al implante no es lo suficientemente activa debido al espacio significativo entre la superficie del producto y las paredes del defecto óseo. Como resultado, considerando la baja eficiencia de transfección, especialmente en el caso de un ADN plasmídico, los ácidos nucleicos no ingresan a las células en cantidades suficientes para permitir un efecto terapéutico.

En contraste, el material personalizado que se activa por genes se adhiere fuertemente a todas las superficies del lecho receptor con un "espacio libre" de menos de 1 mm de longitud. Esto facilita, por un lado, una migración más rápida y masiva de células a la estructura del producto y, por otro lado, acorta la distancia que las construcciones génicas tienen que cubrir en el camino hacia las células objetivo. Debido a la falta de espacio entre el material que se activa por genes y las paredes del defecto óseo, este acortamiento de la distancia proporciona la preservación de más construcciones génicas, lo cual es extremadamente importante para lograr un efecto terapéutico.

Por lo tanto, el cumplimiento total entre la forma y el tamaño del producto y los parámetros del lecho receptor, precisamente en el caso del material que se activa por genes es de importancia clave para lograr el efecto terapéutico del producto. Descubrir este hecho se ha convertido en un tipo de descubrimiento que nos permitió desarrollar un sustituto óseo eficaz para la reparación de defectos óseos grandes (de más de 1 cm³). Sin embargo, los mecanismos detallados de la eficiencia descubierta de materiales precisos y personalizados que se activan por genes necesitan más investigación y elaboración.

Habiendo resuelto en parte el problema de la sustitución de defectos óseos grandes en el aspecto de los procedimientos biomédicos, enfrentamos otro problema, uno quirúrgico. El problema es que el material que se activa por genes para implementar su acción osteoinductora no solo tiene que adherirse firmemente a todas las superficies del lecho receptor inmediatamente después de la implantación, sino que debe permanecer también en esa posición todo el tiempo hasta su completa integración con el tejido óseo circundante. En otras palabras, el injerto óseo personalizado se debe fijar de manera segura en el sitio receptor, de lo contrario, se desplazará inevitablemente y los espacios se formarán entre el implante y el área del receptor que podrían afectar la acción biológica, dar lugar a la motilidad e incluso a la caída. Este problema se resuelve fácilmente en los casos en que el andamio consiste en un material mecánicamente fuerte que permite una fijación estándar (tornillos, minitornillos, microtornillos, pasadores, agujas): cualquier accesorio se podría atornillar o insertar directamente durante la cirugía sin destruir el implante. Sin embargo, los materiales de los andamios son a menudo frágiles y no lo suficientemente fuertes como lo fue en algunas de las investigaciones que realizamos. Por ejemplo, los andamios porosos de fosfatos de calcio se rompieron fácilmente al intentar perforar para la fijación. Es extremadamente difícil o simplemente imposible reparar directamente tales materiales durante la cirugía.

Para este punto, se desarrollaron etapas de proceso adicionales y variantes de los materiales personalizados que se activan por genes que se hacen de los andamios con falta de resistencia mecánica. La solución es localizar los elementos de fijación en el injerto óseo personalizado que se activa por genes dentro de las etapas de la fabricación del andamio que se puede realizar de dos maneras. La primera consiste en introducir un núcleo especial que se hace de un metal o un material bioabsorbible fuerte en la estructura interior del andamio que puede tener los orificios para los elementos de fijación (tornillos, minitornillos, microtornillos, pasadores, agujas, etc.). Los canales que conducen al núcleo (u orificios en el núcleo) se deben formar en la superficie del implante desde donde se supone que se debe fijar el producto. La segunda opción es colocar un sistema de fijación externo (por ejemplo, una miniplaca con minitornillos) en una posición predeterminada y producir el andamio de una forma y tamaño predeterminados ya con elementos de fijación. Como resultado, el material personalizado que se activa por genes puede comprender dispositivos internos (núcleo) o externos.

