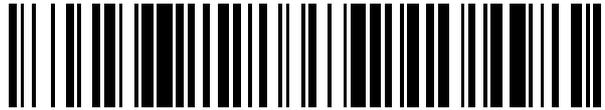


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 363**

51 Int. Cl.:

A61L 27/12	(2006.01)
A61L 27/24	(2006.01)
A61L 27/42	(2006.01)
A61L 27/46	(2006.01)
A61L 27/56	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2010 PCT/IE2010/000005**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.07.2010 WO10084481**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2010 E 10706393 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2389204**

54 Título: **Andamiaje estratificado adecuado para la reparación osteocondral**

30 Prioridad:

23.01.2009 US 147006 P
23.01.2009 EP 09151226

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.02.2020

73 Titular/es:

ROYAL COLLEGE OF SURGEONS IN IRELAND
(100.0%)
123 St. Stephens Green
Dublin 2, IE

72 Inventor/es:

GLEESON, JOHN, P;
LEIVINGSTONE, TANYA, J. y
O'BRIEN, FERGAL, J.

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 740 363 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

Andamiaje estratificado adecuado para la reparación osteocondral

5 **Introducción**

La invención se refiere a un procedimiento para producir un andamiaje de colágeno multicapa adecuado para la reparación de defectos osteocondrales. La invención también se refiere a un andamiaje de material compuesto de colágeno multicapa, y usos del mismo en la reparación de defectos osteocondrales.

10 El cartílago articular es un tejido altamente especializado que se encuentra cubriendo las superficies de los extremos óseos de todas las articulaciones sinoviales en el cuerpo humano. Su función es lubricar el movimiento de la articulación y absorber pequeños impactos de choque dentro de una articulación. El cartílago articular está compuesto por un 70-80 % de agua, un 9 % de agregan (la molécula principal de unión al agua dentro de la matriz de colágeno), un 15 % de colágenos (un 80 % de tipo II, un 15 % de tipo IX y XI y un 5 % de tipo III, VI, XII, XIV) y un 3 % de células (Aigner T, Stove J.; 2003).

La estructura y la composición del cartílago articular están altamente ordenadas en capas distintas pero perfectamente integradas que varían en composición y estructura de acuerdo con la distancia a la superficie. Típicamente, se divide en cuatro zonas: superficial, media (transicional), profunda (radial) y cartílago calcificado. La zona superficial es una capa densa y delgada que forma la superficie deslizante de la articulación y proporciona soporte y protección. Está compuesto por fibrillas delgadas de colágeno alineadas paralelas a la superficie de la articulación, con condrocitos inactivos alargados alineados también con la superficie. La zona media es más gruesa que la zona superficial y contiene células esféricas y fibrillas de colágeno más grandes que están orientadas de una manera más aleatoria. En la zona profunda, las células son esféricas y están dispuestas en orientación columnar. Las fibrillas de colágeno en esta zona están dispuestas perpendiculares a la superficie y se insertan en la zona de cartílago calcificado, que proporciona una transición y una fijación mecánica entre el cartílago y el hueso (Newman AP.; 1998). Debajo de la zona de cartílago calcificado se encuentra el hueso subcondral. El cartílago tiene una mala capacidad para regenerarse debido a la escasa distribución y baja actividad mitótica (diferenciación) de los condrocitos articulares y la naturaleza avascular del tejido.

El daño superficial al cartílago articular casi inevitablemente da lugar al desarrollo de artrosis (OA) dentro de una articulación. El daño del cartílago y la artrosis afectan a al menos 40 millones tan solo de estadounidenses al año, con un costo asociado de aproximadamente 105 mil millones de dólares. Se estima que la OA será la cuarta causa principal de discapacidad en el 2020; afectando al 9,6 % de los hombres y al 18 % de las mujeres mayores de 60 años en Europa (Market devices/drivers; Mintel, abril de 2007). Las técnicas de reparación quirúrgica usadas actualmente se dividen en tres categorías: 1) injerto osteocondral, 2) técnicas de estimulación de la médula ósea y 3) implantación de condrocitos autólogos (ACI). El injerto osteocondral o la mosaicoplastia implica la retirada de piezas osteocondrales cilíndricas de áreas sin carga del cartílago articular y la posterior transferencia de estos tapones cilíndricos a defectos de grosor completo desbridados. Los injertos osteocondrales pueden ser autólogos o alólogos, dependiendo del tamaño del defecto (los aloinjertos se usan para defectos más grandes). La principal desventaja de los autoinjertos es el riesgo de morbilidad en el sitio donante. Las desventajas de los aloinjertos incluyen el riesgo de transmisión de enfermedades y rechazo de tejidos.

Las técnicas de estimulación de la médula ósea incluyen la condroplastia abrasiva, la perforación de Pridie y la técnica de microfracturas. Todas estas técnicas están dirigidas a la creación quirúrgica de acceso a la médula ósea, permitiendo el flujo de sangre al sitio del defecto que a su vez induce la reparación espontánea (Beris AE; 2005). Esto forma un coágulo sanguíneo que atrapa proteínas, lípidos, glóbulos rojos y blancos, plaquetas, factores de crecimiento y células provenientes de la sangre (Hunziker EB, 2001). La reparación espontánea ocurre en el área, que normalmente consiste en la producción de tejido fibrocartilaginoso (Beris AE; 2005). En la técnica de perforación de Pridie, se perforan orificios de 2,0 a 2,5 mm de diámetro en el espacio de la médula ósea subcondral en áreas debajo de la lesión. La técnica de microfracturas es una modificación de la perforación de Pridie, y la única diferencia es que los orificios perforados son considerablemente más pequeños (aproximadamente de 0,5 a 1,0 mm de diámetro). El éxito con estas técnicas quirúrgicas ha sido limitado, ya que el tejido de reparación de fibrocartílago que se forma tiene malas propiedades mecánicas, no rinde tan bien como el cartílago hialino y se degenera con el tiempo.

La técnica de implantación de condrocitos autólogos (ACI) implica la implantación de condrocitos en el sitio del defecto. Es un procedimiento de dos fases; la primera etapa consiste en recolectar segmentos de cartílago articular sanos para obtener condrocitos. Estos condrocitos se cultivan *in vitro* hasta que se haya producido un número suficiente para la implantación en el defecto. La segunda etapa consiste en limpiar la lesión para revelar cartílago sano y el hueso subcondral. A continuación se sutura un trozo de periostio sobre la lesión y se insertan condrocitos cultivados en el defecto, debajo de esta capa perióstica. A continuación las células se adhieren a las paredes del defecto y producen una matriz extracelular. Las desventajas de esta técnica incluyen una mala retención de las células implantadas dentro del sitio del defecto y la transformación fenotípica y la desdiferenciación de los condrocitos durante la expansión *in vitro*. El sitio del defecto es también incapaz de soportar carga y requiere

protección durante la duración del período de recuperación, que puede ser de varios meses.

Más recientemente, se han desarrollado membranas y andamiajes para la reparación del tejido del cartílago, tanto solos como en combinación con factores de crecimiento y células. Un ejemplo del uso de andamiajes en la reparación del cartílago es la implantación de condrocitos autólogos inducida por matriz (MACI, Genzyme, Países Bajos), que implica la siembra de células en una membrana antes de la implantación, lo que da como resultado una mejor retención de las células en el sitio del defecto. Otros ejemplos comerciales de andamiajes usados para la reparación del cartílago incluyen Chondro-Gide, (Geistlich), CaReS @-Cartilage Repair System (Arthro Kinetics), Neocyte (Advanced Tissue Sciences (ATS)), Atelocollagen (Koken), Menaflex (ReGen Biologics) y Chondromimetic (Orthomimetics). Varios grupos de investigación están desarrollando actualmente andamiajes para la reparación del cartílago alternativos usando diversos materiales; que incluyen ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), colágeno, gelatina y fibrina, y diversas técnicas de producción de andamiajes; incluyendo criodesecación, fabricación de forma libre sólida, compactación y gelificación.

También se ha identificado la necesidad de andamiajes estratificados para la reparación de defectos osteocondrales y, como resultado, comienzan a surgir construcciones de andamiajes estratificados. Los procedimientos estratificados que se han usado incluyen suturar (documento WO 96/024310) o pegar (documento US 2006/0083729 A1) las capas entre sí. Las desventajas de estas técnicas incluyen la introducción de un material adicional en el sitio del defecto (es decir, el material de sutura o el adhesivo) y también la posibilidad de que haya vacíos en la interfase entre los dos materiales, lo que lleva a una menor resistencia de la adhesión interfacial y una infiltración celular reducida.

Las técnicas de fabricación de forma libre sólida también se han usado para producir andamiajes estratificados (Sherwood JK, *et al.*, 2002). Se han producido otros andamiajes estratificados usando una combinación de un andamiaje cerámico de base producido a través de la compactación y sinterización, y las capas superiores de los andamiajes poliméricos producidos a través de la criodesecación o la gelificación de la capa superior del andamiajes (patente de EE.UU. 0.113.951).

