

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 296**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36	(2006.01)
A61L 27/38	(2006.01)
A61L 27/44	(2006.01)
A61L 27/52	(2006.01)
A61L 27/56	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2015 PCT/EP2015/068855**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2016 WO16024025**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2015 E 15763210 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3180043**

54 Título: **Un procedimiento para preparar un andamio poroso adecuado para su uso en la reparación de lesiones óseas, condrales u osteocondrales en un mamífero**

30 Prioridad:

15.08.2014 EP 14181154

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

20.06.2019

73 Titular/es:

**THE PROVOST, FELLOWS, FOUNDATION SCHOLARS, & THE OTHER MEMBERS OF BOARD, OF THE COLLEGE OF HOLY AND UNDIV. TRINITY OF QUEEN ELIZABETH NEAR DUBLIN (100.0%)
College Green
2 Dublin, IE**

72 Inventor/es:

**KELLY, DANIEL JOHN;
CUNIFFE, GRAINNE;
ALMEIDA, HENRIQUE;
ESWARAMOORTHY, RAJALAKSHMANAN;
BUCKLEY, CONOR;
DIAZ PEYNO, PEDRO y
BROWE, DAVID**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 717 296 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

Un procedimiento para preparar un andamio poroso adecuado para su uso en la reparación de lesiones óseas, condrales u osteocondrales en un mamífero

5

Introducción

La invención se refiere a un procedimiento para preparar un andamio poroso adecuado para su uso en la reparación de lesiones óseas, condrales u osteocondrales en un mamífero. La invención también se refiere a un andamio poroso adecuado para su uso en la reparación de lesiones óseas, condrales u osteocondrales en un mamífero, y a un andamio de múltiples capas adecuado para su uso en la reparación de lesiones osteocondrales en un mamífero.

10

En los seres humanos, un 95 % de las lesiones en la superficie articular de las articulaciones sinoviales implican el cartílago sin afectar al hueso subcondral (Hjelle *et al.*, 2002). Dichas lesiones no se curan de forma espontánea. De forma estimada, para 2019, solo en EE. UU., 5,4 millones de pacientes requerirán someterse a intervenciones quirúrgicas en las articulaciones y cartílagos para tratar dichas lesiones y otros cambios degenerativos. Las técnicas de estimulación de la médula ósea, tales como la microfractura, son las estrategias de reparación clínica más fácilmente disponibles para el cartílago articular (Getgood *et al.*, 2009). Al penetrar quirúrgicamente en el hueso subcondral, los hemocitoblastos de la médula ósea pueden migrar hacia la lesión y formar un tejido de reparación. En general, se produce un tejido fibrocartilaginoso mecánicamente inferior que solo proporciona alivio sintomático temporal. Están disponibles tratamientos alternativos basadas en células, tales como el implante de condrocitos autólogos (ICA), sin embargo, estos enfoques requieren dos estancias hospitalarias y son muy costosos (~35.000 €), lo que puede explicar su relativamente limitada aceptación clínica en comparación con las técnicas de estimulación de la médula. Por lo tanto, existe una significativa oportunidad comercial de obtener un tratamiento rentable de "un paso" o "en el quirófano" (tal como el andamio propuesto) para regenerar el cartílago articular dañado.

15

20

25

Los andamios fabricados usando una matriz extracelular (MEC) descelularizada han demostrado ser una gran promesa para la regeneración de tejidos dañados. Este enfoque se ha usado para desarrollar diferentes andamios específicos para tejidos (por ejemplo, válvulas cardíacas, vasos sanguíneos, piel y cartílago). En el caso del cartílago articular, numerosos estudios han demostrado que los andamios derivados del cartílago desvitalizado son condroinductores y demuestran ser una gran promesa para la regeneración de las articulaciones dañadas. Sin embargo, existe una serie de limitaciones asociadas con los andamios derivados de la MEC actuales, incluyendo un tamaño de poro no homogéneo con los andamios derivados de la MEC cartilaginosa actuales (que limita la infiltración celular en el andamio y da lugar al depósito no homogéneo de la matriz en el andamio), una falta de generación de cartílago hialino en el andamio o una lesión tratada con el andamio, un control deficiente del tamaño de poro del andamio, una descelularización ineficaz de la MEC antes de la fabricación del andamio, una variabilidad de la composición del andamio, que tiene un impacto en la producción comercial, y un control deficiente de la liberación de factores de crecimiento exógenos cargados en los andamios derivados de la MEC. Además, sigue sin quedar claro cómo se pueden usar los andamios derivados de la MEC para tratar lesiones que afectan a múltiples tejidos diferentes, tales como lesiones osteocondrales.

30

35

40

Es un objetivo de la invención superar al menos uno de los problemas mencionados anteriormente.

45

H.V. Almeida *et al.* "Controlled release of transforming growth factor- β 3 from cartilage-extra-cellular-matrix-derived scaffolds to promote chondrogenesis of human-joint-tissue-derived stem cells", ACTA BIOMATERIALIA 10 (2014), 4400-4409, XP055165890 divulgan la preparación de andamios porosos a partir de cartílago articular porcino micronizado y liofilizado.

50

Declaraciones de la invención

El solicitante ha descubierto que la liofilización de una suspensión de tejido de matriz extracelular (MEC) micronizada derivado de tejido de cartílago hialino (preferentemente cartílago articular) o tejido de placa de crecimiento proporciona andamios que tienen un tamaño de poro homogéneo (fig. 1) que demuestran un alto nivel de infiltración homogénea de células madre *in vitro* (fig. 2) y un alto nivel de depósito de matriz extracelular similar a cartílago (fig. 3). El solicitante ha empleado con éxito técnicas de descelularización para reducir lo suficiente el ADN xenogénico de los andamios (fig. 8). La matriz extracelular cartilaginosa consiste principalmente en glucosaminoglucanos (GAG) y colágeno de tipo II. El solicitante ha descubierto que reduciendo el contenido de glucosaminoglucanos de la MEC cartilaginosa usando un detergente o similar (fig. 8) y de ahí incrementando la proporción de colágeno con respecto a GAG en la MEC tratada, se mejora la capacidad resultante del andamio para inducir una condrogénesis consistente después de que se haya sembrado con células madre mesenquimales (fig. 9 y 10). El solicitante también ha descubierto que la reticulación de los andamios de la invención ralentiza la liberación de factores de crecimiento de los andamios (fig. 4), y que la reducción del contenido de glucosaminoglucanos de los andamios de la invención también ralentiza la liberación de factores de crecimiento del andamio (fig. 7). El solicitante también ha descubierto que los andamios formados a partir de la MEC de la placa de crecimiento micronizada generan una extensa mineralización de las lesiones craneales y femorales (figs. 23 y 24) y una formación de tejido

55

60

65

óseo potenciada (fig. 25), y que los andamios derivados de la MEC de la placa de crecimiento que se siembran con células madre mesenquimales soportan la formación del hueso endocondral en condiciones condrogénicas *in vitro* (figs. 19-21).

5 El solicitante también ha descubierto que se puede solubilizar la MEC tratada o natural mediante solubilización de la MEC. Después de su solubilización, la MEC se puede reticular y liofilizar para crear andamios. El procedimiento de solubilización empleado elimina la gran mayoría de GAG y ADN xenogénico residual del andamio resultante. (Fig. 25).

10 En consecuencia, en un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para preparar un andamio poroso adecuado para su uso en la reparación de lesiones óseas, condrales u osteocondrales en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la etapa de:

- 15 • proporcionar una suspensión de tejido de matriz extracelular (MEC) micronizada [o un gel que comprenda tejido de matriz extracelular (MEC) solubilizada y reticulada (que no forma parte de la invención)]; y
- liofilizar la suspensión [o gel (que no forma parte de la invención)] para proporcionar el andamio poroso, en el que se trata la matriz extracelular para reducir el contenido de GAG a menos de un 90 % del contenido de GAG de MEC no tratada, y en el que el tejido de MEC es MEC cartilaginosa.

20 Por tanto, el material de MEC que se liofiliza puede ser una suspensión formada a partir de MEC micronizada o puede ser un gel (que no forma parte de la invención) formado mediante solubilización de MEC (opcionalmente MEC micronizada) que se reticula, típicamente se reticula químicamente, para formar un gel antes de su liofilización. Preferentemente, se reticula la solución de MEC digerida enzimáticamente antes de su liofilización.

25 En un modo de realización, se solubiliza la MEC mediante digestión enzimática. En un modo de realización, se microniza la MEC antes de su solubilización.

30 Preferentemente, la suspensión comprende 100-400 mg/ml de tejido de MEC micronizada, idealmente 200-300 mg/ml de tejido de MEC micronizada.

Preferentemente, el tejido de matriz extracelular micronizada tiene un tamaño de partícula medio de 10-200 micrómetros, idealmente 20-70 micrómetros.

35 Típicamente, el tejido de matriz extracelular micronizada es tejido de matriz extracelular sometida a molienda criogénica.

40 La matriz extracelular se trata para reducir el contenido de GAG a menos de un 90 % del contenido de GAG de MEC no tratada. Preferentemente, se trata la matriz extracelular para reducir el contenido de GAG después de que se micronice la matriz extracelular. Típicamente, se reticula el andamio poroso.

El tejido de MEC es MEC cartilaginosa. Preferentemente, la matriz extracelular es MEC de cartílago hialino (preferentemente cartílago articular) o MEC de la placa de crecimiento.

45 Preferentemente, se descelulariza la matriz extracelular antes o después de su micronización, idealmente después de su micronización.

50 De forma adecuada, el procedimiento de la invención incluye una etapa adicional de sembrar el andamio con un material biológico, por ejemplo, células, preferentemente células mesenquimales, o una molécula biológica, por ejemplo, un factor de crecimiento. Esto se podría lograr, por ejemplo, embebiendo el andamio preparado en una solución que contenga el factor de crecimiento o las células de interés. De forma adecuada, el material biológico o molécula (biológica) se selecciona de los grupos de: células; y factores de crecimiento biológicos. Típicamente, los factores de crecimiento biológicos se seleccionan del grupo que consiste en uno o más de la superfamilia de TGF- β , (IFG, FGF, BMP, PDGF, EGF) o cannabinoides. Estos factores de crecimiento también se pueden incluir durante el procedimiento de producción, a diferencia del embebido posterior a la fabricación de los andamios.

55 En un modo de realización preferente, la invención proporciona un procedimiento para preparar un andamio desvitalizado poroso adecuado para su uso en la reparación de lesiones óseas, condrales u osteocondrales en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la etapa de:

- 60 • proporcionar un tejido de matriz extracelular (MEC) micronizada que tenga un tamaño de partícula medio de 30-70 micrómetros;
- mezclar la matriz extracelular micronizada con un líquido para proporcionar una suspensión que comprenda 200-300 mg/ml de MEC micronizada; y

- liofilizar la suspensión para proporcionar el andamio poroso.

5 La invención también se refiere a un procedimiento de preparación de un andamio de múltiples capas que comprende las etapas de preparar una primera capa que comprende un andamio poroso de acuerdo con un procedimiento de la invención, preparar una segunda capa que comprende un andamio poroso de acuerdo con un procedimiento de la invención, en el que la primera capa se une a la segunda capa.

10 Preferentemente, el procedimiento incluye una etapa de unir la primera capa a la segunda capa para formar el andamio de múltiples capas.

15 En un modo de realización, la primera capa comprende MEC cartilaginosa de una primera fuente y la segunda capa comprende MEC cartilaginosa de una fuente diferente a la primera fuente. Preferentemente, la primera fuente de MEC es MEC de cartílago hialino y la segunda fuente de MEC es MEC de la placa de crecimiento. El último tipo de andamios de múltiples capas es adecuado para la reparación o el tratamiento de lesiones osteocondrales.

20 De forma adecuada, las capas se unen entre sí por medio de liofilización. Por tanto, por ejemplo, las capas se pueden liofilizar independientemente, y, a continuación, disponerse en un molde y liofilizarse juntas. De forma alternativa, se puede liofilizar una capa y, a continuación, disponerse en un molde con una suspensión y liofilizarse para formar el andamio en capas. Otros procedimientos de unión de las dos capas incluyen el uso de adhesivos, costuras y capas de enlace intermedias.

25 En un modo de realización preferente, la invención también se refiere a un procedimiento de preparación de un andamio de múltiples capas que comprende las etapas de preparar una primera capa que comprende un andamio poroso de acuerdo con un procedimiento de la invención, en el que la MEC es MEC cartilaginosa, preparar una segunda capa que comprende un andamio poroso de acuerdo con un procedimiento de la invención, en el que la MEC cartilaginosa es MEC de la placa de crecimiento,

30 en el que la primera capa se une a la segunda capa.

La invención también se refiere a un andamio poroso formado de acuerdo con un procedimiento de la invención. La invención también se refiere a un andamio poroso de múltiples capas formado de acuerdo con un procedimiento de la invención.

35 La invención también proporciona un andamio poroso típicamente adecuado para su uso en la reparación de lesiones óseas, condrales u osteocondrales en un mamífero y que comprende una matriz liofilizada porosa formada a partir de matriz extracelular descelularizada micronizada [o matriz extracelular solubilizada y reticulada (que no forma parte de la invención)], en el que la matriz extracelular comprende menos de un 90 % del contenido de GAG de MEC natural, y en el que el tejido de MEC es MEC cartilaginosa.

40 Preferentemente, el tejido de matriz extracelular micronizada tiene un tamaño de partícula medio de 10-200 micrómetros, idealmente 20-70 micrómetros.

45 Típicamente, el tejido de matriz extracelular micronizada es tejido de matriz extracelular sometida a molienda criogénica.

La matriz extracelular comprende un contenido de GAG reducido, es decir, menos de un 90 % del contenido de GAG de MEC natural.