De manera importante, los elementos de fijación se tienen que elegir ya en la primera etapa de la producción personalizada de implantes que se activan por genes, en base con el plan quirúrgico que el médico propone. Para este fin, un modelo 3D óseo se puede fabricar inicialmente con el área de defecto, atrofia o sitio patológico cuya corrección conllevará la formación de un defecto óseo. Este modelo se tiene que poner a disposición del médico que planifica la cirugía. Un médico reproducirá las manipulaciones que se planifican (resección de un fragmento óseo, rectificación de las paredes del defecto óseo, etc.) y ubicará los elementos de fijación (estructuras que se hacen de metales o materiales bioabsorbibles fuertes) en el modelo para inmovilizar los fragmentos óseos y el implante personalizado que se activa por genes. El modelo con los dispositivos de localización que se aseguran en el mismo en una posición correcta se usa para calcular los parámetros morfométricos en la fabricación del implante personalizado que se activa por genes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Material personalizado que se activa por genes sin elementos de fijación "incorporados"

Antes de fabricar una de las variantes del material personalizado que se activa por genes sin dispositivos de fijación mediante el procedimiento que se propone en el presente documento, se tenía que definir un modelo biológico adecuado del defecto óseo que tenía dimensiones críticas. Nos guiamos por los siguientes criterios para elegir el modelo de investigación: 1) el defecto óseo tenía que ser de dimensiones máximas; 2) permitía que el bloque se fijara de manera confiable sin usar construcciones metálicas en el área de implantación. Teniendo en cuenta los criterios que se citan anteriormente, se desarrolló un modelo experimental del defecto de los huesos craneales del conejo con un diámetro de 20 mm. La osteotomía craneal se realizó con un taladro para formar el defecto óseo sin dañar la duramadre del cerebro y preservar 1 mm en fragmentos anchos de la placa cortical interna que sobresale 1 mm hacia el centro del defecto a 1, 5, 7 y 11 o proyecciones del reloj. La preservación de estos fragmentos óseos en dichas posiciones como puntos de apoyo en combinación con las dimensiones del defecto óseo se han convertido en la característica distintiva del modelo. Tal modelo permitió que el implante personalizado que se activa por genes se inmovilizara dentro del defecto óseo sin usar técnicas de fijación adicionales.

La tomografía computarizada multiespiral del cráneo de conejo se realizó antes de la cirugía. Realizamos la segmentación manual del defecto óseo planificado con el centro que se ubica en la proyección de la sutura sagital de manera equidistante de las suturas frontoparietal y parietooccipital, usando el software 3D Slicer (NHI, EE. UU.). Teniendo en cuenta los parámetros morfométricos que se calculan del defecto óseo planificado, se realizó una impresión 3D del bloque de fosfato de octacalcio. El bloque tenía la forma de un disco convexo de 1,3 mm de grosor, 20 mm de diámetro y se proporcionaba de 17 perforaciones para la descompresión cerebral después de la sustitución del hueso craneal (Fig. 1, Fig. 2).

El andamio que se produce mediante impresión 3D se combinó con una construcción génica (un ADN plasmídico con un gen que codifica el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)) de acuerdo con el protocolo de laboratorio predefinido que se basa en la unión química de los ácidos nucleicos al calcio del andamio:

1) lavar el andamio (incubación con tampón de fosfato 0,5 M en un volumen de 5 ml a 37°C con agitación continua durante 12 horas);

2) equilibrado (tratamiento con tampón de fosfato 10 MM en un volumen de 5 ml a 37°C con agitación continua, 3 veces durante 10 minutos cada vez);

3) secar el andamio (incubación a 37°C hasta que se seque completamente durante 3 horas);

4) aplicar las construcciones génicas (incubación con la solución de ADN plasmídico en tampón de fosfato 10 mM a una concentración de 1 µg/µl a 37°C con agitación continua durante 12 horas);

5) lavar el ADN plasmídico no unido (tratar un volumen de 5 ml con solución de fosfato 5 MM 3 veces) del producto;

6) secar (incubación a 37°C hasta secar por completo durante 3 horas).