Tampieri *et al.* (Design of graded biomimetic osteochondral composite scaffolds, *Biomaterials*, *Biomaterials*, vol. 29, no 26, septiembre de 2008) describe un andamiaje de 3 capas, con cada capa que contiene cantidades variables de colágeno, ácido hialurónico, hidroxiapatita y magnesio-hidroxiapatita. Las capas individuales se producían combinando los diversos componentes para formar geles, que a continuación se reticulaban. La estructura estratificada se produjo mediante un procedimiento de tejido. A continuación la construcción multicapa se criodesecó usando una temperatura de congelación de -25 °C. El procedimiento usado por Tampieri para producir la capa superior cartilaginosa implica añadir NaOH a una suspensión de colágeno tipo 1 al 1 % en peso para formar un gel. Se añadió ácido hialurónico al gel. La capa ósea intermedia (línea de unión) y la capa ósea inferior se produjeron añadiendo diferentes cantidades de H₃PO₄ y Ca(OH)₂ para permitir la formación de hidroxiapatita a través de un procedimiento de nucleación directa. Los geles se reticularon usando el agente de reticulación 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDGE). A continuación las capas se apilaron y se usó un procedimiento de tejido para evitar la deslaminación de las capas en la interfase. El uso de un procedimiento de tejido es desventajoso, ya que requiere el uso de materiales no colágenos adicionales, como las fibras PGA o PLA, que tienen un efecto sobre la biocompatibilidad del andamiaje. El uso de un procedimiento de tejido también daña la estructura de los poros del andamiaje y da como resultado costuras o áreas de laminación heterogénea en la interfase entre las capas. Como resultado, se restringe la infiltración celular a través del andamiaje. Además, la criodesecación de todo el andamiaje se lleva a cabo en una sola etapa y, como resultado, la estructura de las capas individuales no se puede controlar por separado.

Declaraciones de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para producir un andamiaje multicapa en la que cada capa tiene típicamente una estructura porosa, el procedimiento que comprende una técnica de estratificación iterativa en la que cada capa se forma por congelación o liofilización seguida de rehidratación, antes de la adición de una capa siguiente, en el que la capa final se forma por liofilización de la estructura multicapa. Adecuadamente, el andamiaje se basa en colágeno, y cada capa se forma a partir de una suspensión de colágeno en un disolvente, típicamente un disolvente ácido débil, adecuadamente una suspensión homogénea de colágeno, que inicialmente está en forma de una suspensión, en el que se forma la capa (es decir, se solidifica) por congelación o liofilización. Cuando una capa se liofiliza, la capa se rehidrata típicamente usando el mismo disolvente que se usa en la suspensión de colágeno, idealmente un disolvente débilmente ácido.

En un modo de realización preferente de la invención, al menos dos de las capas del andamiaje se forman por liofilización. En un modo de realización preferente de la invención, todas las capas del andamiaje se forman por liofilización.

Por tanto, el procedimiento de la invención es un procedimiento iterativo en el que se forma una primera capa mediante congelación o criodesecación, a continuación se vierte una capa posterior sobre la primera capa y el material compuesto se congela o se criodeseca, etc. Típicamente se excluye un procedimiento en el que las capas

se forman por congelación o criodesecación y, después de la formación separada, las capas formadas se adhieren entre sí mediante, por ejemplo, pegado o sutura. Cuando el procedimiento implica la formación de las capas por congelación, la capa final se formará por criodesecación. Cuando el procedimiento implica la formación de cada capa mediante criodesecación, la capa o capas formadas se rehidratan antes de verter la siguiente capa.

5 Se debe entender que el término "suspensión homogénea de colágeno" significa una suspensión de colágeno en un disolvente (por ejemplo, un ácido débil) en la que el colágeno se distribuye homogéneamente por todo el disolvente. Las técnicas para proporcionar una suspensión homogénea de colágeno se describen a continuación, y serán conocidas por los expertos en la técnica. Idealmente, las suspensiones homogéneas de colágeno se proporcionan
10 en forma de suspensión. La(s) suspensión(ones) comprenden colágeno y, opcionalmente, uno o más componentes adecuados adicionales seleccionados de: un componente de fase mineral tal como un fosfato de calcio (es decir, una hidroxiapatita; un polímero, preferentemente un polímero biológico, por ejemplo, ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) o alginato o un glicosaminoglicano (GAG), tal como sulfato de condroitina o ácido hialurónico, o una combinación de GAG, y un producto biológico. El término "producto biológico" se debe entender como una molécula biológicamente activa. Los ejemplos de dichas moléculas incluyen ácidos nucleicos, por ejemplo, genes, ADN, ARN,
15 ácidos nucleicos de bajo peso molecular, proteínas, polipéptidos y péptidos, hormonas, factores de crecimiento, citocinas, metabolitos y células. La suspensión homogénea de colágeno comprende colágeno distribuido homogéneamente por toda la suspensión. Típicamente, el colágeno (y otros componentes, tales como la hidroxiapatita, cuando se incluye) se suspende en una solución ácida. La molaridad de la solución ácida empleada para preparar cada capa puede variar. Por tanto, en un modo de realización, la molaridad de la solución ácida usada para preparar la capa inferior puede ser de 0,5 M, mientras que la molaridad de la solución empleada para preparar las capas intermedias y superiores puede ser de 0,05 M. En los casos donde el procedimiento implique la rehidratación de una capa o capas formadas, la(s) capa(s) se rehidratan en una solución ácida, en general una solución ácida similar o idéntica a la usada en la formación de la capa.

20 En un modo de realización, el andamiaje (o cada capa del andamiaje) tiene una porosidad de al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 %. Idealmente, el andamiaje tiene una porosidad de al menos un 98 %, idealmente al menos un 985 %. A continuación se describe un procedimiento para determinar el % de porosidad.

30 En un modo de realización, el andamiaje (o cada capa del andamiaje) tiene un diámetro de poro promedio de al menos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 micrómetros. A continuación se describe un procedimiento para determinar el diámetro de poro promedio.

35 Típicamente, cada capa del andamiaje es distinta en su composición. En esta memoria descriptiva, el término "distinto/a en su composición" se debe entender que significa que las capas difieren en términos de su composición y/o morfología. En un modo de realización preferente, las capas difieren en términos de un parámetro seleccionado del grupo que consiste en: contenido de hidroxiapatita; tipo de colágeno; cantidad de colágeno; tipo de GAG; y cantidad de GAG. En un modo de realización, cada capa comprende uno o más constituyentes seleccionados del grupo que consiste en: colágeno de tipo I; un colágeno que no sea de tipo I (por ejemplo, colágeno de tipo II); y una fase mineral (por ejemplo, una hidroxiapatita). Idealmente, en un modo de realización en el que el andamiaje comprende tres capas, la primera capa comprende colágeno e hidroxiapatita, la segunda capa comprende colágeno e hidroxiapatita en la que el contenido de colágeno es diferente del de la primera capa, y la tercera capa comprende colágeno y poca o ninguna hidroxiapatita.

45 En un modo de realización de la invención, el procedimiento es un procedimiento de producción de un andamiaje de colágeno de tres capas que imita típicamente tanto la morfología como la composición del tejido osteocondral anatómico sano, y en el que una primera capa exterior comprende colágeno de tipo I e hidroxiapatita. Esta capa imita el hueso subcondral. Adecuadamente, la capa interior comprende un colágeno de tipo I, colágeno de tipo II, hidroxiapatita y, opcionalmente, uno o más GAG. Esta capa imita el cartilago calcificado articular intermedio. Típicamente, la segunda capa exterior comprende un material compuesto de colágeno de tipo I, colágeno de tipo II y poca o ninguna hidroxiapatita, en la que una proporción de colágeno de tipo I respecto a colágeno de tipo II en la capa interior es de 1:4 a 4:1 (p/p). La segunda capa exterior imita la capa cartilaginosa suprayacente.

55 Cuando el andamiaje es un andamiaje de tres capas, el procedimiento típicamente comprende las etapas de:
- preparar una primera suspensión homogénea de colágeno y liofilizar la suspensión para proporcionar una primera capa;

60 - rehidratar la primera capa formada;

- preparar una segunda suspensión homogénea de colágeno y verter la segunda suspensión homogénea sobre la primera capa rehidratada para formar un material compuesto de dos capas, y liofilizar el material compuesto de dos capas;

65 - rehidratar el material compuesto de dos capas; y

- preparar una tercera suspensión homogénea de colágeno y verter la tercera suspensión homogénea sobre el material compuesto de dos capas para formar un material compuesto de tres capas, y liofilizar el material compuesto de tres capas para formar el andamiaje de colágeno de tres capas.

5 Estará claro que el procedimiento de la invención se puede emplear para producir andamiajes de colágeno multicapa que tienen dos, tres, cuatro o más capas. Además, estará claro que el procedimiento es un procedimiento iterativo para formar un andamiaje estratificado polifásico en el que las capas se añaden secuencialmente al material compuesto mediante un procedimiento de congelación o liofilización, y en el que, después de verter una nueva capa, la estructura estratificada de material compuesto se congela o liofiliza.