50 Típicamente, se reticula el andamio poroso.

Preferentemente, la matriz extracelular cartilaginosa es MEC de cartílago hialino (idealmente MEC de cartílago articular) o MEC de la placa de crecimiento.

55 Preferentemente, se descelulariza la matriz extracelular micronizada.

60 De forma adecuada, el andamio poroso se siembra con un material biológico, por ejemplo, células, preferentemente células madre mesenquimales o una molécula biológica. Preferentemente, la MEC cartilaginosa es MEC de la placa de crecimiento o de cartílago hialino, y el andamio poroso se siembra con células, preferentemente células madre mesenquimales.

65 La invención también proporciona un andamio poroso de acuerdo con la invención adecuado para su uso en la reparación de lesiones condrales en un mamífero, en el que la matriz extracelular es una matriz extracelular de cartílago hialino (idealmente articular).

La invención también proporciona un andamio poroso de acuerdo con la invención adecuado para su uso en la reparación de lesiones óseas en un mamífero, en el que la matriz extracelular cartilaginosa es una matriz extracelular de tejido de la placa de crecimiento.

5 Un andamio de múltiples capas típicamente adecuado para su uso en la reparación de lesiones osteocondrales en un mamífero y que tiene una primera capa que comprende un andamio poroso de la invención y una segunda capa que comprende un andamio poroso de la invención, en el que la primera capa se une a la segunda capa.

10 En un modo de realización, la primera capa de andamio poroso comprende MEC cartilaginosa de una primera fuente y la segunda capa de andamio poroso comprende MEC cartilaginosa de una fuente diferente a la primera fuente.

15 Preferentemente, la primera fuente de MEC cartilaginosa es MEC de cartílago hialino y la segunda fuente de MEC cartilaginosa es MEC de la placa de crecimiento. El último tipo de andamios de múltiples capas es adecuado para la reparación o el tratamiento de lesiones osteocondrales.

20 De forma adecuada, las capas se unen a la perfección, por ejemplo, por medio de liofilización. Por tanto, por ejemplo, las capas se pueden liofilizar independientemente, y, a continuación, disponerse en un molde y liofilizarse juntas. De forma alternativa, se puede liofilizar una capa y, a continuación, disponerse en un molde con una suspensión y liofilizarse para formar el andamio en capas. Otros procedimientos de unión de las dos capas incluyen el uso de adhesivos, costuras y capas de enlace intermedias.

25 La invención también se refiere a un andamio poroso o a un andamio de múltiples capas de la invención para su uso en un procedimiento de tratamiento de lesiones óseas, condrales u osteocondrales en un mamífero, en el que el andamio poroso se inserta en la lesión.

La invención también se refiere a un andamio poroso de la invención para su uso en un procedimiento de tratamiento de lesiones condrales en un mamífero, en el que el andamio poroso comprende MEC cartilaginosa y en el que el andamio poroso se inserta en la lesión condral.

30 La invención también se refiere a un andamio poroso de la invención para su uso en el tratamiento de lesiones óseas en un mamífero, en el que el andamio poroso comprende MEC cartilaginosa de la placa de crecimiento y en el que el andamio poroso se inserta en la lesión ósea. El andamio poroso comprende células, idealmente células madre mesenquimales, aunque el andamio también puede estar libre de células.

35 La invención también se refiere a un andamio de múltiples capas de la invención para su uso en el tratamiento de lesiones osteocondrales en un mamífero, en el que el andamio de múltiples capas comprende una primera capa de andamio poroso que comprende MEC de cartílago hialino y una segunda capa de andamio poroso que comprende MEC cartilaginosa de la placa de crecimiento, y en el que el andamio de múltiples capas se inserta en la lesión osteocondral. La primera y/o segunda capa del andamio poroso puede comprender células, idealmente células madre mesenquimales, aunque el andamio está preferentemente libre de células.

40 Se divulga un gel (que no forma parte de la invención) adecuado para su uso en la reparación de lesiones óseas, condrales u osteocondrales en un mamífero y que comprende una base de gel y MEC micronizada distribuida homogéneamente por toda la base de gel.

45 Típicamente, la base de gel comprende fibrina.

Idealmente, el gel es inyectable.

50 También se divulga un procedimiento de preparación de un gel (que no forma parte de la invención) adecuado para su uso en la reparación de lesiones óseas, condrales u osteocondrales en un mamífero y que comprende las etapas de mezclar MEC micronizada con una base de gel. Típicamente, el procedimiento comprende una etapa de mezclar MEC micronizada con un precursor de base de gel líquido, y, a continuación, añadir a la mezcla un activador que pueda convertir el precursor de base de gel líquido en una base de gel. De forma adecuada, el precursor de base de gel es fibrinógeno, el activador es trombina.

55 También se divulga un procedimiento de preparación de un andamio desvitalizado poroso basado en MEC (que no forma parte de la invención) que comprende la etapa de mezclar células productoras de MEC en una base de hidrogel, cultivar la mezcla *in vitro* de tal manera que las células productoras de MEC depositen MEC en la mezcla, y, a continuación, liofilizar la mezcla para proporcionar el andamio desvitalizado poroso basado en MEC.

60 Típicamente, las células productoras de MEC se seleccionan de condrocitos y osteoblastos.

65 La invención también se refiere a un andamio poroso basado en MEC formado de acuerdo con el procedimiento de la invención.

La invención también se refiere a un andamio poroso basado en MEC formado de acuerdo con el procedimiento de la invención en forma micronizada.

5 También se divulga una MEC de la placa de crecimiento micronizada, una suspensión que comprende MEC micronizada, o un andamio liofilizado formado a partir de una suspensión de MEC de la placa de crecimiento micronizada.

También se divulga un andamio poroso formado a partir de MEC de la placa de crecimiento liofilizada y micronizada.

10 También se divulga un andamio liofilizado poroso que comprende MEC sometida a molienda criogénica.

También se divulga un andamio poroso formado a partir de MEC de la placa de crecimiento solubilizada y reticulada, liofilizada.

15 La invención también se refiere a un andamio poroso de múltiples capas que comprende al menos una primera y segunda capas, comprendiendo la primera capa un andamio liofilizado poroso formado a partir de MEC de cartílago hialino micronizada y comprendiendo la segunda capa un andamio liofilizado poroso formado a partir de MEC cartilaginosa de la placa de crecimiento micronizada.

20 También se divulga un andamio poroso basado en MEC de la placa de crecimiento formado de acuerdo con el procedimiento de la invención una forma solubilizada.

Breve descripción de las figuras

25 **FIG. 1:** *La concentración modula la morfología del andamio.* Las micrografías de iones de helio (MIH) mostraron una arquitectura diferente en los andamios cuando se alteró la concentración de suspensión de MEC cartilaginosa: (A) 250 mg/ml; (B) 500 mg/ml; (C) 1000 mg/ml. El tamaño de poro medio disminuyó con una concentración creciente de MEC.

30 **FIG. 2:** *Distribución de células vivas.* Microscopia confocal en el día 1 y en el día 28 de células madre humanas derivadas del cuerpo adiposo infrarrotuliano sembradas en andamios derivados de la MEC: (A) 250 mg/ml, (B) 500 mg/ml y 1000 mg/ml. La imagen representa una sección transversal de los andamios derivados de la MEC. Se observó una penetración celular deficiente en el día 1 en los andamios con (B) 500 mg/ml y (C) 1000 mg/ml, lo que contrasta con el andamio con 250 mg/ml, donde se observó una infiltración celular homogénea (A). En el día 28, el andamio con 1000 mg/ml de MEC continuó mostrando una infiltración deficiente de células madre (F).

35 **FIG. 3:** *Depósito de sGAG en el día 0, 7, 14 y 28.* Imágenes histológicas de tinción de glucosaminoglucanos (GAG) (azul alcian) y núcleos celulares (rojo nuclear rápido) para andamios derivados de la MEC —250, 500 y 1000 mg/ml— en el día 0, 7, 14 y 28 de cultivo (A). En (A) es posible observar un fuerte depósito de GAG y distribución de las células para el andamio con 250 mg/ml. Con un aumento alto es posible observar el superior depósito de GAG para el andamio con 250 (B), seguido de 500 (C) y 1000 mg/ml (D).

40 **FIG. 4:** *Perfil de liberación de TGF-β3 para construcciones con o sin reticulación por EDAC.* Los resultados de ELISA para la liberación de TGF-β3 en los medios a partir del andamio derivado de la MEC cargado con TGF-β3 indican una tasa de liberación más lenta para los andamios con reticulación por EDAC, con una diferencia significativa en el día 4 (n=6, *p<0,05).

45 **FIG. 5:** *Morfología de andamios con sGAG adaptados.* Las micrografías de iones de helio (MIH) mostraron un tamaño de poro y una arquitectura alterados en la adaptación de la concentración de GAG de los andamios: (A) GAG al 5 %; (B) GAG al 50 %; (C) GAG al 100 %. El tamaño de poro medio se incrementó con una concentración de GAG decreciente.

50 **FIG. 6:** *Histología de sGAG.* Tinción de GAG en explantes de cartílago con GAG adaptados descelularizados. Las micrografías mostraron la adaptación de la concentración de GAG: (A) GAG al 5 %; (B) GAG al 50 %; (C) 100

55 **FIG. 7:** *Perfil de liberación de TGF-β3 de andamios de MEC cartilaginosa con GAG adaptados.* Resultados de ELISA para la liberación de TGF-β3 en los medios a partir del andamio 4 derivado de la MEC cargado con TGF-β3 (n=4). Al eliminar los sGAG de la MEC antes de la fabricación del andamio, es posible ralentizar la liberación de los factores de crecimiento de la construcción.

FIG. 8: *Ensayo bioquímico para determinar el contenido de ADN y GAG del andamio con GAG adaptados.*

60 **FIG. 9:** *Ensayos bioquímicos realizados en tejidos cartilaginosos diseñados in vitro usando andamios con GAG adaptados sembrados con células madre humanas*

FIG. 10: Tinción histológica para sGAG (azul alcian) y colágeno (rojo picrosirius) de tejidos cartilagosos diseñados *in vitro* usando andamios derivados de la MEC sembrados con células madre humanas.

5 **FIG. 11:** Aspecto general de las construcciones de fibrina-partículas de MEC posterior a la gelificación

FIG. 12: Perfil de liberación de TGF- β 3 para hidrogel de fibrina cargado con partículas de MEC. Resultados de ELISA para la liberación de TGF- β 3 en los medios a partir de partículas derivadas de la MEC cargadas con TGF- β 3 (n=4).

10 **FIG. 13:** Contenido de GAG de tejidos cartilagosos diseñados *in vitro* usando hidrogeles cargados con partículas de MEC. Los hidrogeles de fibrina que contenían partículas de MEC cargados con TGF- β 3 mostraron una acumulación de GAG más alta que las construcciones donde TGF- β 3 se añadió directamente a los medios o bien se añadió para controlar las micropartículas (MP) de gelatina.

15 **FIG. 14:** Histología. Tinción de GAG y colágeno de tejidos cartilagosos diseñados *in vitro* en hidrogeles de fibrina cargados con partículas derivadas de la MEC.

20 **FIG. 15:** Morfología general después de la generación de tejidos *in vivo* usando la construcción inyectable propuesta.

FIG. 16: Histología. Tinción de GAG y colágeno para tejidos generados *in vivo*.

25 **FIG. 17:** Un molde de PDMS representativo usado para controlar la liofilización de la MEC de la placa de crecimiento en dimensiones específicas.

FIG. 18: Esquema que esboza las etapas implicadas en la osificación endocondral, mediante el que una plantilla de cartílago se convierte en un hueso maduro.

30 **FIG. 19:** Análisis histológico de las construcciones en el día 0 y después de 28 días de cultivo en medio condrogénico o bien osteogénico, lo que demuestra el depósito de los principales constituyentes del cartílago, sGAG y colágeno.

35 **FIG. 20:** Construcciones de MEC de la placa de crecimiento sembradas con CMM con tinción positiva de colágeno de tipo II y colágeno de tipo X.

40 **FIG. 21:** Se observó depósito mineral en andamios de MEC de la placa de crecimiento sembrados con CMM cultivados en medio condrogénico o bien osteogénico, en comparación con las CMM sembradas en una construcción de MEC cartilaginosa que solo se mineralizó en condiciones de cultivo osteogénico.

FIG. 22: Una imagen de una construcción en dos capas que contiene MEC cartilaginosa en la capa superior y MEC de la placa de crecimiento en la capa inferior y análisis histológico del tejido depositado por las CMM sembradas en andamios osteocondrales después de 28 días en cultivo.

45 **FIG. 23:** Imágenes reconstruidas de lesiones craneales no tratadas y tratadas con el andamio de la placa de crecimiento a las 4 y 8 semanas que muestran el nivel de mineralización logrado.

FIG. 24: Imágenes reconstruidas de lesiones femorales no tratadas y tratadas con el andamio de la placa de crecimiento a las 4 y 8 semanas que muestran el nivel de mineralización logrado.

50 **FIG. 25:** Análisis histológico del tejido de reparación formado por toda la lesión craneal después de 4 y 8 semanas (a) no tratada o bien (b) tratada con el andamio de la placa de crecimiento, (c) imágenes de gran resolución del tejido de reparación, que muestran la formación de hueso *de novo* tanto sobre como en el tejido de MEC de la placa de crecimiento original.

55 **FIG. 26:** Ensayos bioquímicos para determinar el contenido de ADN y GAG del andamio de MEC solubilizada (a). Se generaron andamios usando MEC micronizada (contenido alto de GAG) o MEC solubilizada. Imágenes macroscópicas de andamios de MEC solubilizada húmeda y seca (b).