Seis meses y medio después del injerto óseo con el sustituto personalizado que se activa por genes, la integridad del hueso craneal del conejo se reparó completamente. El implante no se reabsorbió, pero sus áreas periféricas estaban completamente integradas con el tejido óseo circundante. Además, se formó un tejido óseo recién formado de 3-6 mm de longitud a lo largo de las superficies internas y externas del injerto personalizado que se activa por genes. Tanto de acuerdo con la tomografía computarizada como con el estudio histológico, se detectó que el tejido óseo recién formado se adhirió firmemente al implante sin formar ninguna capa intermedia o cápsula de tejido conectivo (Fig. 3).

En ausencia de construcciones que se activan por genes, el volumen de tejido óseo recién formado fue considerablemente menor y el hueso procedente de la periferia no superó 1-2 mm (Fig. 4).

Ejemplo 2

Material personalizado que se activa por genes con elementos de fijación "incorporados".

Con el fin de estudiar esta variante del material personalizado que se activa por genes, se desarrolló otro modelo: un defecto de 36 mm de longitud de los huesos de la canilla del conejo con fragmentos de hueso proximal y distal con bordes escalonados.

El implante personalizado que se activa por genes (Fig. 5) se creó usando el procedimiento de la invención.

En la primera etapa, se llevó a cabo la impresión 3D para fabricar los elementos de conformación en los que se colocaron la miniplaca y los minitornillos que se destinan a fijar el implante. Usando el molde resultante, el andamio se sintetizó a partir de fosfato tricálcico que se ajustaba exactamente a los parámetros del molde y contenía los elementos de fijación. El implante se combinó con la construcción génica (un ADN plasmídico con genes vegf y sdf (que codifica el factor de crecimiento celular del estroma)) de acuerdo con el protocolo que se menciona anteriormente. El sustituto personalizado que se activa por genes resultante con un sistema de fijación "incorporado" se implantó en el defecto de los huesos de la canilla del conejo y se ajustó exactamente a los parámetros del implante (Fig. 6).

Tres meses después, se restauró completamente la capacidad de soporte de la extremidad. El implante no se reabsorbió al final de este tiempo, pero sus áreas periféricas estaban completamente integradas con los fragmentos de hueso (Fig. 7).

Por lo tanto, el procedimiento que se desarrolló para construir un material personalizado que se activa por genes y sus variantes hace posible fabricar el producto médico eficaz para la sustitución de defectos óseos, incluidos los grandes.

Lista de referencias

1. Kulakov L.A., Robustova T.G., Nerobeev L.I., editors. Dental Surgery and Maxillofacial Surgery. National guidance. Moscow, GEOTAR-Media, 2010; 928 p.;
2. Pipitone PS, Rehman S. Management of traumatic bone loss in the lower extremity. Orthop Clin North Am. 2014 Oct; 45 (4):469-82;
3. Tevlin R, McArdle A, Atashroo D, Walmsley GG, Senarath-Yapa K, Zielins ER, Paik KJ, Longaker MT, Wan DC. Biomaterials for craniofacial bone engineering. J Dent Res. 2014 Dec; 93 (12):1187-95;
4. Al-Nawas B, Schiegnitz E. Augmentation procedures using bone substitute materials or autogenous bone - a systematic review and meta-analysis. Eur J Oral Implantol. 2014 Summer; 7 Suppl 2:S219-34;
5. Nkenke E, Neukam FW. Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: morbidity, resorption and implant survival. Eur J Oral Implantol. 2014 Summer; 7 Suppl 2:S203-17;
6. Han Z, Li J, Li H, Su M, Qin L. Single versus dual venous anastomoses of the free fibula osteocutaneous flap in mandibular reconstruction: A retrospective study. Microsurgery. 2013 Sep 3. doi: 10.1002/micr.22176. [Publicación electrónica antes de impresión];
7. Deev R.V., Drobyshv A.Yu., Bozo I.Ya. et al. Construction and biological effect evaluation of gene-activated osteoplastic material with human VEGF gene. Cellular Transplantation and Tissue Engineering, 2013; VIII (3): 78-85;
8. Strobel LA, Rath SN, Maier AK et al. Induction of bone formation in biphasic calcium phosphate scaffolds by bone morphogenetic protein-2 and primary osteoblasts. J Tissue Eng Regen Med. 2014 Mar; 8(3):176-85;