10 Idealmente, el andamiaje de material compuesto de colágeno multicapa está reticulado. Típicamente, el andamiaje de material compuesto está reticulado por uno o más de los medios seleccionados del grupo que comprende: reticulación deshidrotérmica (DHT); y reticulación química. Los agentes y procedimientos de reticulación química adecuados serán bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) o glutaraldehído. Idealmente, el andamiaje se reticula usando la reticulación de DHT y EDAC. La reticulación se puede llevar a cabo en cualquier fase del procedimiento de fabricación. En un modo de realización preferente, la simetría de los poros del andamiaje se puede controlar variando el grado de reticulación dentro de cada capa respectiva usando procedimientos de reticulación familiares para un experto en la técnica. De forma similar, en otro modo de realización, la permeabilidad o la conductividad del flujo del andamiaje se pueden variar variando las propiedades mecánicas del andamiaje usando bien la reticulación u otras metodologías de mejora de la rigidez conocidas por los expertos en la técnica.

15 Típicamente, la primera suspensión homogénea comprende colágeno, idealmente colágeno de tipo I, y una fase mineral, idealmente hidroxiapatita (denominada en el presente documento capa "inferior" u "ósea"). Idealmente, la segunda suspensión homogénea comprende colágeno, típicamente dos tipos de colágeno, tales como el colágeno de tipo I y un colágeno que no sea de tipo I (típicamente colágeno de tipo II), y una fase mineral, idealmente hidroxiapatita I (denominada en el presente documento capa "intermedia"). Adecuadamente, la tercera suspensión homogénea comprende colágeno, típicamente dos tipos de colágeno, tales como el colágeno de tipo I y un colágeno diferente, tal como el colágeno de tipo II, y opcionalmente un polímero, por ejemplo, un GAG, tal como el sulfato de condroitina o el ácido hialurónico o una combinación de GAG (denominada en el presente documento capa "superior" o "de cartílago"). Típicamente, el tamaño de poro de la capa superior es mayor que el de la capa intermedia. Adecuadamente, el tamaño de poro de la capa intermedia es mayor que el de la capa inferior. La proporción de colágeno de tipo I respecto a colágeno de tipo II en la capa superior (de cartílago) puede variar de 1:0 a 0:1. Idealmente, varía de 1:4 a 4:1 (p/p).

20 En un modo de realización preferente, el tamaño de poro y/o el gradiente de distribución de tamaño de poro varían independientemente dentro de cada capa. Esto se puede lograr, por ejemplo, variando el espesor de la suspensión usada para cada capa. Además, el espesor de cada capa individual se puede variar en cada una de las capas del andamiaje multicapa entre 1 mm y 15 mm usando diferentes volúmenes de suspensión durante el procedimiento de congelación o liofilización. La conformación del andamiaje producido también se puede variar usando bandejas contorneadas que se adaptan a la curvatura anatómica requerida.

25 Por tanto, en un modo de realización particularmente preferente de la invención, el procedimiento comprende las etapas de:

30 - preparar una primera suspensión homogénea de colágeno de tipo I y HA en forma de suspensión y congelar o liofilizar la suspensión para proporcionar una primera capa;

35 - cuando la primera capa se forma por criodesecación, rehidratar la primera capa formada;

40 - preparar una segunda suspensión homogénea de colágeno de tipo I, colágeno de tipo II e HA en forma de suspensión y verter la suspensión sobre la primera capa para formar un material compuesto de dos capas, y congelar o liofilizar el material compuesto de dos capas;

45 - cuando la segunda capa se forma por criodesecación, rehidratar la segunda capa;

50 - preparar una tercera suspensión homogénea de colágeno de tipo I y colágeno de tipo II y opcionalmente un polímero (por ejemplo, uno o más GAG) y/o una molécula biológicamente activa y añadir la tercera suspensión homogénea sobre el material compuesto de dos capas para formar un material compuesto de tres capas, y liofilizar el material compuesto de tres capas para formar el andamiaje de colágeno de tres capas; y

55 - opcionalmente, reticular uno o más de las capas del andamiaje.

60 Idealmente, todas las capas del andamiaje se reticulan en una sola etapa de reticulación. Sin embargo, cada capa se puede reticular en etapas separadas, por ejemplo, mediante la reticulación de una capa o capas después de una

etapa de congelación o liofilización.

5 El procedimiento de la invención típicamente implica la liofilización de las capas, bien después de cada etapa iterativa, y/o como parte de la etapa final. Este es un procedimiento en el que la suspensión se congela, típicamente a una temperatura de congelación final de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a continuación se sublima bajo presión. En un modo de realización, la temperatura de congelación final deseada es entre $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Adecuadamente, la temperatura de congelación final deseada es entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Típicamente, la temperatura de congelación final deseada es entre $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$, idealmente de aproximadamente $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

10 En un modo de realización de la invención, la criodesecación se lleva a cabo a una velocidad de enfriamiento constante. Esto significa que la velocidad de enfriamiento no varía en más de $\pm 10\%$ de la velocidad de enfriamiento objetivo, es decir, si la velocidad de enfriamiento deseada es de $1,0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y la velocidad de enfriamiento real varió entre $0,9\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y $1,1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, esto no obstante todavía se consideraría como una velocidad de enfriamiento constante. Típicamente, la velocidad de enfriamiento constante es entre $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.
15 Preferentemente, la criodesecación se lleva a cabo a una velocidad de enfriamiento constante de entre $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y $1,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Más preferentemente, la criodesecación se lleva a cabo a una velocidad de enfriamiento constante de entre $0,8\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y $1,1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Típicamente, la criodesecación se lleva a cabo a una velocidad de enfriamiento constante de aproximadamente $0,9\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. La temperatura de la cámara de criodesecación a un comienzo del procedimiento de criodesecación (es decir, cuando la suspensión se coloca en la cámara) normalmente es mayor que $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, preferentemente a aproximadamente temperatura ambiente.
20

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 criodesecación a una temperatura de sublimación (en general, de aproximadamente $0\text{ }^{\circ}\text{C}$), preferentemente a una velocidad de calentamiento constante. Típicamente, el procedimiento incluye una etapa de sublimación final donde una fase de hielo en el andamiaje formado se sublima a vacío durante un período de tiempo adecuado.
25

En otro modo de realización de la invención, el procedimiento de criodesecación comprende una etapa de recocido. Típicamente, esta etapa implica incrementar la temperatura en la cámara de criodesecación después de que se haya alcanzado la temperatura final de congelación, y típicamente mantener la temperatura incrementada durante un período de tiempo antes de iniciar la fase de secado. Por ejemplo, si la temperatura de congelación final es de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, la etapa de recocido se puede llevar a cabo incrementando la temperatura hasta $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y manteniendo esa temperatura durante un tiempo suficiente para permitir que crezcan los cristales de hielo existentes, antes de secar finalmente el andamiaje. El tiempo de recocido puede variar de acuerdo con las características de poro deseadas; sin embargo, son preferentes tiempos de recocido de entre 15 minutos y 120 horas.
30
35

En general, la HA empleada en la presente invención está en forma de polvo. Adecuadamente, el polvo de HA se selecciona del grupo que comprende: polvo de HA sinterizado; y polvo de HA no sinterizado. Los expertos en la técnica conocerán ejemplos de polvos de HA sinterizados y no sinterizados adecuados para la presente invención, y se proporcionan a continuación. Se apreciará que la HA se emplea como una fase mineral en las capas donde se emplea. A este respecto, resultará evidente para el experto en la técnica que el procedimiento y los productos de la invención se pueden realizar reemplazando la HA por una fase mineral alternativa tal como, por ejemplo, brushita, α -TCP o β -TCP. Otros materiales de fase mineral adecuados serán bien conocidos por el experto en la técnica.
40

45 Típicamente, el polvo de HA tiene un tamaño de partícula de entre 10 nm y $100\text{ }\mu\text{m}$.

Adecuadamente, el colágeno empleado en la presente invención comprende fibras de colágeno. Preferentemente, las fibras de colágeno comprenden colágeno microfibrilar, preferentemente colágeno de tendón bovino microfibrilar para colágeno de tipo I y cartílago porcino para colágeno de tipo II.
50

La suspensión o suspensiones homogénea(s) de colágeno comprenden colágeno suspendido en una solución ácida. Típicamente, la solución ácida tiene una molaridad de al menos $0,01\text{ M}$. Adecuadamente, la molaridad de la solución ácida es de al menos $0,06\text{ M}$, $0,07\text{ M}$, $0,08\text{ M}$, $0,09\text{ M}$, $0,1\text{ M}$, $0,2\text{ M}$, $0,3\text{ M}$, $0,4\text{ M}$, $0,5\text{ M}$ o 1 M . Idealmente, la molaridad de la solución ácida es de entre $0,4\text{ M}$ y $0,6\text{ M}$. Idealmente, el ácido es un ácido orgánico, preferentemente ácido acético, aunque se pueden emplear otros ácidos orgánicos.
55

La(s) capa(s) liofilizada(s) se rehidratan en una solución ácida que tiene una molaridad preferentemente de al menos $0,015\text{ M}$, preferentemente de al menos $0,02\text{ M}$, y típicamente en un intervalo de $0,02\text{ M}$ a $0,03\text{ M}$, adecuadamente de aproximadamente $0,023\text{ M}$ a $0,027\text{ M}$, e idealmente de aproximadamente $0,025\text{ M}$. Idealmente, el ácido es ácido acético, aunque se pueden emplear otros ácidos orgánicos débiles.
60

En un modo de realización de la invención en el que la suspensión homogénea comprende suspensión de colágeno e hidroxiapatita (CHA), la proporción de HA respecto a colágeno en la suspensión es típicamente mayor que 1:10 (p/p), y la molaridad de la solución ácida es mayor que $0,01\text{ M}$. Típicamente, la proporción de HA respecto a colágeno en la suspensión es de al menos 2:10 (p/p), 3:10 (p/p), 4:10 (p/p), 5:10 (p/p). En un modo de realización preferente de la invención, la proporción de HA respecto a colágeno es de 1:10 (p/p) a 100:10 (p/p), adecuadamente
65

de 1:10 (p/p) a 50:10 (p/p), adecuadamente de 5:10 (p/p) a 30:10 (p/p).