60 **FIG. 27:** Ensayos bioquímicos realizados en tejidos cartilagosos diseñados *in vitro* usando andamios de MEC solubilizada o micronizada sembrados con células madre humanas (a). Se generaron andamios usando MEC micronizada (contenido alto de GAG) o MEC solubilizada. Morfología general de los tejidos generados usando andamios (b).

65 **Descripción detallada de la invención**

Definiciones

- 5 En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "poroso", aplicado a un andamio, como que significa que tiene una porosidad de al menos un 90 % como se determina usando el procedimiento de Gleeson *et al* (J.P. Gleeson, N.A. Plunkett, F.J. O'Brien - Addition of hydroxyapatite improves stiffness, interconnectivity and osteogenic potential of a highly porous collagen-based scaffold for bone tissue regeneration - Eur Cell Mater, 20 (2010), pp. 218-223). En un modo de realización, el andamio (o cada capa en el andamio) tiene una porosidad de al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 %. Idealmente, el andamio tiene una porosidad de al menos un 98 %, idealmente de al menos un 98,5 %.
- 10 En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "lesión ósea" como que significa cualquier lesión en el tejido óseo.
- 15 En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "lesión condral" como que significa cualquier lesión en la superficie articular de una articulación que no penetra a través del hueso subcondral.
- 20 En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "lesión osteocondral" como que significa una lesión en la superficie articular que afecta tanto al cartílago articular como al hueso subyacente.
- 25 En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "tejido de matriz extracelular" o "matriz extracelular" o "MEC" como que significa una colección de moléculas extracelulares segregadas por células que proporciona soporte estructural y bioquímico a las células circundantes. La MEC se puede obtener de un mamífero, por ejemplo, un ser humano o un mamífero no humano, o se puede diseñar *in vitro* usando técnicas publicadas, por ejemplo, Vinardell *et al* (Vinardell, T., Sheehy, E., Buckley, C.T., Kelly, D.J. A comparison of the functionality and in vivo phenotypic stability of cartilaginous tissues engineered from different stem cells sources. Tissue Engineering Part A, 18(11-12), 1161-1170, 2012) y Buckley *et al* (Buckley, C.T., Vinardell, T., Kelly, D.J. Oxygen Tension Differentially Regulates the Functional Properties of Cartilaginous Tissues Engineered from Infrapatellar Fat Pad Derived MSCs and Articular Chondrocytes. Osteoarthritis and Cartilage, 18 (10), 1345-1354, 2010). Los ejemplos de matriz extracelular para el propósito de la presente invención incluyen MEC cartilaginosa (obtenida de tejido de cartílago articular porcino) y MEC de la placa de crecimiento (típicamente obtenida de la placa epifisaria de la tibia o fémures porcinos).
- 30 En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "MEC de cartílago hialino" como que significa MEC obtenida de cartílago hialino, que es un tejido encontrado, por ejemplo, en el oído y la nariz y en las superficies de las articulaciones. Se compone principalmente de colágeno de tipo II y sulfato de condroitina.
- 35 En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "MEC de cartílago articular" como que significa MEC obtenida del cartílago articular, que es una forma de cartílago hialino encontrada en el extremo articular de las articulaciones.
- 40 En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "MEC de la placa de crecimiento" o "MEC de tejido de la placa de crecimiento" como que significa la MEC cartilaginosa obtenida de tejido de la placa de crecimiento de los huesos en desarrollo, típicamente huesos largos en desarrollo. Esto podría incluir a la placa epifisaria en la metáfisis de un hueso largo, o cartílago articular de articulaciones inmaduras de forma esquelética, ya que también se sabe que este tejido actúa como una placa de crecimiento de superficie durante el desarrollo y la maduración esquelética.
- 45 En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "micronizada", aplicado a la MEC, como que significa proporcionada en forma particulada, en la que las partículas de MEC tienen un tamaño de partícula medio de menos de 200 micrómetros, como se determina usando microscopia óptica de rutina. Preferentemente, la MEC micronizada tiene un tamaño de partícula medio de menos de 150 o 100 micrómetros. Idealmente, la MEC micronizada tiene un tamaño de partícula medio de entre 20 y 200 micrómetros, 20 y 150 micrómetros, 20 y 100 micrómetros, 20 y 70 micrómetros, 30 y 70 micrómetros, 30 y 60 micrómetros, 40 y 60 micrómetros e idealmente aproximadamente de 50 micrómetros. Los procedimientos de micronización incluyen molienda, molienda criogénica.
- 50 En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "sometido a molienda criogénica" como que significa un procedimiento en el que un material se congela criogénicamente y, a continuación, se muele. Los ejemplos de máquinas de molienda criogénica incluyen la RETCH CRYOMILL™.
- 55 En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "solubilizado" como que significa un procedimiento mediante el que el tejido de MEC se digiere, idealmente se digiere enzimáticamente, para solubilizarse en un disolvente acuoso. De forma adecuada, se conocerán agentes de solubilización por el experto en la técnica, e incluyen enzimas y agentes de desnaturalización, tales como urea. Un ejemplo de una enzima que se puede usar para digerir tejido de MEC para solubilizarse es una proteasa, por ejemplo, pepsina o colagenasa. Preferentemente, la MEC solubilizada será un colágeno purificado con eliminación sustancial de GAG y ADN xenogénico. Idealmente,
- 60
- 65

la MEC solubilizada tendrá una eliminación de más de un 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de GAG y ADN en comparación con el tejido de MEC natural.

5 En la presente memoria descriptiva, el término "liofilización", aplicado a una suspensión, se refiere a un procedimiento en el que la suspensión se congela, típicamente a una temperatura de congelación final de -10 °C a -70 °C y, a continuación, se sublima bajo presión. En un modo de realización, la temperatura de congelación final deseada está entre -10 °C y -70 °C. De forma adecuada, la temperatura de congelación final deseada está entre -30 °C y -50 °C. Típicamente, la temperatura de congelación final deseada está entre -35 °C y -45 °C, idealmente aproximadamente en -40 °C. En un modo de realización de la invención, se lleva a cabo la congelación o liofilización a una tasa de enfriamiento constante. Esto significa que la tasa de enfriamiento no varía en más de +/- 10 % de la tasa de enfriamiento objetivo, es decir, si la tasa de enfriamiento deseada es 1,0 °C/min y la tasa de enfriamiento real varía entre 0,9 °C/min y 1,1 °C/min, a pesar de todo, esto todavía se consideraría una tasa de enfriamiento constante. Típicamente, la tasa de enfriamiento constante está entre 0,1 °C/min a 10 °C/min. Preferentemente, se lleva a cabo la liofilización a una tasa de enfriamiento constante de entre 0,5 °C/min a 1,5 °C/min. Más preferentemente, se lleva a cabo la congelación o liofilización a una tasa de enfriamiento constante de entre 0,8 °C/min a 1,1 °C/min. Típicamente, se lleva a cabo la congelación o liofilización a una tasa de enfriamiento constante de 0,9 °C/min. La temperatura de la cámara de liofilización al comienzo del procedimiento de liofilización (es decir, cuando la suspensión se dispone en la cámara) normalmente es mayor de 0 °C, preferentemente a aproximadamente temperatura ambiente. La etapa de sublimación se lleva a cabo, en general, después de que se alcance la temperatura de congelación final. Esta etapa implica calentar la cámara de liofilización a una temperatura de sublimación (en general de aproximadamente 0 °C), preferentemente a una tasa de calentamiento constante. El procedimiento incluye típicamente una etapa de sublimación final donde se sublima a vacío una fase de hielo en el andamio formado durante un periodo de tiempo adecuado.

25 En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "suspensión" como que se significa una suspensión de MEC micronizada en un disolvente, de forma adecuada, un disolvente acuoso, por ejemplo, agua. Típicamente, la suspensión comprende menos de 500, 400, 300 mg/ml de MEC micronizada. De forma adecuada, la suspensión comprende 100-500, 100-400, 200-300, 230-270, e idealmente aproximadamente 250 mg/ml de MEC micronizada.

30 En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "reticulado" como que significa tratado para introducir reticulaciones entre moléculas poliméricas diferentes en la MEC. La MEC puede ser MEC micronizada o MEC solubilizada. Se puede realizar la reticulación en la MEC solubilizada o en el andamio liofilizado formado. Típicamente, se reticula el andamio mediante uno o más de los medios seleccionados del grupo que comprende: reticulación por deshidratación térmica (DHT); y reticulación química. Cuando se realiza la reticulación en la MEC solubilizada, el agente de reticulación es típicamente un agente de reticulación química. Se conocerán agentes y procedimientos de reticulación química adecuados por los expertos en la técnica e incluyen un glixal, clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDAC) o glutaraldehído. Idealmente, se reticula el andamio usando reticulación por DHT y EDAC. La reticulación se puede realizar en cualquier paso del procedimiento de fabricación. En un modo de realización preferente, se puede controlar la simetría de los poros del andamio variando el grado de reticulación en cada capa respectiva usando procedimientos de reticulación consabidos para un experto en la técnica. De manera similar, en otro modo de realización, se puede variar la permeabilidad o conductividad de flujo del andamio variando las propiedades mecánicas del andamio usando reticulación o bien otras metodologías de mejora de la rigidez conocidas por un experto en la técnica.

45 En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "GAG" como que significa glucosaminoglucanos, en particular, glucosaminoglucanos sulfatados.

50 En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "contenido de GAG reducido", aplicado a la MEC, de una fuente dada como que significa un contenido de GAG que se reduce en comparación con la MEC natural de la misma fuente, por ejemplo, menos de un 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % o 5 % del contenido GAG de la MEC natural. De acuerdo con la invención, el contenido de GAG se reduce a menos de un 90 % del contenido de GAG de MEC natural no tratada. Los procedimientos de reducción del contenido de GAG incluyen el uso de tampones, detergentes (tales como dodecilsulfato de sodio o Triton-X o desoxicolato de sodio) u otros productos químicos (por ejemplo, condroitinasa ABC) conocidos por reducir el contenido de sGAG de los tejidos.

60 En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "descelularizado" o "desvitalizado" aplicado a un material (por ejemplo, MEC, un andamio o un gel) como que significa que el contenido celular del material se reduce parcial o preferentemente de forma completa. El procedimiento de descelularización de un material incluye la digestión química de ácidos nucleicos, posiblemente tras la eliminación parcial o total de los componentes de la matriz de la MEC.

65 En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "siembra", aplicado a un andamio, como que significa incorporar un material biológico en un andamio. El procedimiento de siembra de un andamio incluye embeber el andamio en una solución que contenga el material biológico durante un tiempo suficiente para permitir que el material biológico se infiltre en los poros del andamio.

En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "células" como que significa cualquier tipo de célula, en particular, células madre, condrocitos y osteoblastos. Preferentemente, las células son células madre mesenquimales.

En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "material biológico" como que significa proteínas, péptidos, ácido nucleico, construcciones de ácido nucleico, vectores de ácido nucleico o moléculas químicas que tienen actividad biológica. Preferentemente, el material biológico comprende un factor de crecimiento biológico, por ejemplo, uno o más de la superfamilia de TGF- β , (IFG, FGF, BMP, PDGF, EGF) o cannabinoides.

En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "cannabinoides" como que significa un compuesto biológico que se puede derivar de forma natural o sintética y que actúa sobre los receptores cannabinoides de tipo 1 y/o 2 (CBI y CB₂), por ejemplo, Δ 9-tetrahidrocannabinol (Δ 9-THC).

En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "base de gel" como que significa una matriz que tiene tanto propiedades sólidas como líquidas. Una base de gel ejemplar es un gel de agarosa.

En la presente memoria descriptiva, se debe entender el término "inyectable" como que significa que el gel es lo suficiente deformable para posibilitar que se inyecte en una lesión en el cartílago o hueso.

Experimental

Desarrollo de andamios derivados de la MEC descelerizada con tamaño de poro uniforme.

Se obtuvo el cartílago usado en la fabricación de andamios derivados de la MEC, en condiciones estériles, de los cóndilos femorales de cerdas (3 meses de edad) poco después de su sacrificio. El cartílago se fraccionó en primer lugar en pequeños fragmentos usando un bisturí. A continuación, se fraccionaron las partículas cartilaginosas usando un molino criogénico (6770 Freezer/Mill, SPEX, Reino Unido). A continuación, se homogeneizaron estos pequeños fragmentos de cartílago en agua destilada (dH₂O) usando un homogeneizador (IKAT10, IKA Works Inc, NC, EE. UU.) para crear una suspensión de cartílago (250 mg/ml). Se transfirió la suspensión a moldes a hechos a medida (que contenían pocillos de 5 mm de diámetro y 3 mm de altura) y se liofilizó (FreeZone Triad, Labconco, KC, EE. UU.) para producir andamios porosos. En resumen, se congeló la suspensión a -30 °C (1 °C/min) y se mantuvo a esa temperatura durante una hora. A continuación, se incrementó la temperatura a -10 °C (1 °C/min), seguido de un mantenimiento de 24 horas y, a continuación, finalmente se incrementó a temperatura ambiente (0,5 °C/min). Luego, se aplicaron dos técnicas de reticulación diferentes a los andamios. Se sometieron los andamios a reticulación por DHT y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC). Se realizó el procedimiento de DHT en un horno a vacío (VD23, Binder, Alemania) a 115 °C a 2 mbar (200 Pa) durante 24 horas. La reticulación por EDAC (Sigma-Aldrich, Alemania) consistió en la exposición química durante 2 horas a una concentración de 6 mM en presencia de N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma-Aldrich, Alemania). Se usó una proporción molar de EDAC 2,5 M/N-hidroxisuccinimida M. Después de la reticulación por EDAC, se lavaron dos veces los andamios en PBS estéril (Sigma-Aldrich, Alemania).