9. Goldstein S.A. In vivo gene transfer methods for wound healing, patent No. 2170104, 10.07.2001;
10. Wegman F., Bijenhof A., Schuijff L. et al. Osteogenic differentiation as a result of BMP-2 plasmid DNA based gene therapy in vitro and in vivo. Eur. Cell Mater. 2011; 21: 230-42.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de construcción de un implante personalizado que se activa por genes para la sustitución de defectos óseos en un mamífero, que comprende tomografía computarizada de un área de injerto óseo, modelado de un defecto óseo o sitio receptor del hueso en base a los datos tomográficos computados, impresión tridimensional de un andamio biocompatible o un molde para la fabricación de un andamio biocompatible, **caracterizado porque** el andamio biocompatible
- i) se activa mediante ácidos nucleicos para producir el implante personalizado que se activa por genes y
 - ii) se adapta a la forma y al tamaño del sitio de sustitución del defecto óseo con una diastasis que no excede 1 mm entre el material de dicho andamio biocompatible y las paredes óseas congruentes.
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** durante la fabricación del andamio biocompatible, los elementos se incorporan en el mismo para la fijación posterior del producto en el área de implantación: placas, miniplacas, tornillos, minitornillos, pasadores, agujas, varillas y sus análogos de metales y materiales bioabsorbibles.
- 15 3. Un implante personalizado que se activa por genes para sustituir los defectos óseos en un mamífero, producido mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1.
4. Un implante personalizado que se activa por genes de acuerdo con la reivindicación 3, para su uso en el tratamiento de defectos óseos o atrofia del tejido óseo en dicho mamífero.

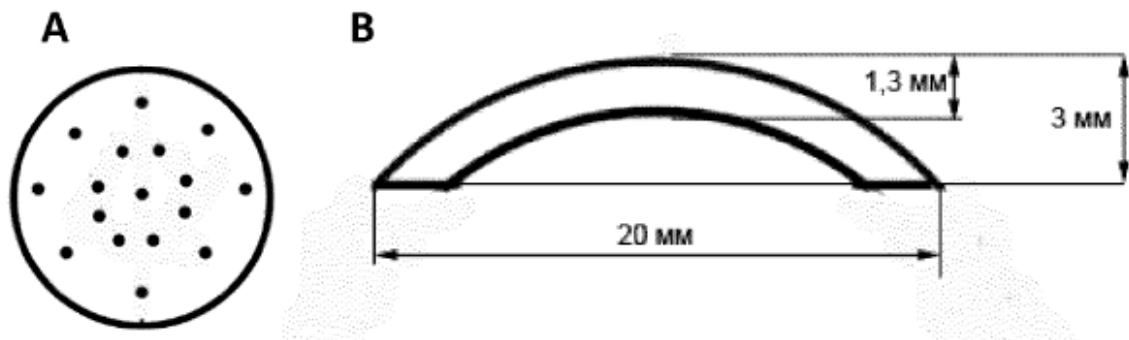


Fig. 1.