En un modo de realización preferente de la invención, la proporción de HA respecto a colágeno en la primera suspensión homogénea es de al menos 5:10 (p/p), y en el que la molaridad de la solución ácida es de al menos 0,1 M. Típicamente, la molaridad de la solución ácida es de al menos 0,50 M.

En un modo de realización preferente de la invención, la proporción de HA respecto a colágeno en la primera suspensión homogénea es de al menos 1:2 (p/p), 1:1 (p/p), 2:1 (p/p), 3:1 (p/p), 4:1 o 5:1 (p/p). En un modo de realización de la invención, la proporción de HA respecto a colágeno en la primera suspensión homogénea es mayor que 5:1 (p/p). En general, cuando dichos niveles de HA se emplean en la suspensión, la molaridad de la solución ácida será de al menos 0,5 M.

En un modo de realización preferente, la cantidad de colágeno en la suspensión puede variar desde 0,5 g/l hasta 50 g/l de solución ácida (1/10 y 10 veces la concentración de colágeno estándar, respectivamente). Adecuadamente, la cantidad de colágeno en la suspensión es entre 1,0 g/l y 10,0 g/l, preferentemente entre 3,0 g/l y 8,0 g/l, y más preferentemente entre 4,0 g/l y 6,0 g/l.

Típicamente, la solución ácida comprende una solución de ácido acético. Sin embargo, se pueden emplear otros ácidos orgánicos para formar la solución ácida.

Adecuadamente, las suspensiones homogéneas de colágeno se forman en condiciones adecuadas para minimizar la gelatinización del colágeno. Un procedimiento para garantizar una gelatinización mínima del colágeno durante la producción de la suspensión homogénea es mantener la suspensión a una temperatura suficientemente baja, en general entre 1 °C y 5 °C, adecuadamente a aproximadamente 4 °C.

Los avances más recientes en ingeniería de tejidos de cartílago implican el uso de andamiajes como factor de crecimiento o sistemas portadores de genes. Existen una serie de factores de crecimiento esenciales que proporcionan efectos reguladores sobre los condrocitos o las células madre implicadas en la maduración de los condrocitos y la formación de cartílago. Estos incluyen la superfamilia TGF- β , IFG, FGF, BMP, PDGF y EGF (Lee SH, Shin H; 2007). Miljkovic *et al.* (Miljkovic *et al.* 2008) informan sobre la administración exitosa de BMP-4 para el tratamiento de defectos del cartílago. Por tanto, en un modo de realización de la invención, el procedimiento incluye una etapa adicional de incorporación de un producto biológico en el andamiaje de material compuesto de colágeno multicapa. Esto se podría lograr, por ejemplo, empapando el andamiaje preparado en una solución que contiene el factor de crecimiento (o células) de interés, a través de reticulación o usando la transcripción. Adecuadamente, el material biológico (producto biológico) se selecciona de los grupos de: células; y factores de crecimiento biológico. Típicamente, los factores de crecimiento biológico se seleccionan del grupo que consiste en uno o más de la superfamilia 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 empapado posterior a la fabricación de los andamiajes. Típicamente, las células se seleccionan del grupo que consiste en condrocitos, osteoblastos o células madre mesenquimales, aunque se pueden emplear otras células. La invención también se refiere a una construcción de ingeniería de tejidos con sembrado celular que comprende un andamiaje de colágeno multicapa de acuerdo con la invención que tiene células incorporadas en el andamiaje, idealmente en los poros del andamiaje. Las construcciones de ingeniería de tejidos con sembrado celular de la invención se pueden preparar sembrando un andamiaje de la invención con células y, a continuación, cultivando las células *in vitro*, antes del uso (implantación) de la construcción. En consecuencia, la invención también se refiere a un procedimiento de producción de una construcción de ingeniería de tejidos con sembrado celular del tipo que comprende un andamiaje de colágeno multicapa de acuerdo con la invención, en el que las células se disponen dentro de los poros del andamiaje, comprendiendo el procedimiento las etapas de sembrar células a partir de un huésped sobre el andamiaje, y cultivar las células sobre el andamiaje antes de la implantación en un defecto.

Adicionalmente, estos andamiajes son ideales para su uso como mecanismos de administración para la administración de tratamiento génico, bien a través de vectores de administración víricos o no víricos. La idea de un vector de administración de genes contenido dentro de un andamiaje biodegradable, aunque no es nueva, es un desarrollo reciente en el campo de la medicina regenerativa y el sistema se ha acuñado como una "matriz activada por genes" (GAM). El tratamiento génico puede ser una herramienta valiosa para evitar las limitaciones de la administración local de factores de crecimiento, incluyendo una semivida corta, un requisito de dosis grande, un costo elevado, la necesidad de aplicaciones repetidas y una distribución deficiente.

La invención también se refiere a una construcción de ingeniería de tejidos con sembrado celular que comprende un andamiaje de colágeno multicapa de acuerdo con la invención, en el que las células se disponen dentro de los poros del andamiaje.

La invención también se refiere a un andamiaje de colágeno multicapa de la invención, o a una construcción de ingeniería de tejidos con sembrado celular de la invención, para su uso en un procedimiento de reparación de un defecto tisular tal como un defecto osteocondral en un mamífero, que comprende las etapas de proporcionar un andamiaje de colágeno multicapa de la invención, conformar el andamiaje para encajar en el defecto, opcionalmente

empapar el andamiaje, bien antes o después de la conformación, en una solución de material biológico, e insertar el andamiaje en el defecto. Opcionalmente, el material biológico se puede incorporar en los andamiajes durante el procedimiento de fabricación. Típicamente, el andamiaje tiene una capa de base que comprende colágeno y HA, y en el que el andamiaje se inserta en el defecto de modo que la capa base se apoya en la parte más profunda del defecto. En un modo de realización, el defecto también se conforma para garantizar un buen ajuste entre el defecto y el andamiaje. Los ejemplos de otros defectos tisulares que se pueden reparar usando los andamiajes de la invención incluyen defectos mandibulares/maxilofaciales, defectos cardiovasculares, reconstrucción traqueal, reparación de defectos del cartílago dentro de cualquier articulación dentro del sistema esquelético (por ejemplo, cadera, rodilla, hombro, tobillo, mano, pie, cuello, columna vertebral), cualquier defecto del tejido blando dentro del cuerpo, artritis reumatoide, artrosis, cualquier forma de artritis que dé como resultado en daño del cartílago, reparación del daño colateral en las articulaciones debido a un traumatismo (por ejemplo, ligamento cruzado anterior, manguito de los rotadores desgarrado, tobillo roto/dislocado, reparación del menisco), reparación de la articulación del tobillo y reconstrucción de tejidos blandos (maxilofacial, aumento de tejidos).

15 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Sección transversal de 10 μm teñida con azul de toluidina de la capa inferior de CHA de un andamiaje de 2 capas, que muestra la presencia de partículas de hidroxiapatita (HA) dentro de los puntales del andamiaje. Esto confirma que la HA permanece dentro del andamiaje durante el "procedimiento de estratificación iterativa". (Andamiaje de CHA de capa inferior = 200 % en peso de HA)

Figura 2: Estructura de los poros del andamiaje de 2 capas de 200 % en peso de CHA/Col1. La estructura de los poros del andamiaje se investigó incrustando el andamiaje y, a continuación, seccionándola hasta un espesor de 10 μm usando un microtomo. Los cortes se montaron en portaobjetos de vidrio y los puntales del andamiaje se tiñeron usando tinción con azul de toluidina. La figura 3 muestra una imagen de una micrografía de las secciones histológicas del andamiaje de 2 capas al 200 % en peso de CHA (capa de base)/Col1 (capa superior) usando microscopía óptica. Las micrografías indican que las capas de base de 200 % en peso retienen su estructura de los poros durante el procedimiento de "criodeseccación iterativa". La capa superior también muestra una morfología de poro equiaxial.