Desarrollo de andamios derivados de la MEC descelerizada con tamaño de poro controlado y tasas de liberación de factores de crecimiento adaptados.

Se obtuvo el cartílago articular de los cóndilos femorales de cerdas de 4 meses de edad, en condiciones estériles, poco después de su sacrificio. Todas las etapas del protocolo de descelerización y adaptación de GAG se realizaron en un volumen de trabajo de 2 ml a temperatura ambiente. Este protocolo consiste en tres fases. En la fase I, se incubaron los grupos de GAG al 50 y 5 % en un tampón básico (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0)) que contenía DTT 100 mM, MgCl₂ 2 mM y KCl 10 mM durante 24 h; y los fragmentos de cartílago anatómicamente adyacentes se sometieron a incubaciones de 1 min para el grupo de GAG al 100 %. Los grupos de GAG al 5 % se sometieron adicionalmente a un tratamiento con SDS al 0,5 % con un tampón básico que contenía DTT 100 mM, MgCl₂ mM y KCl 10 mM durante 24 h. Tras la eliminación de sGAG, se realizó la digestión de ácidos nucleicos (2,5 unidades Kunitz/ml de desoxirribonucleasa I, 7,5 unidades Kunitz/ml de ribonucleasa A, NaCl 0,15 M, MgCl₂ (H₂O) 2 mM en Tris-HCl 10 mM (pH 7,6)) durante 24 h y lavado (solución salina tamponada con Tris 10 mM (pH 7,5)) durante 48 h. En la fase II, se prepararon los andamios de MEC cartilaginosa con GAG adaptados mediante molienda criogénica seguido de reticulación por DHT+EDAC como se describe en la sección 1 anterior.

Desarrollo de andamios derivados de la MEC solubilizada

Se obtuvo el cartílago usado en la fabricación de andamios derivados de la MEC, en condiciones estériles, de los cóndilos femorales o placas de crecimiento de cerdas (3 meses de edad) poco después de su sacrificio. El cartílago se fraccionó en primer lugar en pequeños fragmentos usando un bisturí. A continuación, se transfirió el tejido de MEC a recipientes estériles. A continuación, se trató previamente tejido de MEC con NaOH 0,2 M durante 24 horas a 4 °C. Después del lavado y eliminación de la solución de tratamiento previo, a continuación, se dirigió el tejido de MEC con pepsina en ácido acético 0,5 M. Se añade pepsina a una concentración de ~1500 unidades de pepsina por

50 mg de tejido de MEC. A continuación, se incubó la MEC en la solución de pepsina durante 24 horas a $< 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ con rotación a una velocidad de 4 rpm. A continuación, se realizó la precipitación con sal para extraer el colágeno purificado usando una concentración de NaCl entre 0,1 M - 5 M. Para eliminar cualquier resto de sal, ácido o pepsina, se puede realizar una diálisis en el colágeno solubilizado. Se realizó la diálisis con respecto a Na_2HPO_4 0,02 M (pH 9,4) durante 24 horas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación, el colágeno solubilizado se puede liofilizar. Para generar los andamios, se rehidrató el colágeno liofilizado en una solución acuosa a un intervalo de concentraciones de 1 mg/ml a 200 mg/ml, preferentemente 20 mg/ml. Una vez rehidratado, el colágeno se puede reticular a continuación para formar un gel con glioxal a una concentración de entre 1 mM y 50 mM, preferentemente 10 mM. A continuación, se incubó la solución durante 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para permitir que tenga lugar la reticulación. Después de su incubación, el gel se puede transferir a los moldes y liofilizar para crear andamios.

Desarrollo de partículas derivadas de la MEC descelularizada inyectables como sistemas de administración de factores de crecimiento.

La MEC cartilaginosa particulada se fabrica como se describe en 1 o 2 anteriormente. En lugar de liofilizar estas partículas para producir un andamio poroso, también es posible combinar estas partículas con un hidrogel para desarrollar un biomaterial compuesto condroinductor inyectable que también actúe como un sistema de administración de factores de crecimiento.

Una manifestación de la presente invención sería combinar partículas de MEC con un hidrogel de fibrina. El material cartilaginoso particulado se incorpora en el hidrogel mezclándose directamente con el fibrinógeno, en la proporción deseada. La gelificación se produce añadiendo trombina a la suspensión de fibrinógeno/partículas de MEC. El mezclado apropiado garantiza una distribución homogénea de micropartículas derivadas de la MEC cartilaginosa bioactivas en el hidrogel.

Desarrollo de andamios derivados de la MEC descelularizada de la placa de crecimiento.

Se obtuvo la placa de crecimiento usada en la fabricación de andamios derivados de la MEC, en condiciones estériles, del fémur, peroné y tibia de cerdas (3 meses de edad) poco después de su sacrificio.

La placa de crecimiento se fraccionó en primer lugar en pequeños fragmentos usando un bisturí, y, a continuación, se fraccionó usando un molino criogénico (6770 Freezer/Mill, SPEX, Reino Unido). A continuación, se homogeneizaron estos pequeños fragmentos de la placa de crecimiento en agua destilada (dH_2O) usando un homogeneizador (IKAT10, IKA Works Inc, NC, EE. UU.) para crear una suspensión (250 mg/ml). Se transfirió la suspensión a moldes a hechos a medida y se liofilizó (FreeZone Triad, Labconco, KC, EE. UU.) para producir andamios porosos. En resumen, se congeló la suspensión a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) y se mantuvo a esa temperatura durante una hora. A continuación, se incrementó la temperatura a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$), seguido de un mantenimiento de 24 horas y, a continuación, finalmente se incrementó a temperatura ambiente ($0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Luego, se aplicaron dos técnicas de reticulación diferentes a los andamios. Se sometieron los andamios a reticulación por DHT y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC). Se realizó el procedimiento de DHT en un horno a vacío (VD23, Binder, Alemania) a $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 2 mbar (200 Pa) durante 24 horas. La reticulación por EDAC (Sigma-Aldrich, Alemania) consistió en la exposición química durante 2 horas a una concentración de 6 mM en presencia de N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma-Aldrich, Alemania). Se usó una proporción molar de EDAC 2,5 M/N-hidroxisuccinimida M. Después de la reticulación por EDAC, se lavaron dos veces los andamios en PBS estéril (Sigma-Aldrich, Alemania).

A continuación, se presentarán los resultados obtenidos de la caracterización tanto *in vitro* como *in vivo* del andamio de la placa de crecimiento y demostrarán su potencial para su uso en la regeneración de tejidos óseos. Además, se mostrará la capacidad de la capa de andamio de la placa de crecimiento para combinarse con una capa de MEC cartilaginosa para generar un injerto osteocondral que se pueda aplicar potencialmente para reparar simultáneamente tanto capas óseas (osteo) como cartilaginosas (condrales).

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un procedimiento para preparar un andamio poroso adecuado para su uso en la reparación de lesiones óseas, condrales u osteocondrales en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la etapa de:
- proporcionar un tejido de matriz extracelular (MEC) micronizada;
- mezclar la matriz extracelular micronizada con un líquido para proporcionar una suspensión; y
- 10 - liofilizar la suspensión para proporcionar el andamio poroso,
- en el que se trata la matriz extracelular para reducir el contenido de GAG a menos de un 90 % del contenido de GAG de MEC no tratada, y en el que el tejido de MEC es MEC cartilaginosa.
- 15 **2.** Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tejido de matriz extracelular cartilaginosa micronizada tiene un tamaño de partícula medio de 10-200 micrómetros.
- 3.** Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la suspensión comprende 100-400 mg/ml de tejido de MEC cartilaginosa micronizada.
- 20 **4.** Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el tejido de matriz extracelular cartilaginosa micronizada es tejido de matriz extracelular cartilaginosa sometida a molienda criogénica.
- 5.** Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que se reticula el andamio poroso.
- 25 **6.** Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la matriz extracelular cartilaginosa es MEC de cartílago hialino o MEC de la placa de crecimiento.
- 7.** Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que se descelulariza la matriz extracelular cartilaginosa antes o después de su micronización.
- 30 **8.** Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el procedimiento de la invención incluye una etapa adicional de sembrar el andamio con un material biológico seleccionado de células o un factor de crecimiento biológico.
- 35 **9.** Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que: las células se seleccionan del grupo que consiste en células madre, condrocitos, células mesenquimales y osteoblastos; y/o en el que el factor de crecimiento biológico se selecciona del grupo que consiste en uno o más de la superfamilia de TGF- β o cannabinoides.
- 40 **10.** Un procedimiento de preparación de un andamio de múltiples capas que comprende las etapas de preparar una primera capa que comprende un andamio poroso de acuerdo con un procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, preparar una segunda capa que comprende un andamio poroso de acuerdo con un procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la primera capa se une a la segunda capa.
- 45 **11.** Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el procedimiento incluye una etapa de unir la primera capa a la segunda capa para formar el andamio de múltiples capas, en el que la primera capa comprende MEC de cartílago hialino y la segunda capa comprende MEC de la placa de crecimiento.
- 12.** Un andamio poroso adecuado para su uso en la reparación de lesiones óseas, condrales u osteocondrales en un mamífero y que comprende una matriz liofilizada porosa formada a partir de matriz extracelular descelularizada micronizada, en el que la matriz extracelular comprende menos de un 90 % del contenido de GAG de MEC natural, y en el que el tejido de MEC es MEC cartilaginosa.
- 50 **13.** Un andamio poroso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que se reticula el andamio poroso.
- 55 **14.** Un andamio poroso de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en el que la matriz extracelular es MEC de cartílago hialino o MEC de la placa de crecimiento.
- 60 **15.** Un andamio de múltiples capas adecuado para la reparación de lesiones osteocondrales en un mamífero y que tiene una primera capa que comprende un andamio poroso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que la MEC cartilaginosa es MEC de cartílago hialino, y una segunda capa que comprende un andamio poroso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que la MEC cartilaginosa es MEC de la placa de crecimiento, en el que la primera capa se une a la segunda capa.