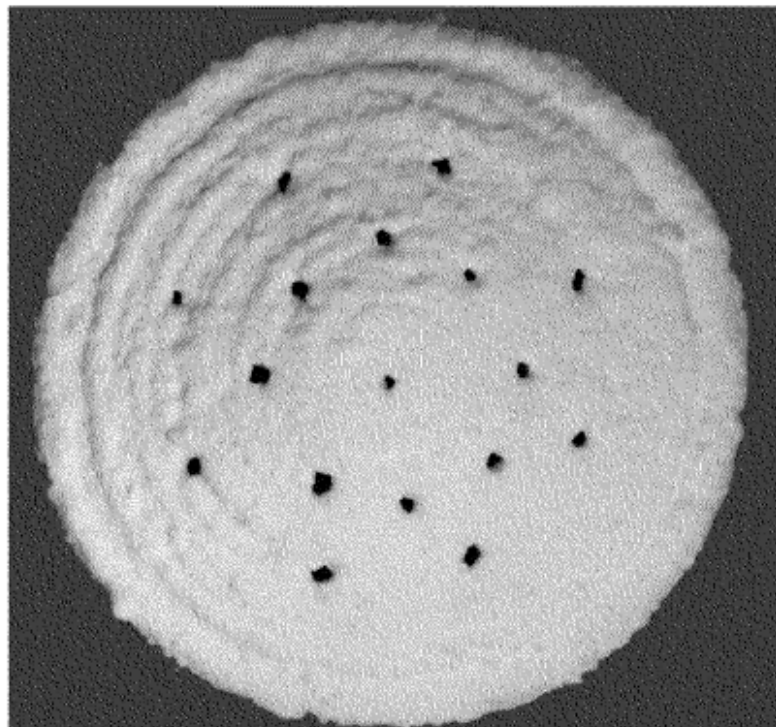


Fig. 2.