Figura 3: Patrones XRD para el polvo puro de HA en azul y el andamiaje de CHA de capa inferior en negro, con los picos característicos para HA en rojo. (Andamiaje de CHA de capa inferior = 200 % en peso de HA). Esto muestra que la HA se ha incorporado con éxito al andamiaje y que la pureza de la fase no se ve afectada por el procedimiento.

Figura 4: Comparación de las propiedades mecánicas de un andamiaje de colágeno estándar, la capa inferior u ósea (capa 3 que contiene colágeno de tipo I y 200 % en peso de HA), la capa intermedia (capa 2 que contiene cantidades iguales de colágeno de tipo I, colágeno de tipo II y HA) y la capa superior o de cartílago (capa 1 que contiene cantidades iguales de colágeno de tipo I y tipo II) y un andamiaje de 3 capas después del tratamiento con DHT a 105 °C durante 24 horas.

Figura 5: Permeabilidad de las capas individuales del andamiaje en comparación con la de un andamiaje de colágeno puro. (CHA de capa inferior = 200 % en peso de HA, capa intermedia = colágeno de tipo I en ácido acético 0,05 M : colágeno de tipo II en ácido acético 0,05 M : 200 % en peso de HA en ácido acético 0,5 M (1:1:1), capa superior = colágeno de tipo I en ácido acético 0,05 M : colágeno de tipo II en ácido acético 0,05 M (1:1)).

Figura 6: Micrografías representativas de la estructura de los poros de cada una de las capas componentes del andamiaje de 3 capas producido de forma aislada que muestra la arquitectura de poro homogénea. (CHA de capa inferior = 200 % en peso de HA, capa intermedia = colágeno de tipo I en ácido acético 0,05 M : colágeno de tipo II en ácido acético 0,05 M : 200 % en peso de HA en ácido acético 0,5 M (1:1:1), capa superior = colágeno de tipo I en ácido acético 0,05 M : colágeno de tipo II en ácido acético 0,05 M (1:1)).

Figura 7: Porosidad de un andamiaje de colágeno estándar, cada una de las capas componentes del andamiaje de 3 capas producido de forma aislada, y un andamiaje de 3 capas, que muestra la alta porosidad de todas las variantes del andamiaje. (CHA de capa inferior = 200 % en peso de HA, capa intermedia = colágeno de tipo I en ácido acético 0,05 M : colágeno de tipo II en ácido acético 0,05 M : 200 % en peso de HA en ácido acético 0,5 M (1:1:1), capa superior = colágeno de tipo I en ácido acético 0,05 M : colágeno de tipo II en ácido acético 0,05 M (1:1)).

Figura 8: Comparación de los diámetros de poro de cada una de las capas componentes del andamiaje de 3 capas producido de forma aislada. Se encontró que los diámetros de poro promedio varían de 112 μm (andamiaje de capa intermedia) a 136 μm (andamiaje de capa inferior). (CHA de capa inferior = 200 % en peso de HA, capa intermedia = colágeno de tipo I en ácido acético 0,05 M : colágeno de tipo II en ácido acético 0,05 M : 200 % en peso de HA en ácido acético 0,5 M (1:1:1), capa superior = colágeno de tipo I en ácido acético 0,05 M : colágeno de tipo II en ácido acético 0,05 M (1:1)).

Figura 9: Micrografías SEM del andamiaje de 3 capas que muestran la estructura altamente porosa, el alto grado de interconexión de los poros y la integración perfecta de las capas componentes. (CHA de capa inferior = 200 % en peso de HA, capa intermedia = colágeno de tipo I en ácido acético 0,05 M : colágeno de tipo II en ácido acético 0,05 M : 200 % en peso de HA en ácido acético 0,5 M (1:1:1), capa superior = colágeno de tipo I en ácido acético 0,05 M : colágeno de tipo II en ácido acético 0,05 M (1:1). Este ejemplo se produjo usando la 'técnica de estratificación iterativa' y la criodesecación usando una temperatura de congelación de -40 °C).

Figura 10: Los números de células para los andamiajes de 3 capas en comparación con andamiajes de colágeno a los 7 y 14 días que muestran un incremento en el número de células de aproximadamente el 50 % desde el día 7 hasta el día 14 tanto para el andamiaje de colágeno como para el andamiaje de 3 capas. (CHA de capa inferior = 200 % en peso de HA, capa intermedia = colágeno de tipo I en ácido acético 0,05 M : colágeno de tipo II en ácido acético 0,05 M : 200 % en peso de HA en ácido acético 0,5 M (1:1:1), capa superior = colágeno de tipo I en ácido acético 0,05 M : colágeno de tipo II en ácido acético 0,05 M (1:1). Este ejemplo se produjo usando la 'técnica de estratificación iterativa' y la criodesecación usando una temperatura de congelación de -40 °C).

Figura 11: La contracción del andamiaje de 3 capas en comparación con un andamiaje de colágeno estándar a los 7 y 14 días después de la siembra con preosteoblastos de ratón MC3T3-E1. Se encontró que el andamiaje de 3 capas se contrae en menor medida que el andamiaje de colágeno estándar. (CHA de capa inferior = 200 % en peso de HA, capa intermedia = colágeno de tipo I en ácido acético 0,05 M : colágeno de tipo II en ácido acético 0,05 M : 200 % en peso de HA en ácido acético 0,5 M (1:1:1), capa superior = colágeno de tipo I en ácido acético 0,05 M : colágeno de tipo II en ácido acético 0,05 M (1:1). Este ejemplo se produjo usando la 'técnica de estratificación iterativa' y la criodesecación usando una temperatura de congelación de -40 °C).

Figura 12: Secciones transversales teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) preparadas histológicamente del andamiaje de 3 capas después de 14 días de cultivo *in vitro* con preosteoblastos de ratón MC3T3-E1. (CHA de capa inferior = 200 % en peso de HA, capa intermedia = colágeno de tipo I en ácido acético 0,05 M : colágeno de tipo II en ácido acético 0,05 M : 200 % en peso de HA en ácido acético 0,5 M (1:1:1), capa superior = colágeno de tipo I en ácido acético 0,05 M : colágeno de tipo II en ácido acético 0,05 M (1:1). Este ejemplo se produjo usando la 'técnica de estratificación iterativa' y la criodesecación usando una temperatura de congelación de -40 °C).

Figura 13: Imagen histológica de un andamiaje de colágeno de tipo I/ácido hialurónico (HyA) que contiene 10 mg/ml de HyA, después de 21 días de cultivo con MSC de rata en medio condrogénico, teñido con verde rápido, safranina-O y hematoxilina.

Figura 14: Resultados de las pruebas de resistencia de adherencia de las capas para los andamiajes de 2 y 3 capas. (andamiajes de 2 capas = CHA de capa inferior = 200 % en peso de HA, capa superior = colágeno de tipo I en ácido acético 0,05 M; andamiajes de 3 capas = CHA de capa inferior = 200 % en peso de HA, capa intermedia = colágeno de tipo I en ácido acético 0,05 M : colágeno de tipo II en ácido acético 0,05 M : 200 % en peso de HA en ácido acético 0,5 M (1:1:1), capa superior = colágeno de tipo I en ácido acético 0,05 M : colágeno de tipo II en ácido acético 0,05 M (1:1). Ambos producidos usando la 'técnica de estratificación iterativa' y la criodesecación usando una temperatura de congelación de -40 °C).

Figura 15: Andamiaje de 3 capas a) Imagen SEM que muestra la microestructura del andamiaje, b) Secciones teñidas con H&E 14 días después de la siembra.

Figura 16: A - ChondroColl - andamiaje de 3 capas. B - Imágenes histológicas de zonas superficiales, intermedias y profundas de cartílago normal que muestran la orientación de los condrocitos.

Figura 17: Imágenes histológicas de zonas superficiales, intermedias y profundas de cartílago normal que muestran la orientación de los condrocitos.

Descripción detallada de la invención

Materiales y procedimientos

EJEMPLO 1

El modo de realización 1 se refiere a la producción de un andamiaje de dos capas usando la técnica de "criodesecación iterativa". La invención consiste en una capa de hueso de base compuesta por colágeno de tipo I y preferentemente 200 % en peso de hidroxiapatita, pero esto puede variar desde 0 % en peso de HA hasta 500 % en peso de HA. La capa superior de cartílago está compuesta de colágeno de tipo I y tipo II. La proporción de colágeno de tipo I respecto a colágeno de tipo II puede ser de 0:1 a 1:0.