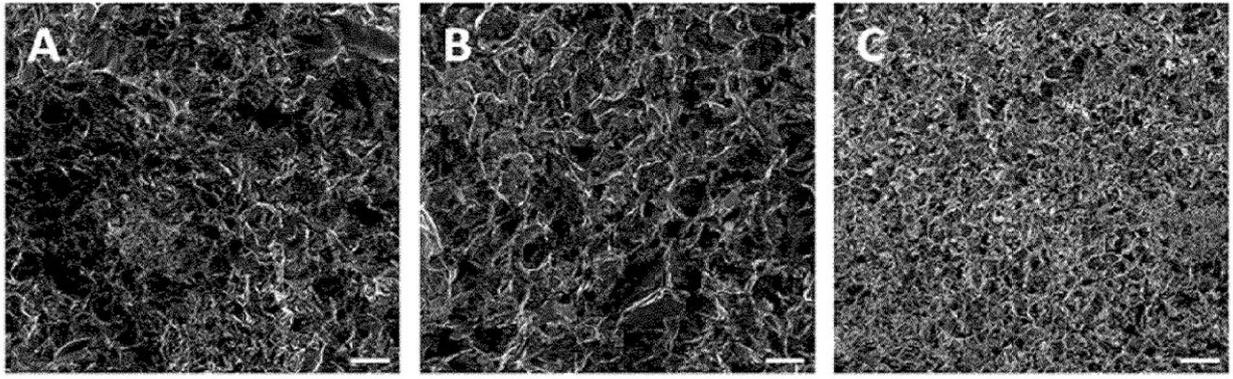


FIG. 1

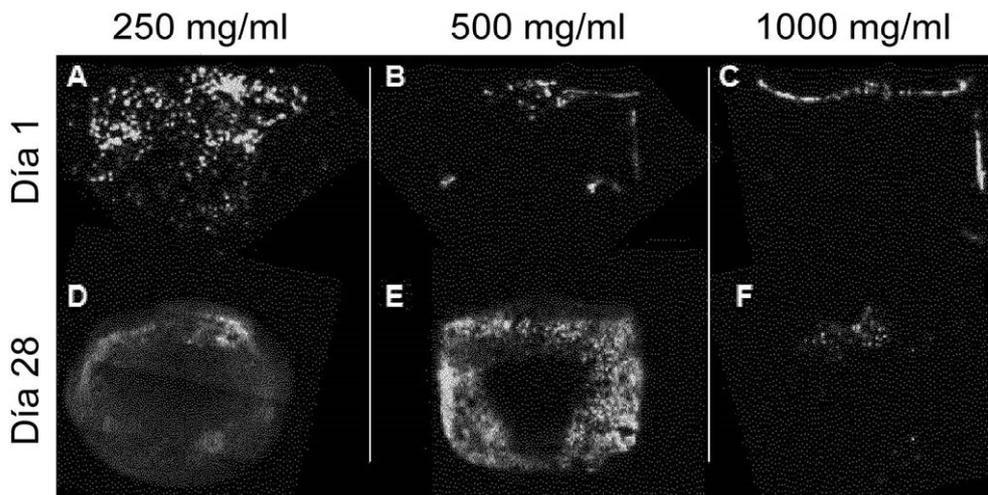


FIG. 2

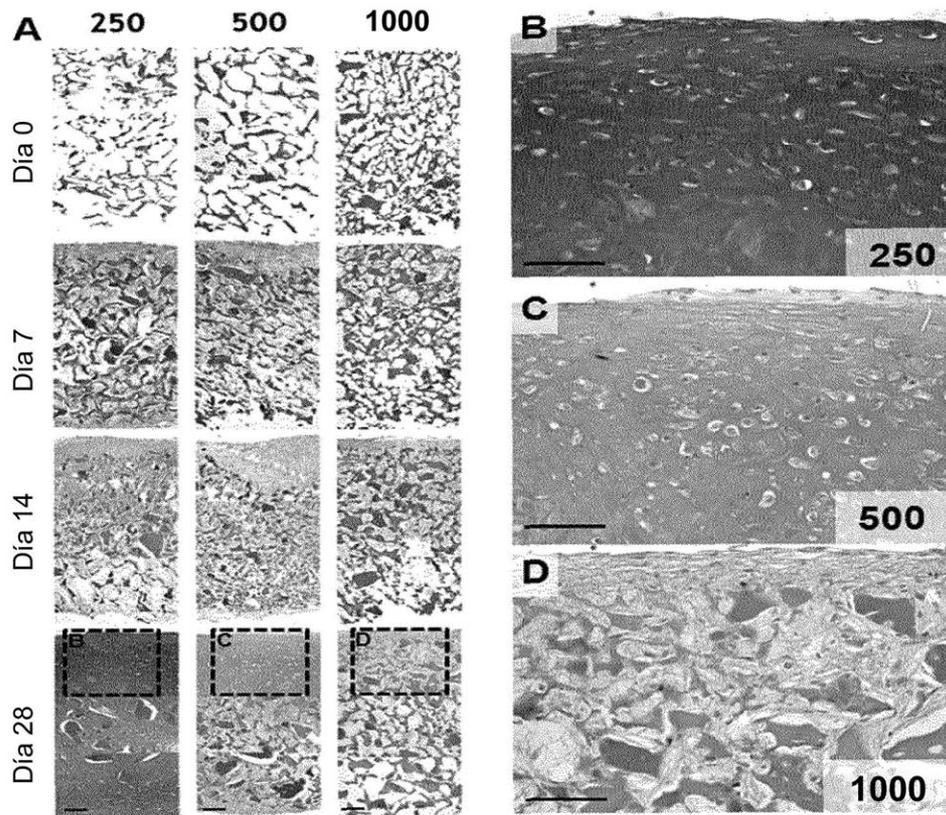


FIG. 3

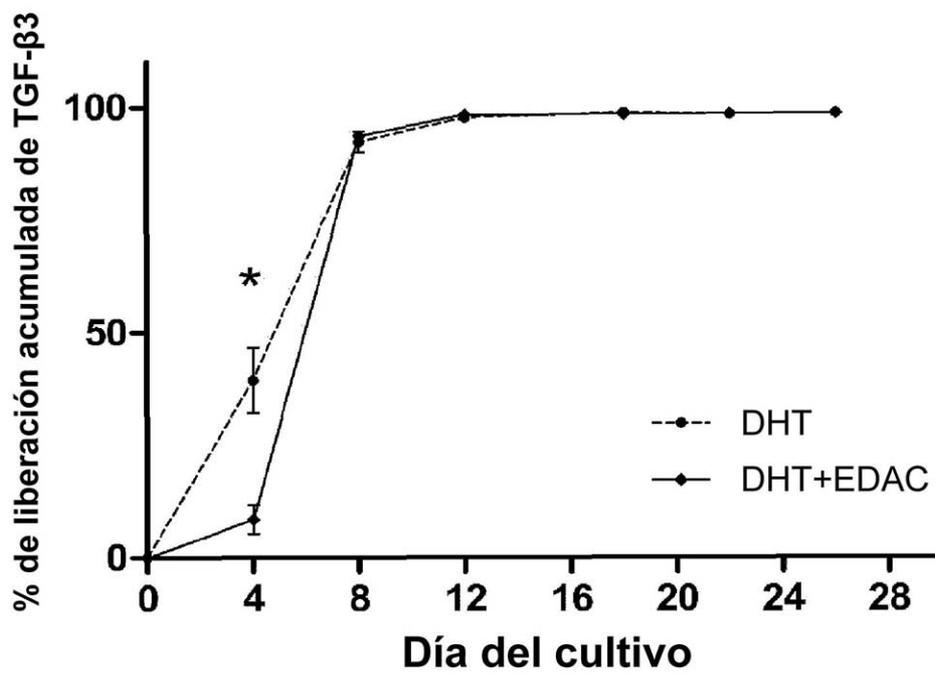


FIG. 4

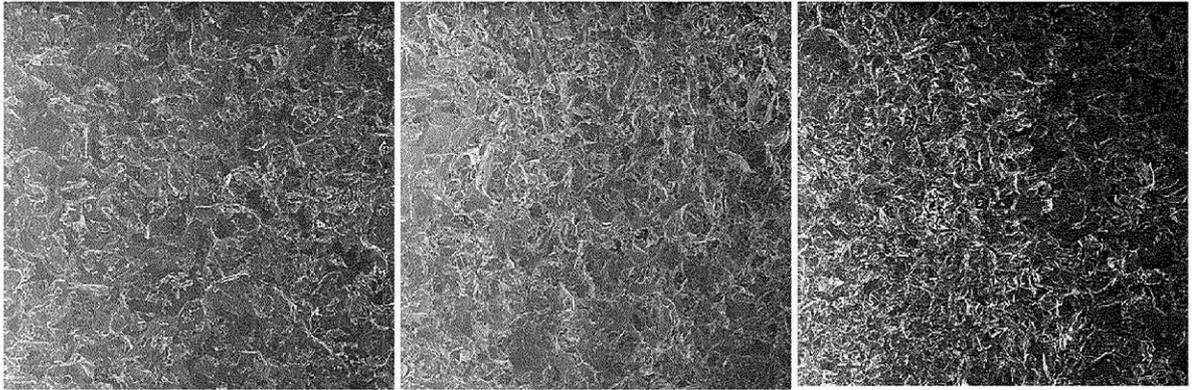


FIG. 5

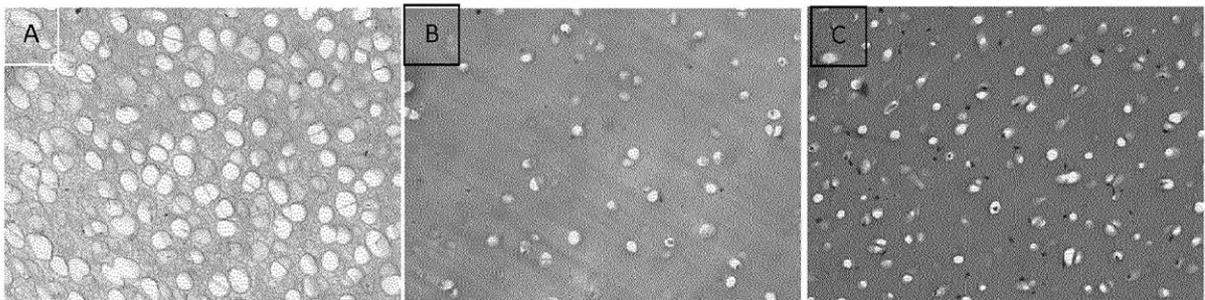


FIG. 6

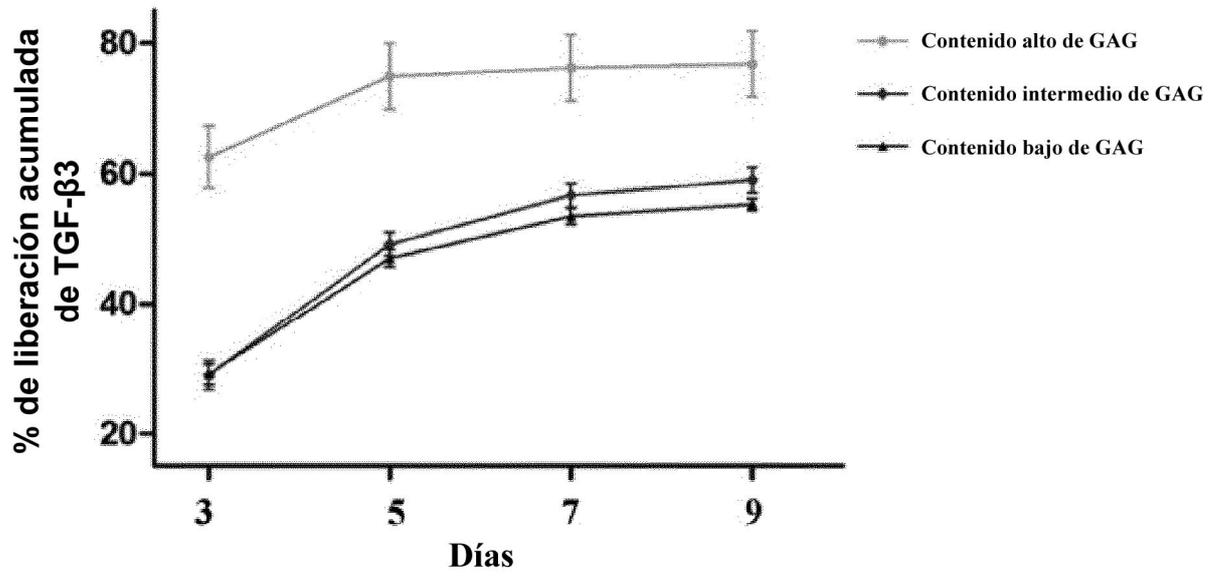


FIG. 7:

Análisis bioquímico del andamio

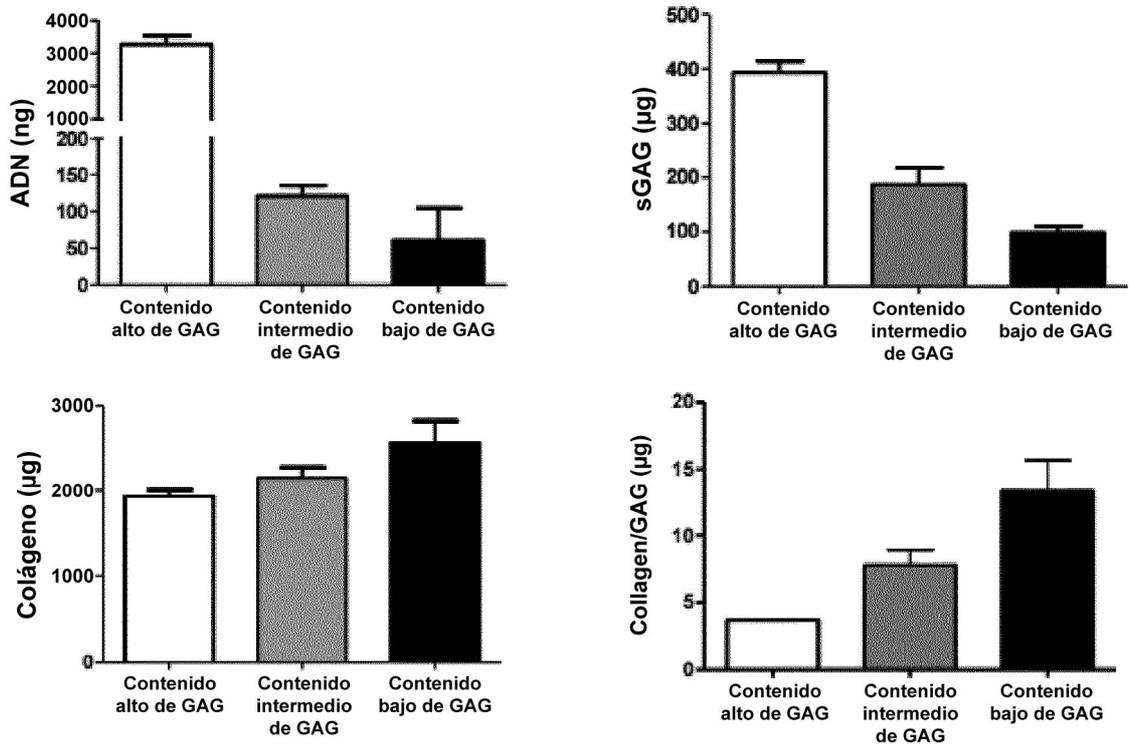


FIG. 8

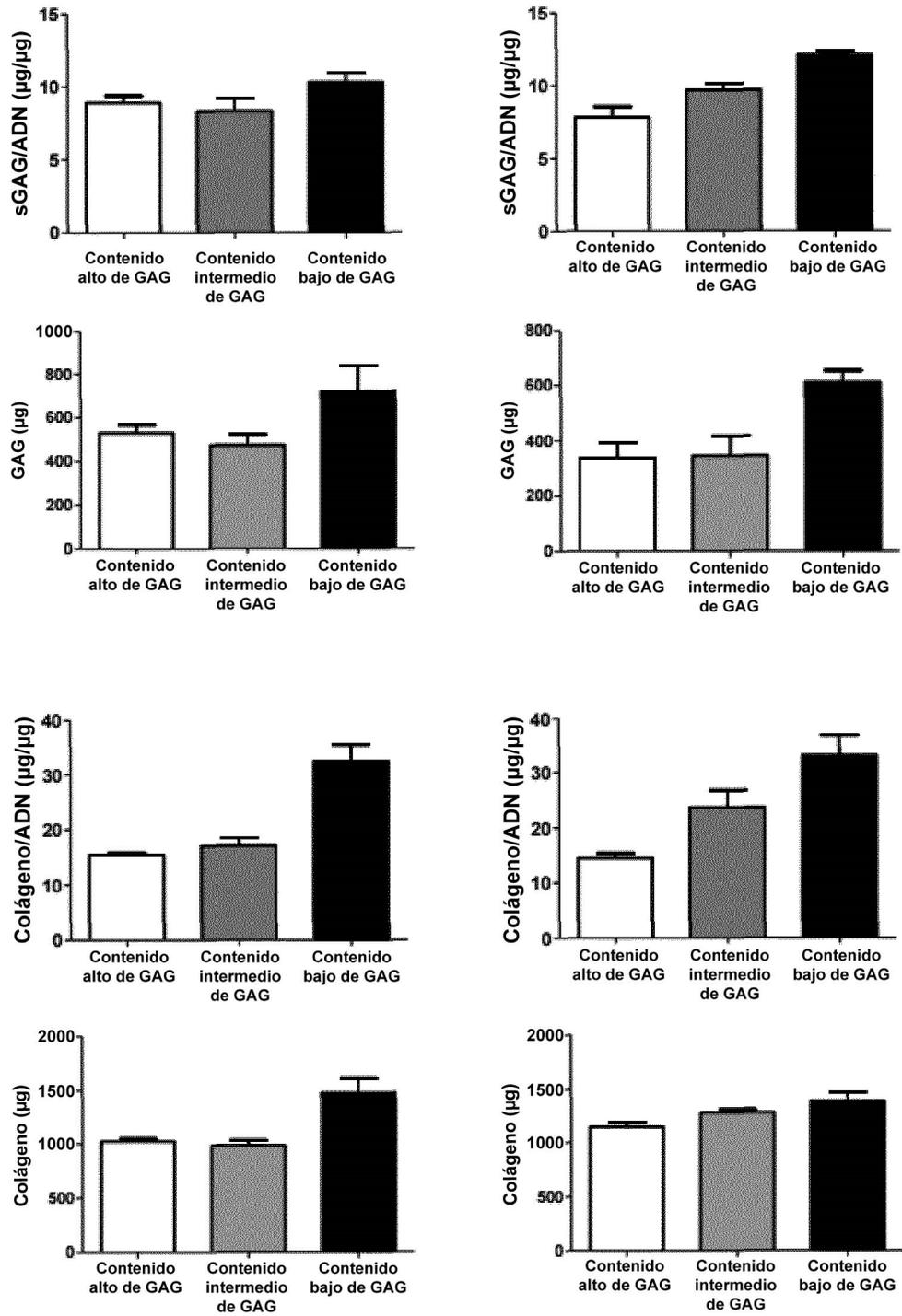


FIG. 9

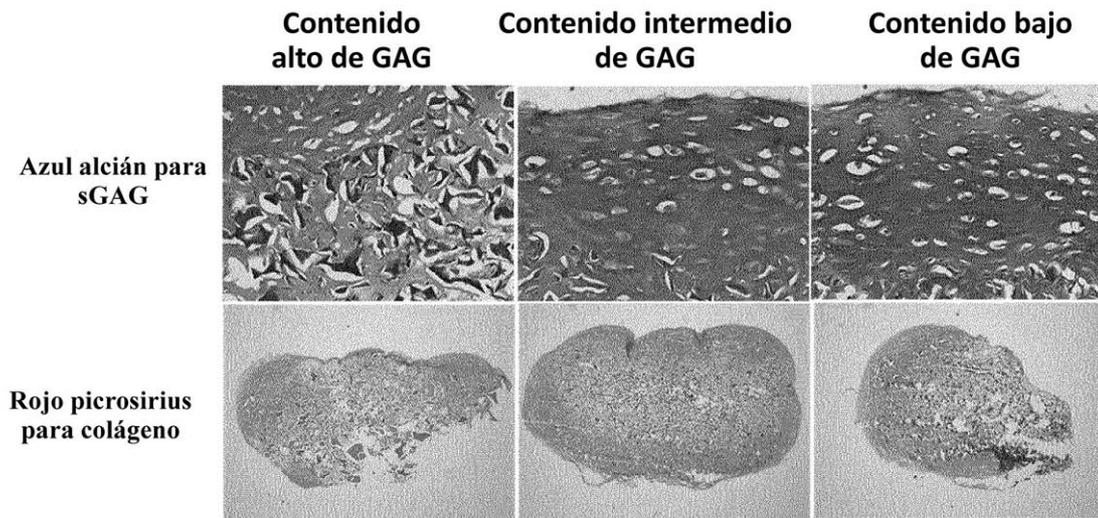


FIG. 10

Prueba - Fibrina/MEC - 14/11/2013

Diámetro: 5 mm; Volumen 60 μ l

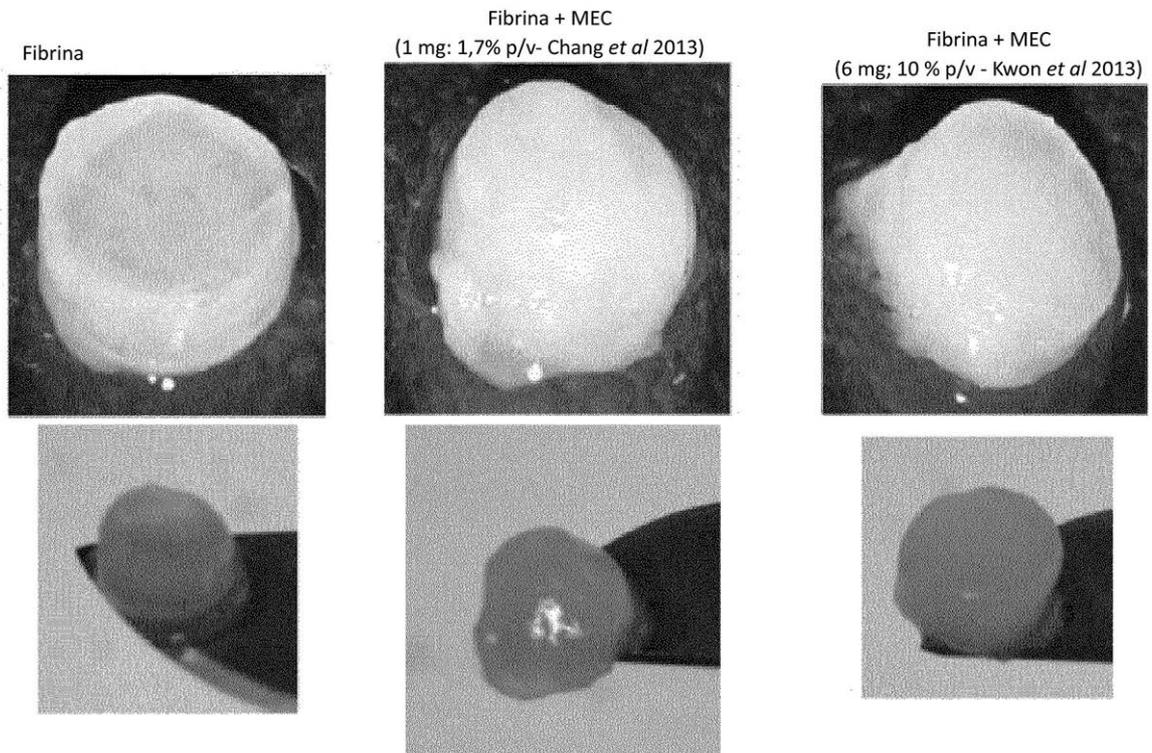


FIG. 11

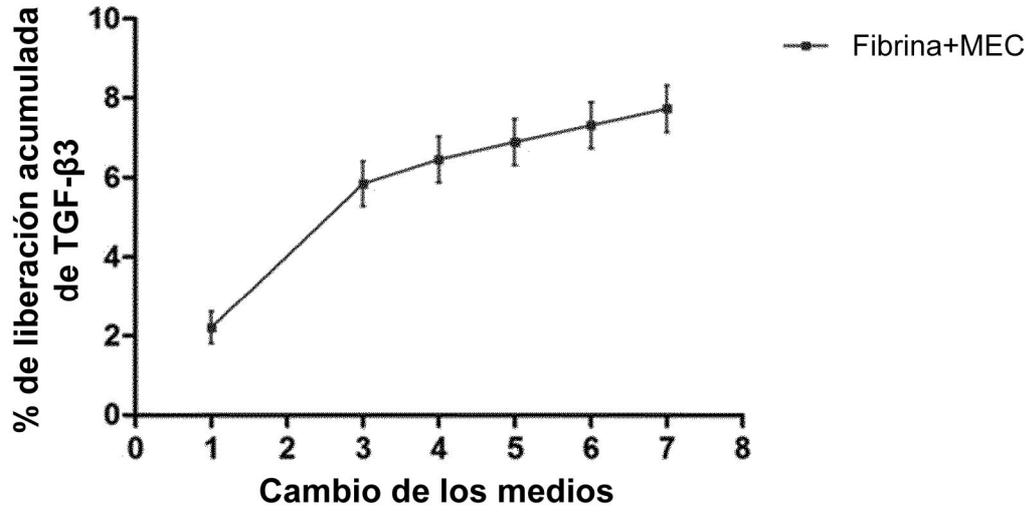


FIG. 12

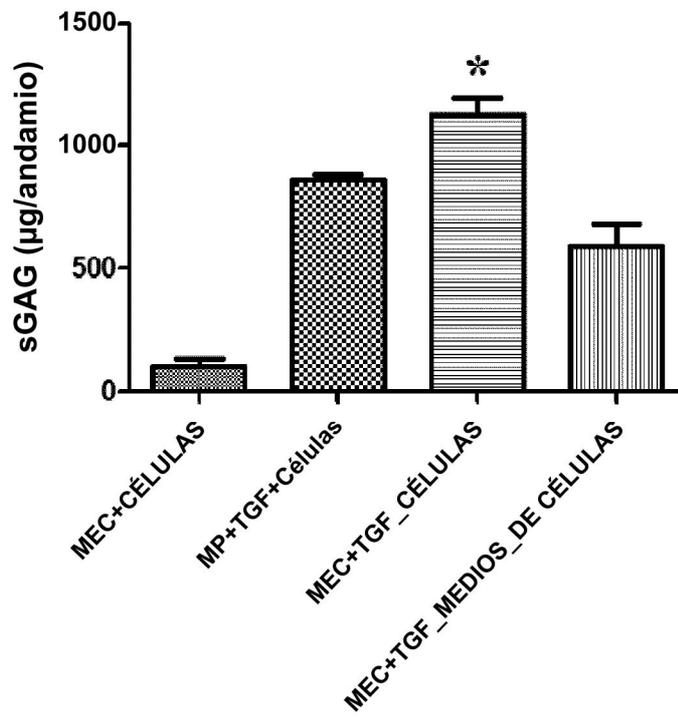
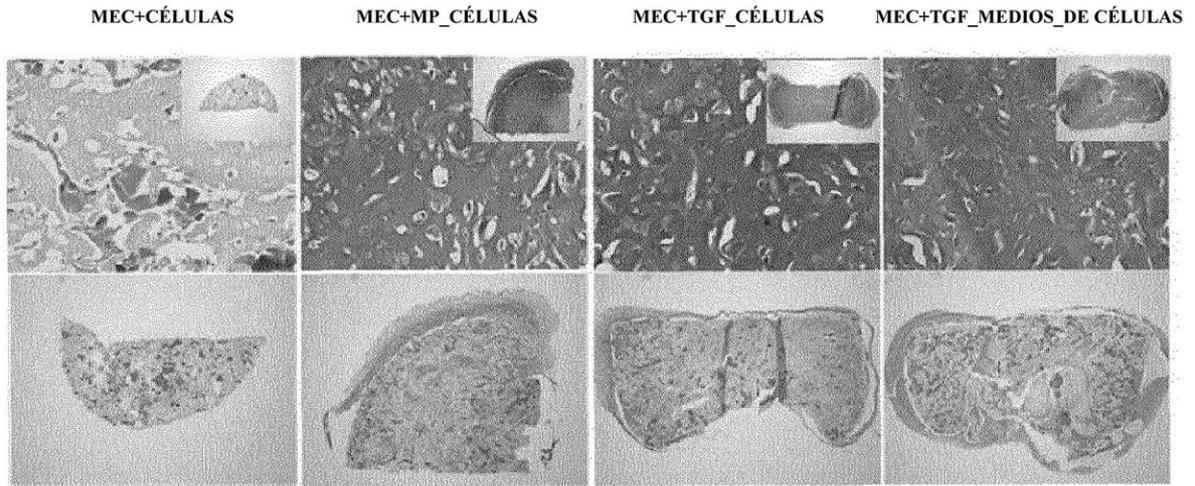


FIG. 13



20X

FIG. 14

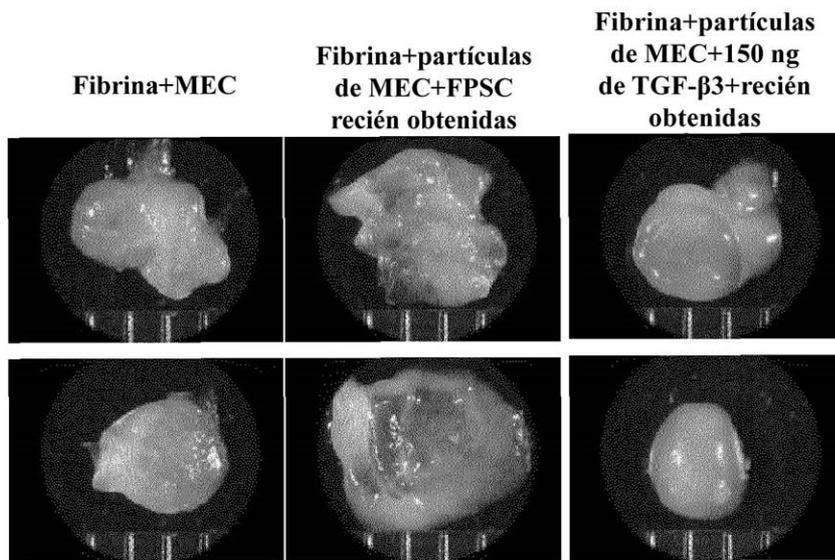
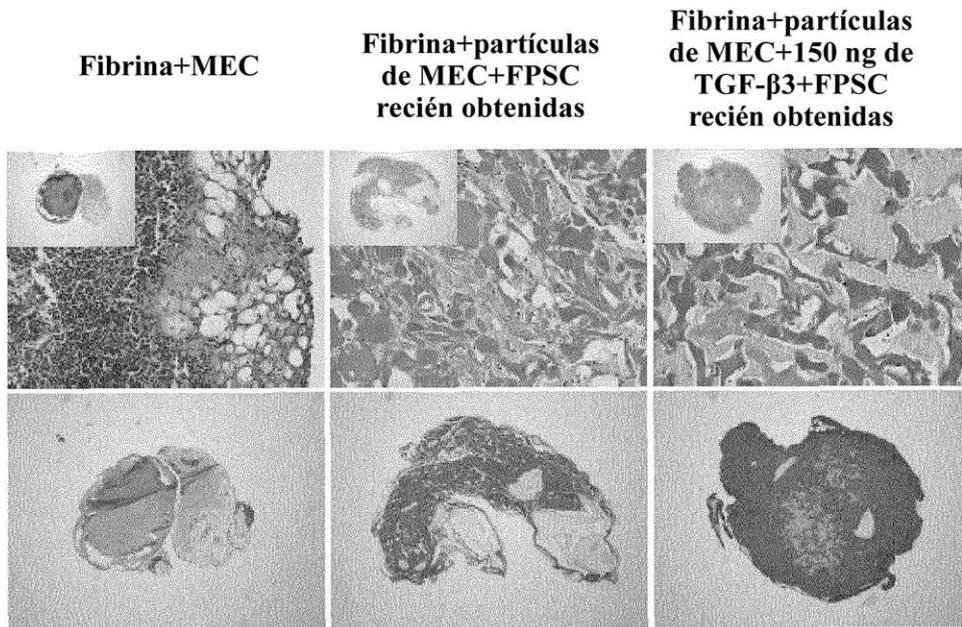