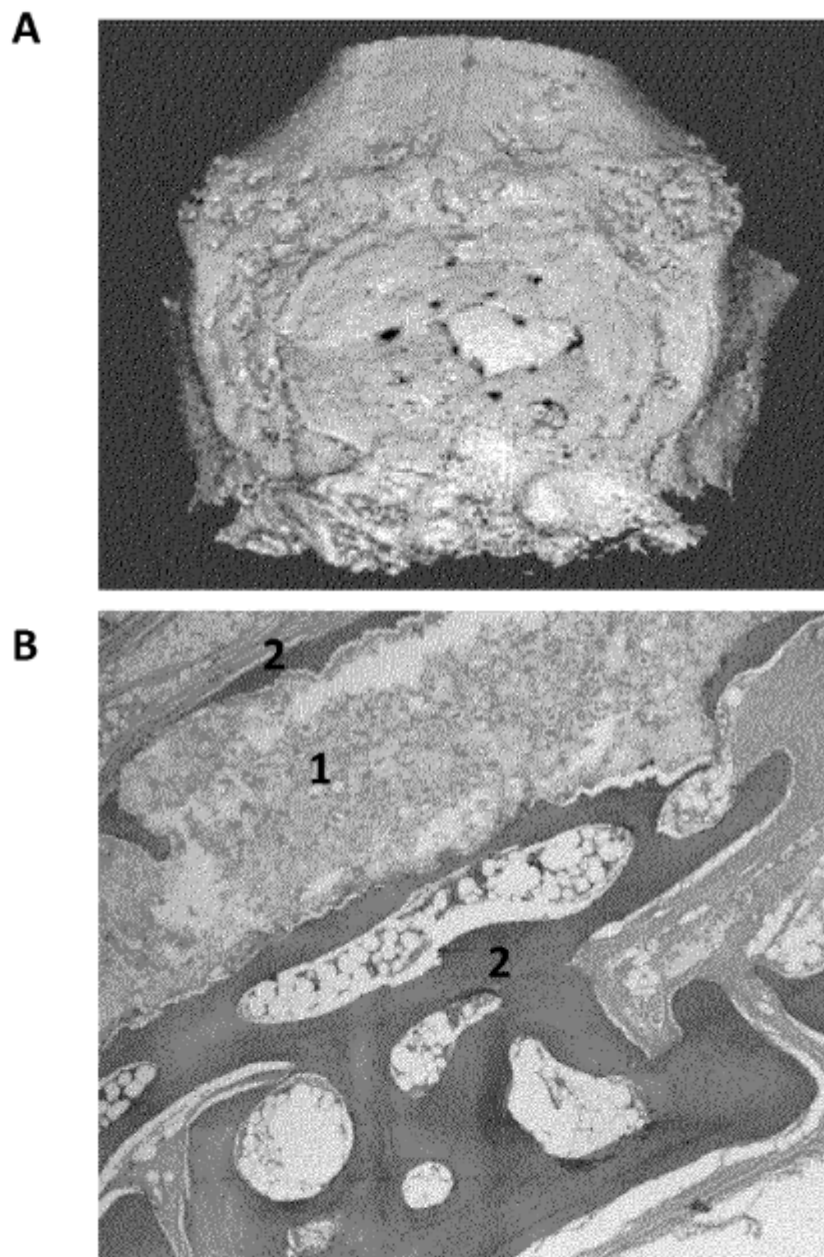


Fig. 3.

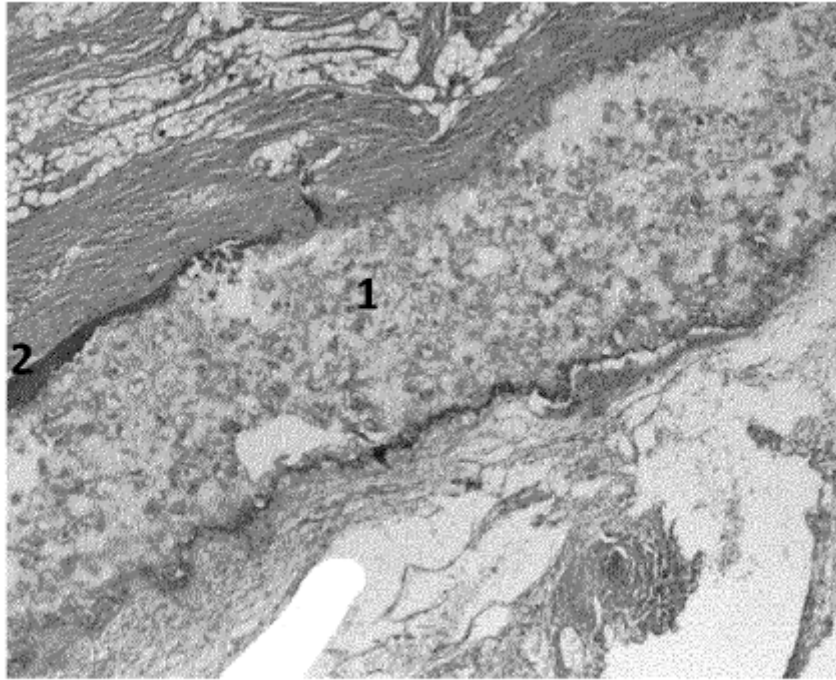


Fig. 4.

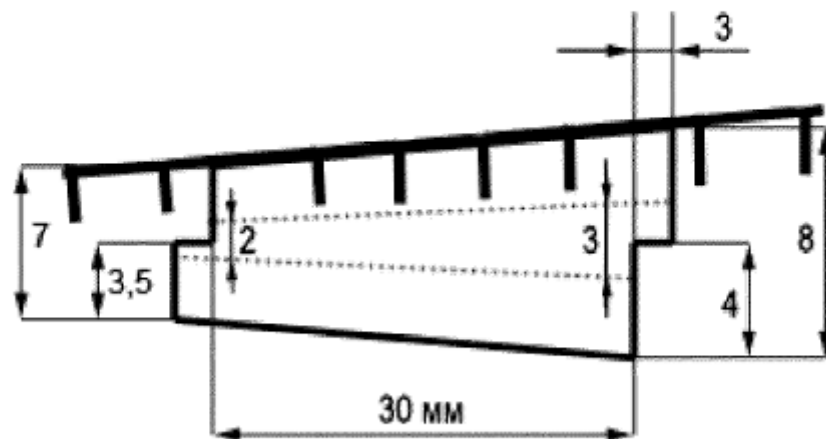


Fig. 5.