La suspensión preferente de 200 % en peso de colágeno/HA (CHA) para la capa ósea del andamiaje se prepara como sigue: Se prepararon 240 ml de preferentemente ácido acético 0,5 M (esto puede variar de 0,05 M a 10 M) añadiendo 6,9 ml de ácido acético glacial a 233,1 ml de agua desionizada destilada. Se colocaron 1,2 g de colágeno

de tendón bovino microfibrilar (Collagen Matrix Inc., NJ, EE.UU.) en un vaso de precipitados y se añadieron 100 ml de solución de ácido acético 0,5 M. El vaso de precipitados se refrigeró a 4 °C durante la noche para permitir que el colágeno se hinchase y, por tanto, se mezclase más fácilmente. Se usó un sistema de enfriamiento por agua WK1250 (Lauda, Westbury, NY, EE.UU.) para enfriar un recipiente de reacción de vidrio a 4 °C. Se añadió la solución de colágeno y ácido acético al recipiente de reacción. Se añadieron 100 ml de la solución de ácido acético 0,5 M al vaso de precipitados para retirar cualquier colágeno restante y, a continuación, se vertieron en el recipiente de reacción. Los componentes se mezclaron usando una mezcladora vertical IKA Ultra Turrax T18 (IKA Works Inc., Wilmington, NC) a 15.000 rpm durante 90 minutos. Los componentes de la suspensión se mantuvieron a 4 °C durante la mezcla para evitar la desnaturalización del colágeno como resultado del calor generado durante el procedimiento.

Se añadieron 2,4 g de polvo de hidroxiapatita (HA) (Captal 'R' Reactor Powder, Plasma Biotal, Reino Unido) a 40 ml de la solución de ácido acético 0,5 M. La suspensión de HA en ácido acético se mezcló en un dispositivo de administración de tipo jeringa creando una suspensión homogénea de partículas de HA dentro de la solución de ácido acético. Se añadieron 10 ml de la suspensión de HA a la suspensión de colágeno durante la mezcla colocando la punta del tubo del dispositivo de administración de HA en el centro de vórtice creado por la mezcladora. Esto garantizó una rápida dispersión de la suspensión de HA en la suspensión de colágeno. Se añadieron 10 ml de la suspensión de HA a la suspensión cada hora (4 adiciones de 10 ml de suspensión de HA en total). La suspensión se mezcló durante otros 60 minutos después de la adición de los 10 ml finales de HA, dando un tiempo de mezcla total de 330 minutos (5 horas y media). El intervalo entre la adición de las partes alícuotas de la suspensión de HA se puede variar de 30 a 240 minutos. El número de adiciones también se puede variar, preferentemente la HA se añade en al menos 2 partes alícuotas.

Las suspensiones de CHA que contienen otras cantidades de HA se pueden producir variando la cantidad de HA añadida, por ejemplo, para una suspensión al 100 % en peso de CHA, se añadirían 1,2 g de polvo de HA a 40 ml de ácido acético 0,5 M. Los ejemplos de dichas suspensiones se describen en la solicitud de patente internacional (Publicación) n.º. WO2008/096334 (Royal College of Surgeons en Irlanda).

Después de la mezcla, la suspensión se desgasificó en un matraz cónico conectado a una bomba de vacío durante 30 minutos para retirar las burbujas de aire no deseadas dentro de la suspensión. A continuación se colocaron 15,6 ml de la suspensión en una bandeja de acero inoxidable de grado 304 cuadrada de 60 mm x 60 mm. A continuación, la suspensión se criodesecó en un criodesecador Virtis (VirTis Co., Gardiner, NY, EE.UU.). El ciclo de criodesecación usado se puede variar para producir andamiajes con diferentes estructuras de poro. Esto se logra variando la temperatura de congelación usada de -10 °C a -70 °C. El ciclo de criodesecación a -40 °C consistió en las siguientes etapas: La bandeja se colocó en un estante del criodesecador a 20 °C. El ciclo implicó enfriar el estante a -40 °C a una velocidad constante preferente de 0,9 °C/min, basado en los hallazgos de un estudio previo (O'Brien FJ; 2004). La velocidad de enfriamiento seleccionada puede variar de 0,1 °C/min a 10 °C/min. La temperatura del estante se mantuvo a continuación constante durante 60 minutos hasta completar el procedimiento de congelación. A continuación, la temperatura del estante se elevó a 0 °C durante 160 minutos. A continuación, la fase de hielo se sublimó a vacío de 200 mTorr a 0 °C durante al menos 17 horas para producir el andamiaje de CHA poroso.

Se produjo una suspensión de colágeno de tipo I (Col1) como sigue:

La suspensión de Col1 preferente contiene 5 g/l de colágeno de tipo I suspendido en ácido acético 0,05 M. La cantidad de Col1 se puede variar entre 5 g/l y 50 g/l. La concentración de ácido acético usada puede variar entre 0,01 M y 10 M. Se prepararon 240 ml de ácido acético 0,05 M añadiendo 0,69 ml de ácido acético glacial a 239,31 ml de agua desionizada destilada. Se añadieron 160 ml de ácido acético 0,05 M a 0,8 g de Col1 y se dejó hinchar durante la noche en el refrigerador a 4 °C. Se usó un sistema de enfriamiento por agua WK1250 (Lauda, Westbury, NY, EE.UU.) para enfriar un recipiente de reacción de vidrio a 4 °C. Se añadió la solución de colágeno y ácido acético al recipiente de reacción y los componentes se mezclaron durante 90 minutos. Después de la mezcla, la suspensión se desgasificó en un matraz cónico conectado a una bomba de vacío durante 30 minutos para retirar las burbujas de aire no deseadas dentro de la suspensión. La suspensión se colocó en una botella y se almacenó en un refrigerador a 4 °C. La concentración de ácido acético usada para producir la suspensión de Col1 se puede variar de 0,01 M a 10 M.

Procedimiento de estratificación iterativa

El andamiaje de CHA de la capa ósea se rehidrató en una solución de ácido acético para evitar el colapso del andamiaje después de la adición de la suspensión de la segunda capa y también para evitar la infiltración excesiva de la suspensión de la segunda capa en el andamiaje de base. La concentración de la solución de ácido acético se puede variar de 0,001 M de ácido acético a 5 M, siendo la concentración preferente de solución de ácido acético de 0,025 M. Se prepararon 800 ml de ácido acético 0,025 M añadiendo 1,1 ml de ácido acético glacial a 798,9 ml de agua desionizada destilada. La rehidratación implicó llenar la bandeja de criodesecación de 60 mm x 60 mm con ácido acético y colocar el andamiaje en ella. A continuación se colocó a vacío hasta que el andamiaje se había rehidratado completamente y se habían retirado las burbujas de aire del andamiaje. El exceso de ácido acético se retiró con una pipeta. Se pipetearon cuidadosamente en la parte superior 15,6 ml de la suspensión de colágeno de la

capa superior. La construcción de dos capas se devolvió a continuación al criodesecador y se criodesecó usando el procedimiento de criodesecación descrito anteriormente.

EJEMPLO 2

5 El modo de realización 2 se refiere a un andamiaje de tres capas, la capa base del andamiaje tiene propiedades estructurales y de composición similares a la capa de hueso subcondral y consiste en los constituyentes primarios del hueso; colágeno de tipo I (la fase orgánica) e hidroxiapatita (la fase mineral). La capa intermedia tiene una
10 composición similar al cartílago calcificado y consiste en colágeno de tipo II que está presente en el cartílago y también colágeno de tipo I e hidroxiapatita (presente en el hueso). La capa superior, modelada sobre las zonas superficiales a profundas del cartílago articular, comprende colágeno de tipo I y de tipo II.

Capa ósea:

15 La capa ósea consistió en un andamiaje de CHA, con la cantidad de HA presente variando entre el 0 % en peso y el 500 % en peso. La suspensión de CHA se fabricó y se criodesecó como se describe en el modo de realización 1 anterior.

Capa intermedia:

20 La capa intermedia consistió en colágeno de tipo I (Col1) (Collagen Matrix Inc., NJ, EE.UU.), colágeno de tipo II (Col2) (colágeno de tipo II porcino, Biom'up, Lyon, Francia) e hidroxiapatita (HA) (Captal 'R' Reactor Powder, Plasma Biotal, Reino Unido).

25 Se produjo una suspensión de colágeno de tipo I (Col1) como se describe en el modo de realización 1. La suspensión de colágeno de tipo II (Col2) puede contener de 5 g/l a 50 g/l de colágeno de tipo II. La suspensión de Col2 de 5 g/l se produce colocando 0,2 g de Col2 en un vaso de precipitados de vidrio y añadiendo a continuación 40 ml de solución de ácido acético. La concentración de ácido acético usada se puede variar de 0,01 M a 0,5 M. La
30 solución se refrigeró a 4 °C durante la noche para permitir que el colágeno se hinchara. La solución se colocó en hielo y se mezcló usando un homogeneizador durante 30 minutos para producir una suspensión homogénea. Las suspensiones que contienen las mayores cantidades de Col2 se producen incrementando la cantidad de Col2 añadido, por ejemplo, una suspensión de Col2 al 1 % contiene 0,4 g de Col2 en 40 ml de ácido acético 0,05 M.