FIG. 15



20X

FIG. 16

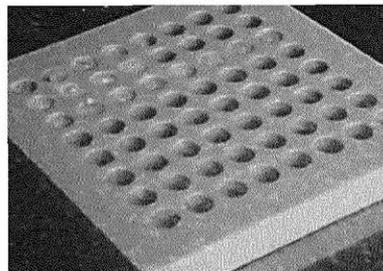


FIG. 17

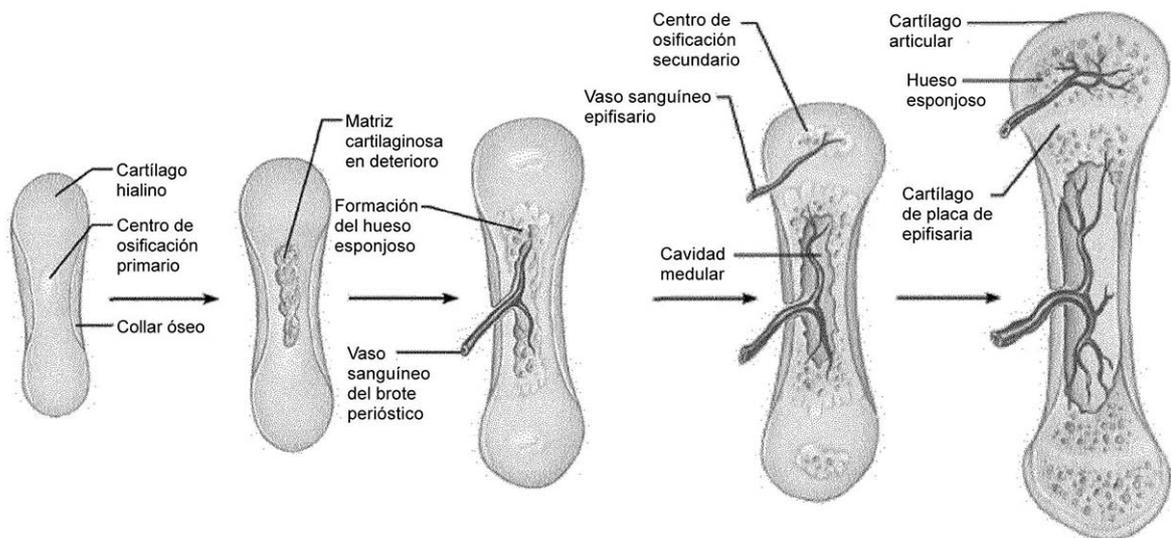


FIG. 18

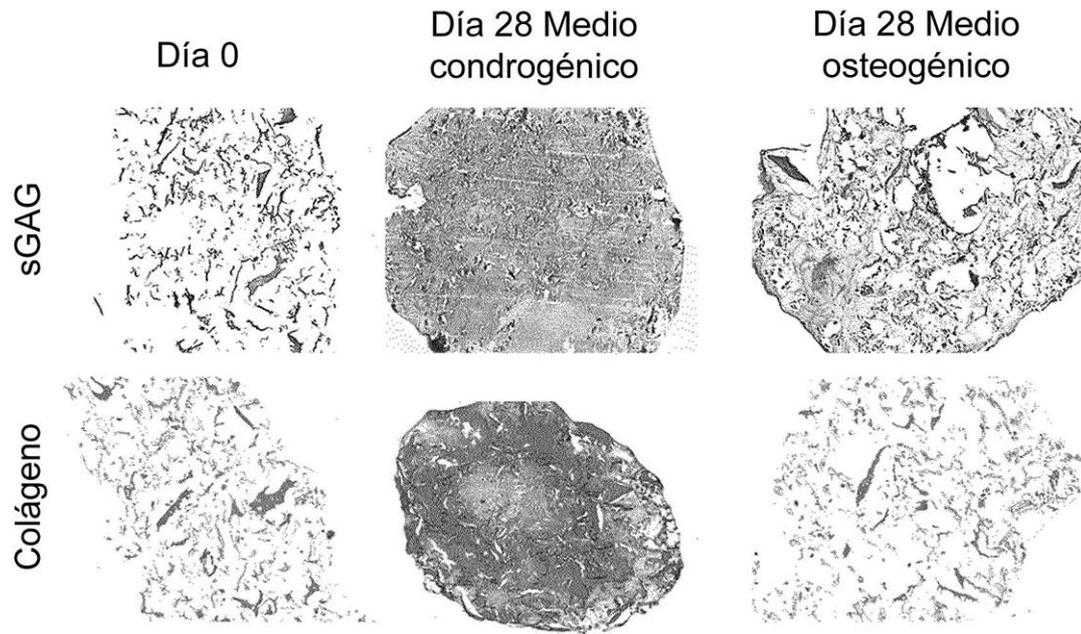


FIG. 19

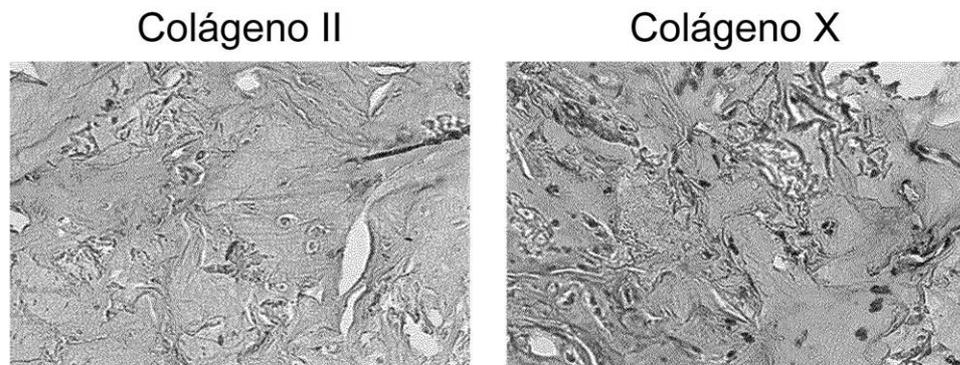


FIG. 20

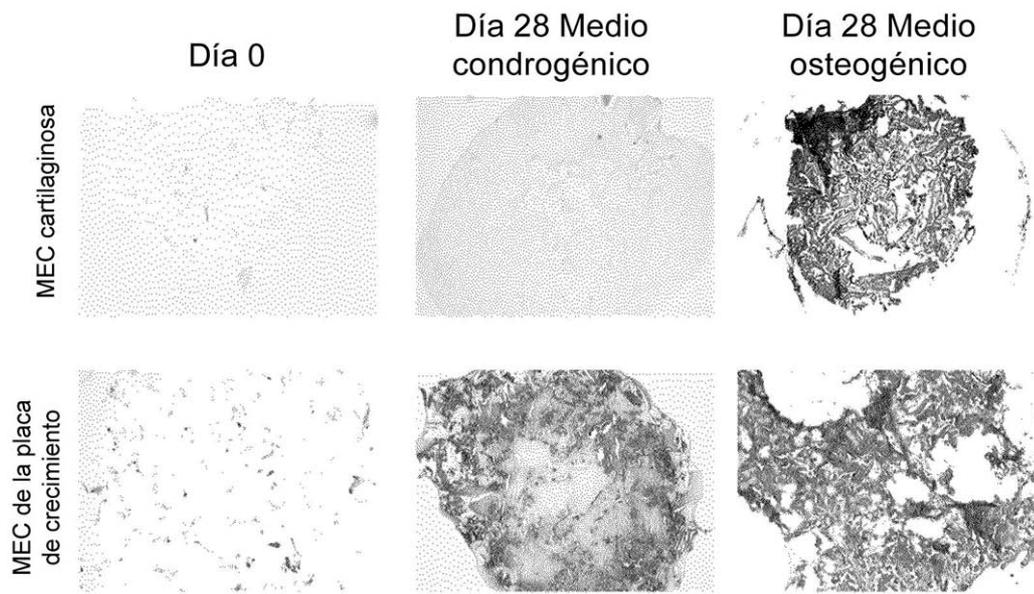


FIG. 21