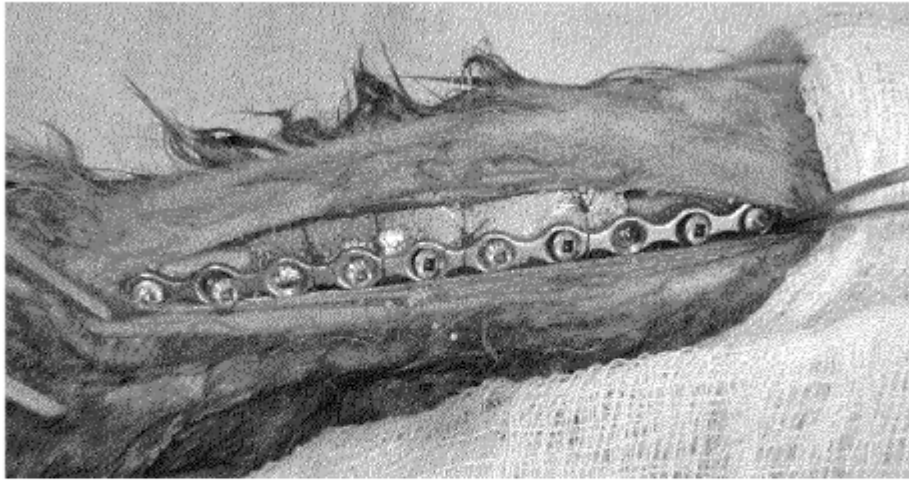


Fig. 6.

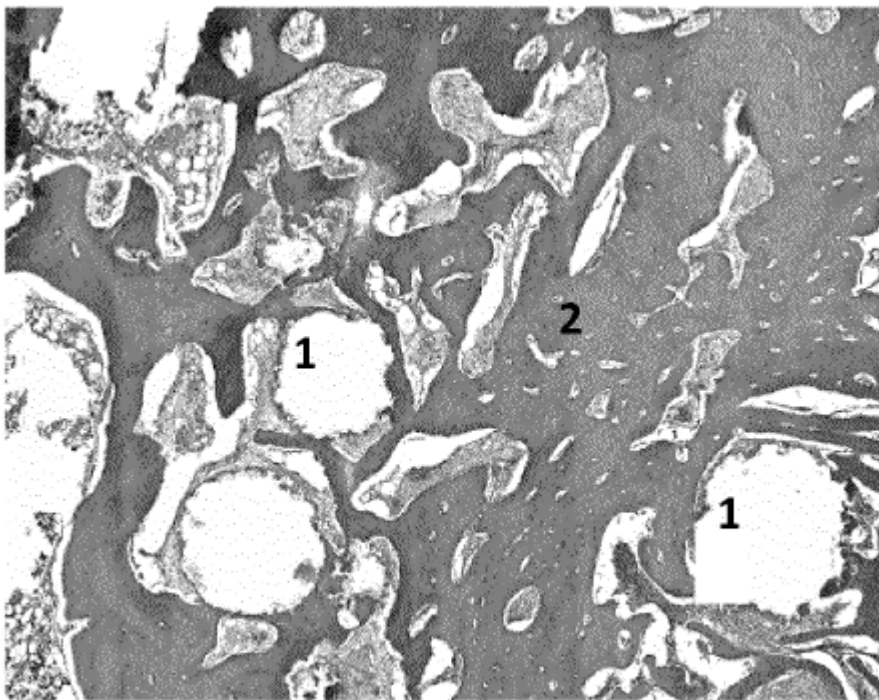


Fig. 7.