35 La suspensión de capa intermedia se produjo combinando la suspensión de CHA, la suspensión de Col1 y la suspensión de Col2, producidas como se describe en el modo de realización 1 y 2, en un vaso de precipitados de vidrio. Se mezclaron las 3 suspensiones mediante mezcla usando un homogeneizador durante 30 minutos hasta que se produjo una solución homogénea. A continuación, la suspensión homogénea se desgasificó para retirar las burbujas de aire colocando el vaso de precipitados en una cámara de vacío conectada a una bomba de vacío. La
40 cantidad de cada suspensión componente en la capa intermedia se puede variar entre un 0 % y un 100 %.

45 Antes de la adición de la suspensión de la capa intermedia al andamiaje de la capa ósea, el andamiaje de la capa ósea se rehidrató. Esto es necesario para prevenir el colapso del andamiaje. El medio de rehidratación preferente era una solución de ácido acético de 0,025 M. Se prepararon 800 ml de ácido acético 0,025 M añadiendo 1,1 ml de ácido acético glacial a 798,9 ml de agua desionizada destilada.

50 Se usó una bandeja de acero inoxidable de grado 304 cuadrada de 60 mm x 60 mm para producir los andamiajes estratificados. Se produjo un andamiaje de capa ósea de CHA y se rehidrató como se describe en el modo de realización 1. Se pipetearon 15,6 ml de la suspensión de la capa intermedia sobre la capa ósea de CHA rehidratada. La cantidad añadida a cada una se puede variar para obtener un espesor de capa intermedia de entre 1 mm y 15 mm. La construcción de 2 capas se criodesecó a continuación como se describe en el modo de realización 1.

Capa de cartílago:

55 La suspensión de la capa de cartílago se produjo colocando la suspensión de Col1 y la suspensión de Col2, producidas como se describe anteriormente, en un vaso de precipitados, colocando el vaso de precipitados en hielo y después mezclando hasta que se produjo una solución homogénea. A continuación, la suspensión homogénea se desgasificó para retirar las burbujas de aire colocando el vaso de precipitados en una cámara de vacío conectada a una bomba de vacío. La proporción de la suspensión de Col1 respecto a la suspensión de Col2 (Col1:Col2) puede
60 variar de 0:1 a 1:0.

65 Antes de la adición de la capa de cartílago, el andamiaje de 2 capas se rehidrató en ácido acético como se describe previamente. Se pipeteó la suspensión de la capa de cartílago sobre el andamiaje de 2 capas rehidratado, la cantidad usada variando de 3 ml a 60 ml, para obtener un andamiaje que varía de 1 mm a 15 mm, dependiendo del espesor requerido. Toda la estructura se criodesecó de nuevo para producir un andamiaje de 3 capas.

Después de la criodesecación, la estructura porosa de 3 capas se reticuló usando un procedimiento de reticulación

deshidrotérmica (DHT). Esto implicó colocar la estructura en un horno de vacío (Fisher IsoTemp 201, Fisher Scientific, Boston, MA) para reticular el colágeno y por tanto proporcionar un incremento en la resistencia mecánica de la estructura. La reticulación se puede llevar a cabo a una temperatura de desde 105 °C a 180 °C a vacío de 50 mTorr durante 24 horas.

5

EJEMPLO 3

En otro ejemplo se produce un andamiaje de 3 capas donde la capa de base se reticula mediante un procedimiento de reticulación química descrito anteriormente (EDAC) antes de la adición de la 2ª capa para mejorar la rigidez mecánica del andamiaje y mantener una estructura de poro equiaxial cuando se añaden capas adicionales al andamiaje. El grado de reticulación usado se puede controlar basado en los requisitos estructurales.

10

EJEMPLO 4

El modo de realización 4 se refiere a un procedimiento alternativo para la producción de andamiajes estratificados de ingeniería de tejidos. El procedimiento implica producir una suspensión a base de colágeno como se indica anteriormente, y pipetear los 67,5 ml de la suspensión en una bandeja de acero inoxidable de grado 304 cuadrada de 127 mm x 127 mm. Esta bandeja se coloca a continuación en el criodesecador y la suspensión se congela a una temperatura de entre -10 °C y -70 °C a una velocidad constante preferente de 0,9 °C/min. Esta velocidad de congelación se puede variar entre 0,1 °C/min y 10 °C/min. La temperatura del estante se mantuvo después constante durante 60 minutos para completar el procedimiento de congelación. A continuación se retiró el andamiaje congelado del criodesecador y se aplicaron 67,5 ml de una segunda capa de suspensión en la parte superior. A continuación, la estructura de 2 capas se criodesecó. El ciclo implica enfriar el estante a una temperatura de entre -10 °C y -70 °C a una velocidad constante de 0,9 °C/min. La temperatura del estante se mantuvo después constante durante 60 minutos para completar el procedimiento de congelación. A continuación, la temperatura del estante se elevó a 0 °C durante 160 minutos. A continuación, la fase de hielo se sublimó a vacío de 200 mTorr a 0 °C durante al menos 17 horas para producir el andamiaje poroso de 2 capas.

15

20

25

EJEMPLO 5

El modo de realización 5 se refiere a un andamiaje de 3 capas y al procedimiento de fabricación. El procedimiento implica la producción de una suspensión a base de colágeno como anteriormente, y pipetear 67,5 ml de la suspensión en una bandeja de acero inoxidable como se describe anteriormente. La bandeja se coloca en el criodesecador y la suspensión se congela a una temperatura de entre -10 °C y -70 °C a una velocidad de congelación constante adecuada, preferentemente 0,9 °C/min. La temperatura del estante se mantuvo constante durante al menos 60 minutos para completar el procedimiento de congelación. Se aplicó una segunda capa de suspensión a esta suspensión congelada y se repitió la etapa de congelación de >60 minutos. El material de 2 capas congelado se retiró después del criodesecador y se pipeteó de nuevo una 3ª suspensión a base de colágeno en la parte superior. Esto se devolvió a continuación al criodesecador y se criodesecó usando un ciclo de criodesecación donde el estante se enfrió a una temperatura de entre -10 °C y -70 °C a una velocidad constante de 0,9 °C/min. La temperatura del estante se mantuvo después constante durante 60 minutos para completar el procedimiento de congelación. A continuación, la temperatura del estante se elevó a 0 °C durante 160 minutos. A continuación, la fase de hielo se sublimó a vacío de 200 mTorr a 0 °C durante al menos 17 horas para producir el andamiaje de 3 capas.

30

35

40

45

EJEMPLO 6

Otro modo de realización que se refiere al andamiaje divulgado en el presente documento se refiere al uso del andamiaje como un sistema portador para administración de factores de crecimiento. Los factores de crecimiento que se podrían incorporar al andamiaje incluyen la superfamilia de TGF-β, IFG, FGF, BMP, PDGF, EGF y cannabinoides. Estos factores de crecimiento se podrían incluir en el andamiaje de varias maneras, que incluyen empapar el andamiaje preparada en una solución que contenga el factor de crecimiento de interés, a través de reticulación, usando la transcripción o a través de otros procedimientos.

50

Caracterización de los andamiajes

Las propiedades de las capas individuales de andamiaje y los andamiajes estratificados producidos en este estudio se compararon con un andamiaje de control hecho de colágeno de tipo I, fabricado usando el protocolo estándar como se detalla anteriormente. En resumen, se produjo una suspensión usando 5 g/l de colágeno de tipo I en una solución de ácido acético 0,05 M y se liofilizó a una velocidad de enfriamiento constante hasta una temperatura de congelación final de -40 °C.

55

60

Rigidez mecánica

Para garantizar la supervivencia después de la implantación, las propiedades mecánicas del implante deben ser suficientes para resistir las fuerzas experimentadas durante la carga. También se ha demostrado que las propiedades mecánicas del andamiaje afectan la respuesta celular (Engler *et al.*; 2006). Engler *et al.* encontraron

65

que el linaje de diferenciación para MSC variaba dependiendo de la elasticidad del sustrato, resultando un fenotipo neuronal en sustratos blandos y resultando osteoblastos en sustratos de alta rigidez. Las propiedades mecánicas tendrían, por tanto, una importancia particular en las aplicaciones donde se produce la cicatrización de defectos debido a la infiltración de MSC, por ejemplo, si el andamiaje se fuera a usar en combinación con la técnica de microfracturas. Las pruebas mecánicas se llevaron a cabo en muestras de 9,7 mm de diámetro usando la máquina de pruebas mecánicas Zwick Z050 (Zwick/Roell, Alemania). Antes de la prueba, las muestras se prehidrataron con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los andamiajes se cargaron a una tasa de deformación del 10 % por minuto y el módulo se definió como la pendiente de un ajuste lineal a la curva de tensión-deformación en el intervalo de deformación del 2-5 %.

Se determinaron las propiedades mecánicas de cada capa individual del andamiaje de 3 capas producidas de forma aislada y del andamiaje de 3 capas y se compararon con un andamiaje de colágeno estándar. Los resultados se muestran en la figura 4. Se encontró que la capa inferior tenía el módulo de compresión más alto de aproximadamente 0,95 kPa, significativamente más alto que los otros dos grupos ($p < 0,05$). Esto se debe a la presencia de la fase mineral de HA. Se encontró que los módulos de compresión de la capa intermedia y la capa superior eran entre aproximadamente 0,3 kPa y 0,4 kPa, sin que se encontrara una diferencia significativa entre los dos grupos. Se encontró que el módulo de compresión del andamiaje de 3 capas era similar al del andamiaje de colágeno, sin que se encontrara una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre los dos grupos.