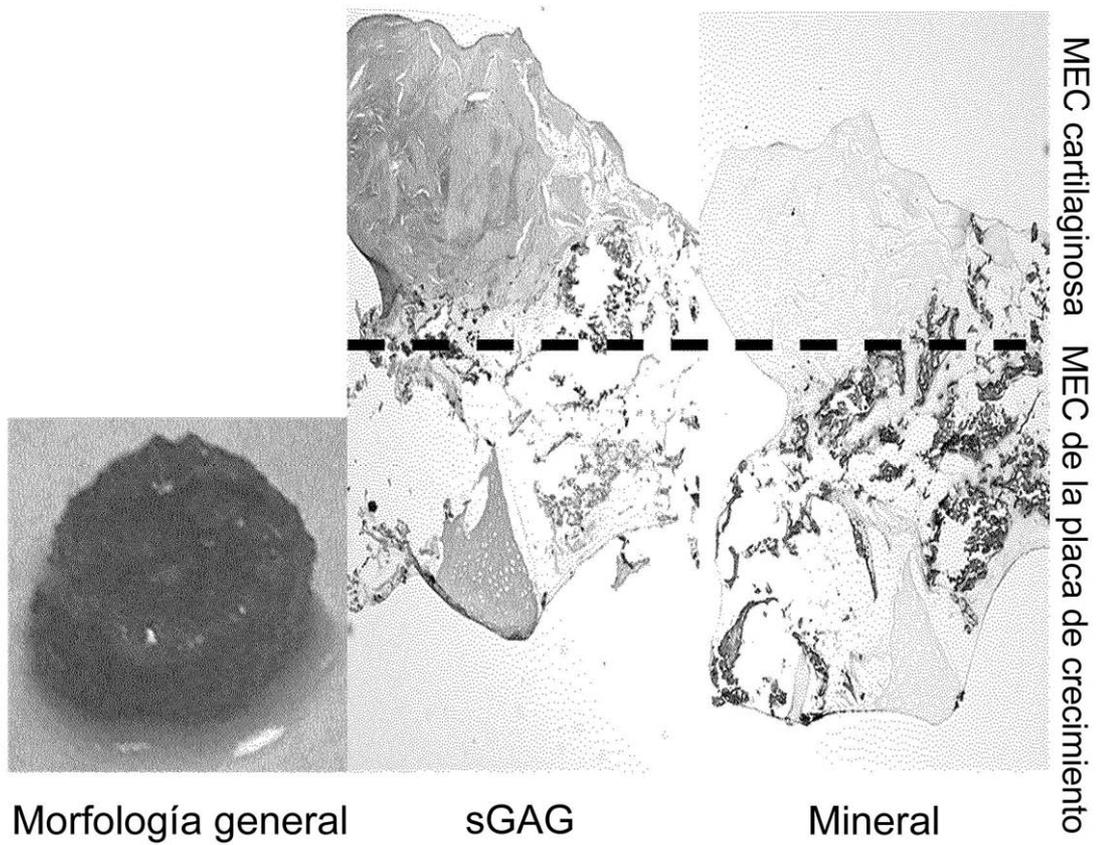


FIG. 22

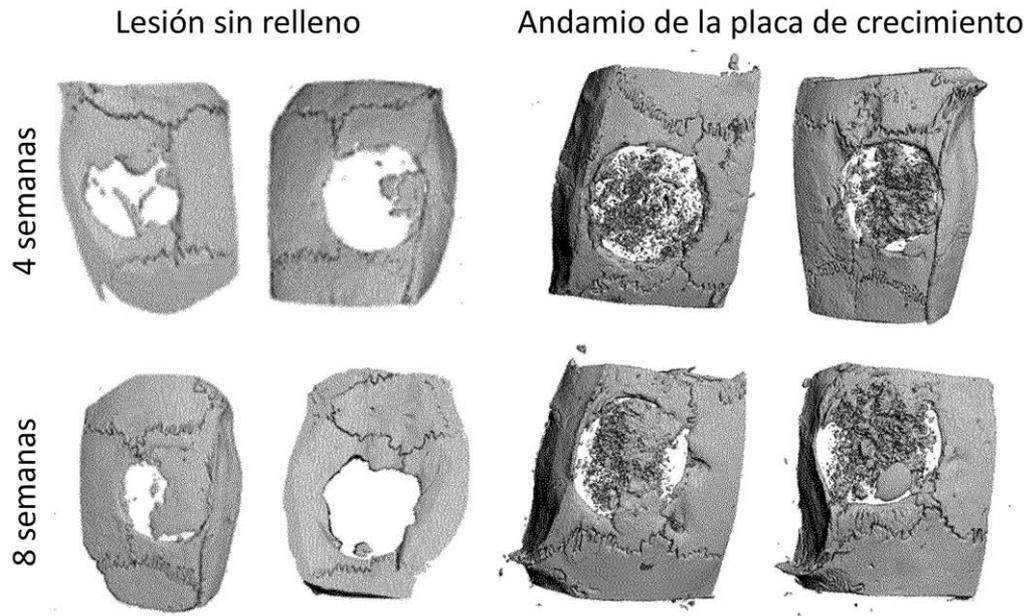


FIG. 23

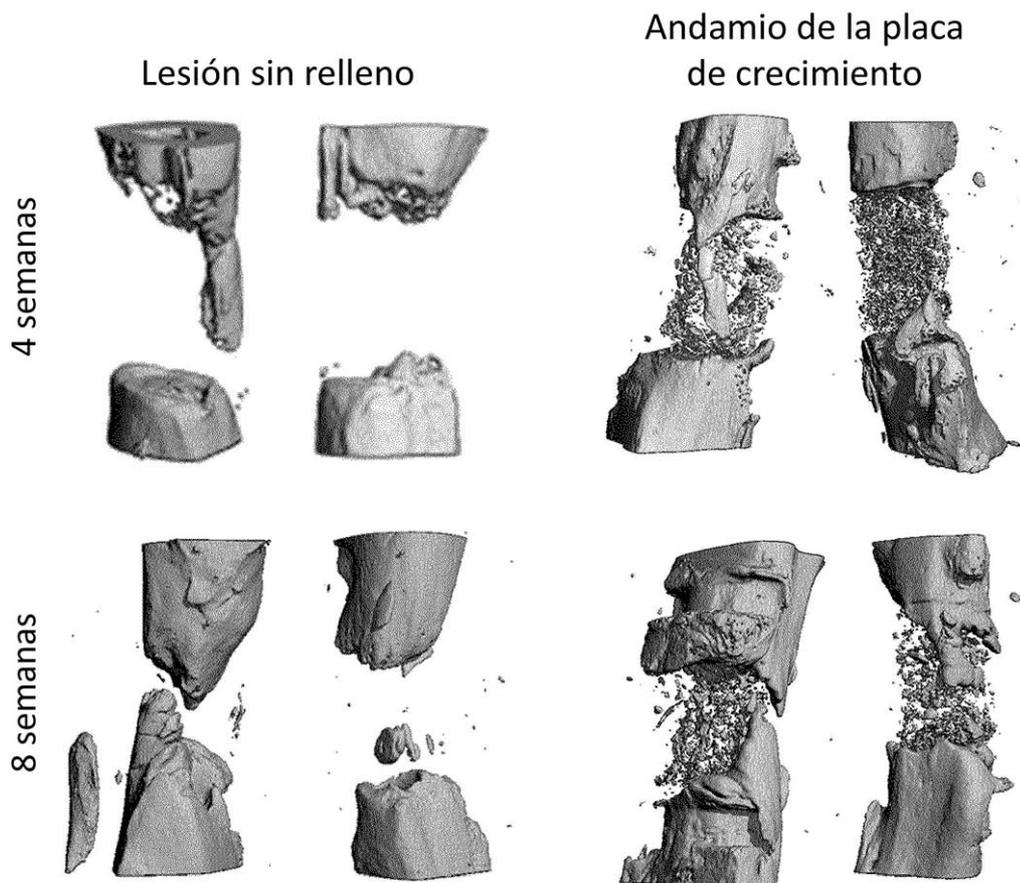


FIG. 24

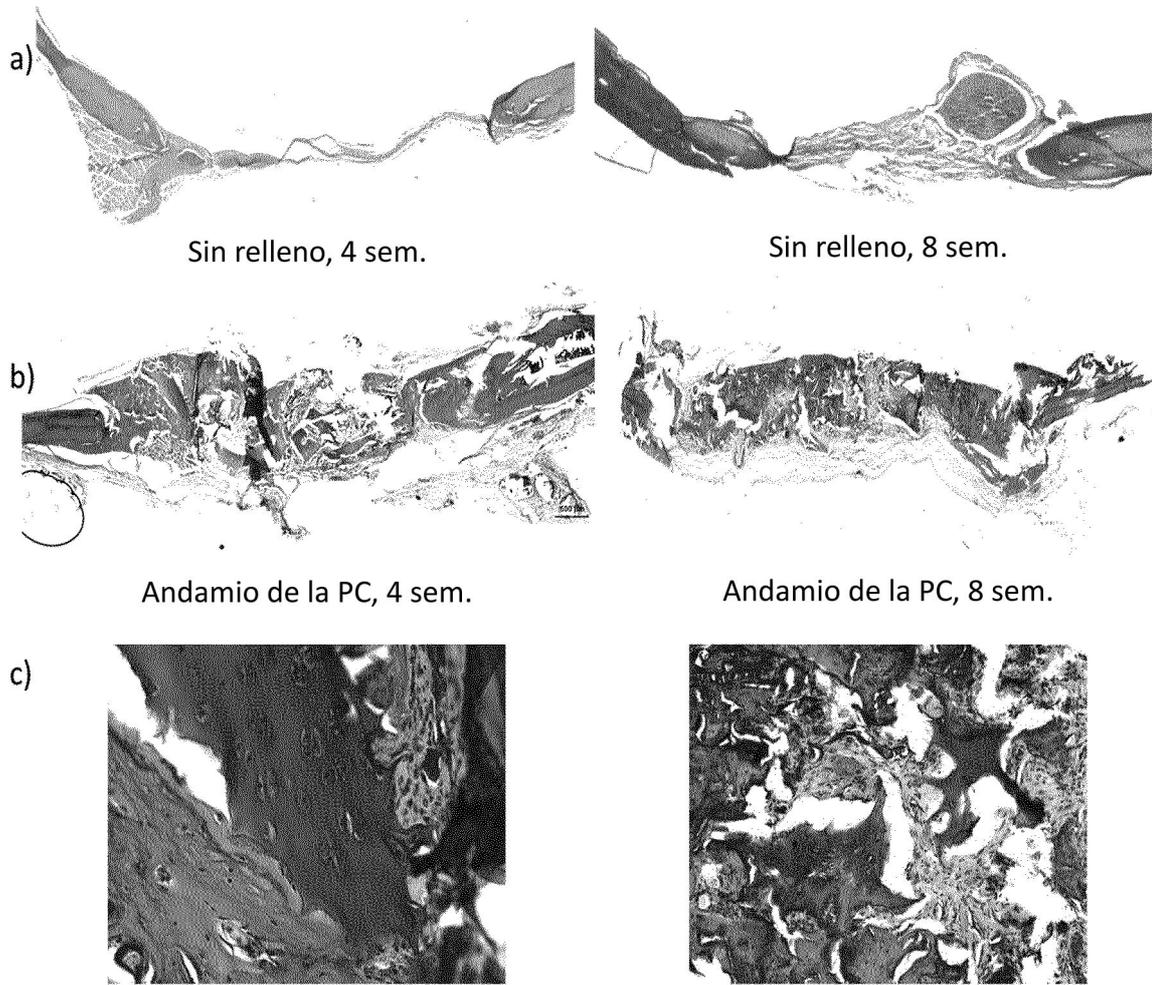


FIG. 25

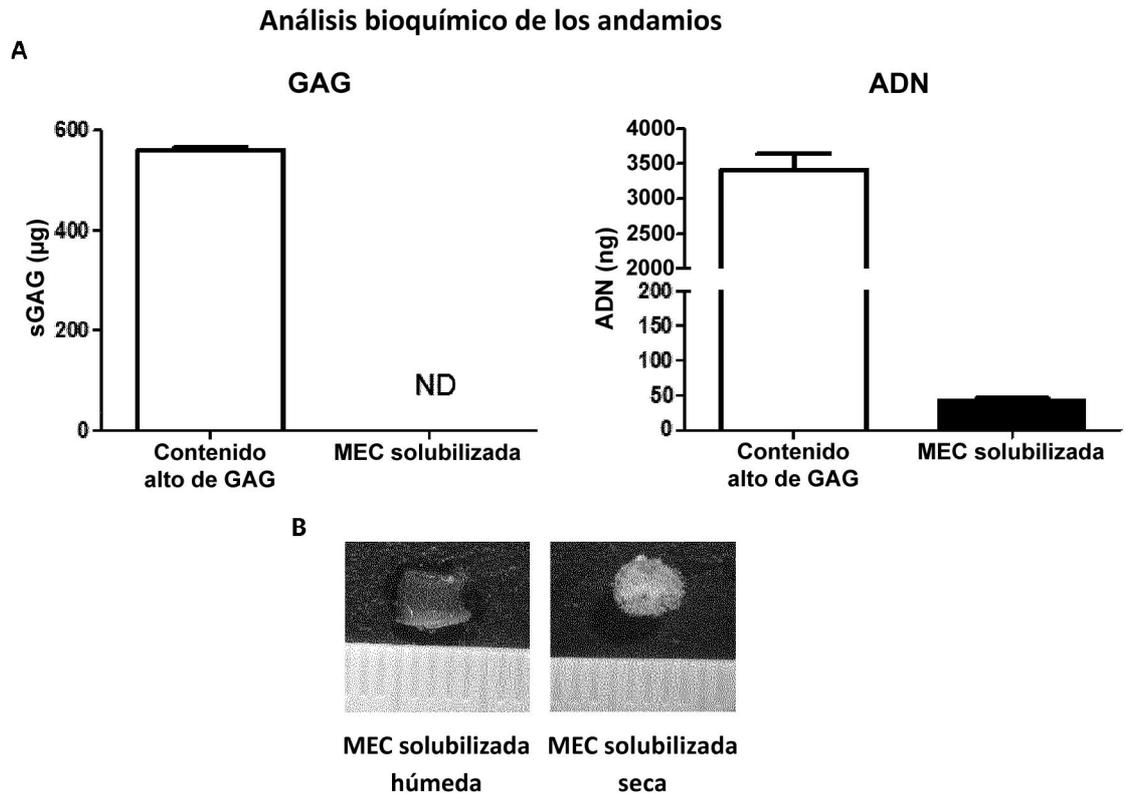


FIG. 26

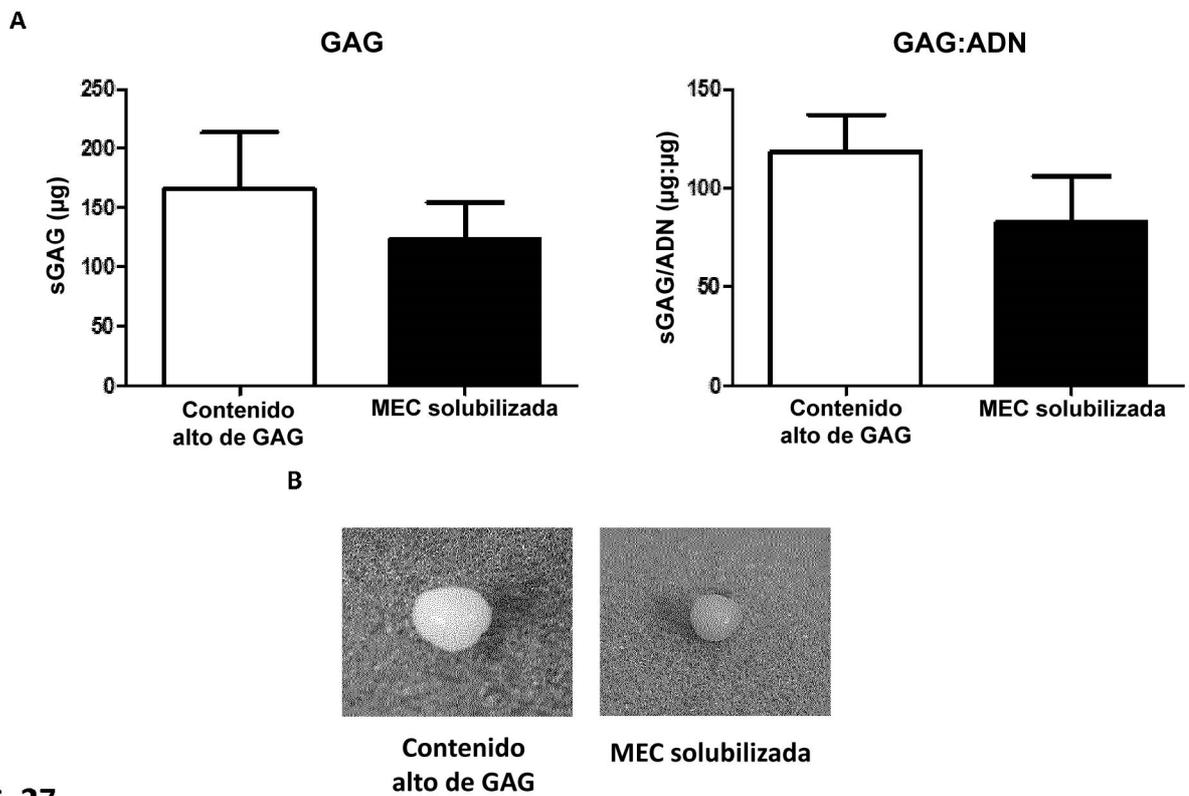


FIG. 27