Distribución de la hidroxiapatita (HA)

La distribución de la hidroxiapatita (HA) dentro de un andamiaje de 2 capas se investigó incrustando el andamiaje en un polímero, llevando a cabo la preparación histológica y a continuación tiñendo con tinte de azul de toluidina. El análisis microscópico permitió examinar la distribución de HA. La presencia de partículas de HA dentro de los puntales de colágeno es evidente, como se muestra en la figura 1. La difracción de rayos X (XRD) se usó para analizar el efecto del procedimiento de fabricación en la composición química del andamiaje de CHA de la capa inferior. El patrón de XRD para el andamiaje de la capa inferior se comparó con el del polvo de HA puro y con el patrón de XRD estándar para HA (JCPDS 72-1243). Los resultados, que se muestran en la figura 3, confirman la presencia de HA en el andamiaje de CHA de la capa inferior. No se identificaron otras fases de fosfato de calcio, confirmando por tanto que no se ha producido la degradación del componente de HA.

Permeabilidad del andamiaje

La permeabilidad de un material poroso es la facilidad con la que un fluido puede fluir a través de él. La alta permeabilidad es esencial para los materiales de andamiajes de ingeniería de tejidos para permitir la migración celular a su centro. La permeabilidad de las capas individuales del andamiaje de 3 capas se compara en la figura 5. Se puede ver que la permeabilidad del andamiaje se relaciona con la rigidez del sustrato, con los andamiajes que se encontró que tenían un módulo de compresión más alto mostrando la mayor permeabilidad. La permeabilidad de nuestro andamiaje de 3 capas se puede controlar alterando las propiedades mecánicas de las capas individuales del andamiaje, para producir un andamiaje óptimo.

Porosidad y estructura de los poros

Un alto nivel de porosidad es un requisito vital para los andamiajes usados para la regeneración de tejidos a fin de permitir la infiltración de células, la difusión de nutrientes y la eliminación de desechos. Si la porosidad es insuficiente, se producirá una necrosis avascular en el centro del material implantado, dando lugar al fracaso de la construcción. Una de las principales ventajas de la presente invención es el alto grado de porosidad dentro de todas las regiones del andamiaje. La porosidad de cada una de las capas componentes del andamiaje de 3 capas se determinó usando el procedimiento de densidad según el estándar F2450-04: *Standard Guide for Assessing Microstructure of Polymeric Scaffolds for Use in Tissue Engineered Medical Products* (Guía estándar para evaluar la microestructura de andamiajes poliméricos para su uso en productos médicos de ingeniería de tejidos, usando las siguientes fórmulas

$$V_p = V_T - \frac{m_s}{\rho_s}$$

$$\% \text{ de porosidad} = V_p / V_T \times 100$$

Donde V_p es el volumen de los poros en el andamiaje, V_T es el volumen total del andamiaje, determinado midiendo las dimensiones de la muestra, m_s es la masa del andamiaje y ρ_s es la densidad del material.

La porosidad promedio de cada capa se muestra en la figura 7. Se encontró que la capa superior tenía la porosidad más alta y la capa inferior la más baja. Se encontró que la diferencia entre los grupos era estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Se observó una reducción en la porosidad debida a la adición de partículas de HA, pero esto es insignificante en términos reales (99,5 - 98,8 %). Es necesario un alto nivel de porosidad para garantizar la

infiltración de las células en el centro del andamiaje y también el suministro de nutrientes y la eliminación de desechos de estas células. Si la porosidad es insuficiente, se producirán áreas de necrosis dentro del andamiaje.

5 El tamaño de poro y la estructura de los poros de los materiales del andamiaje también son importantes. Una estructura de poros de interconexión homogénea con un tamaño de poro óptimo es necesaria para generar con éxito tejido de reparación. Si los poros son demasiado pequeños, la migración celular es limitada, mientras que si los poros son demasiado grandes, existe una disminución en el área de la superficie, que limita la adhesión celular (O'Brien FJ, 2005; Murphy CM, 2009). Una de las ventajas del procedimiento de criodesecación usado para producir los andamiajes detallados en la presente invención es la capacidad de controlar con precisión el tamaño de poro y la
10 homogeneidad de los poros. La estructura de los poros de las capas individuales del andamiaje y de los andamiaje de 2 capas se analizó incrustando el andamiaje en glixetacrilato JB4 (Polysciences, Alemania), tanto en el plano longitudinal como en el plano transversal, preparando histológicamente los andamiaje y tiñéndolos con azul de toluidina antes de realizar un análisis microscópico. En la figura 6 se muestran micrografías representativas que demuestran la homogeneidad de los poros de las capas individuales del andamiaje. Estas micrografías demuestran
15 que la adición de colágeno de tipo II e hidroxipatita a las diversas capas no afecta a la homogeneidad de los poros.

El tamaño de poro se determinó usando un procedimiento de intercepción lineal. En la figura 8 se muestran los tamaños de poro promedio de las capas individuales del andamiaje producidas de forma aislada usando un ciclo de criodesecación a -40 °C. Se encontró que los diámetros de poro promedio varían de 112 µm para el andamiaje intermedio a 136 µm para el andamiaje inferior. El tamaño de poro de cada capa individual se puede controlar alterando la temperatura de congelación usada durante el procedimiento de criodesecación.

También se obtiene una estructura de poros homogénea cuando se producen andamiajes estratificadas. Las imágenes de microscopio de secciones tanto de la capa superior como inferior de un andamiaje de 2 capas que se muestra en la figura 2 demuestran la capacidad del procedimiento de "estratificación iterativa" para producir una construcción estratificada con una estructura altamente porosa y una distribución del tamaño de poro homogénea en toda ella.

El análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) del andamiaje de 3 capas (figura 9) demuestra el alto grado de interconexión de los poros a lo largo de la construcción. La continuidad estructural en las interfases es evidente, ya que las capas individuales se integran a la perfección. Esta perfecta integración de las capas del andamiaje es vital para promover la regeneración del tejido de reparación anatómica. Este tipo de estructura continua no se puede lograr usando otros procedimientos de producción de andamiajes estratificados que impliquen, por ejemplo, la sutura o el pegado entre sí de las capas del andamiaje.

35 *Bioactividad in vitro*

La capacidad de las células para unirse, infiltrarse y proliferar dentro del andamiaje de 3 capas descrito en la presente invención se investigó a través del cultivo *in vitro*. Discos de andamiaje, de 12,7 mm (1/2") de diámetro y 4 mm de altura, se cortaron de láminas de andamiaje prefabricadas del material de andamiaje de 3 capas. Los andamiaje se sembraron con células preosteoblastos de ratón MC3T3-E1 a una densidad de 2×10^6 células por andamiaje. Los andamiajes se evaluaron 7 y 14 días después de la siembra. La figura 12 muestra secciones transversales de un andamiaje de 3 capas, después de 14 días de cultivo, preparadas histológicamente y teñidas usando tinción con hematoxilina y eosina (H&E). Se observó que las células se infiltraron en el andamiaje y se
45 adhirieron a los puntales de colágeno.

El número de células se determinó por cuantificación de ADN usando el ensayo de ADN de Hoechst. Se usó reactivo de lisis Qiazol para permitir la disociación de complejos de nucleoproteínas. El tinte Hoechst 33258 se añadió después para marcar el ADN de forma fluorescente y se leyó la emisión fluorescente usando un espectrofotómetro de fluorescencia. Las lecturas se convirtieron en número de células usando una curva estándar. Los números de células para los andamiajes de colágeno y de 3 capas a los 7 y 14 días se muestran en la figura 10. Existió un incremento en el número de células de aproximadamente el 50 % desde el día 7 hasta el día 14 tanto para el andamiaje de colágeno como para los andamiajes de 3 capas, que indica que las células proliferan fácilmente dentro de ambos tipos de andamiajes. Esto demuestra que los andamiajes son altamente biocompatibles, proporcionando un excelente entorno para el crecimiento y la diferenciación de las células MC3T3.

55 *Resistencia de adhesión interfacial*

La resistencia de adhesión interfacial entre las capas de la construcción multicapa descrita en el presente documento es una propiedad importante. Si la resistencia de la adhesión es insuficiente, se producirá una deslaminación en las interfases de las capas. La resistencia de adhesión interfacial tanto de las construcciones de 2 capas como de 3 capas se determinó usando un equipo diseñado a medida y ajustado a la máquina de pruebas mecánicas Zwick Z050 (Zwick/Roell, Alemania). Las pruebas implicaron adherir la estructura a stubs de prueba usando un adhesivo de alta viscosidad. Se aplicó una carga de tracción a las muestras a una tasa de deformación del 10 % por minuto. Las muestras fueron sometieron a prueba hasta el fracaso. La prehidratación de las muestras en PBS se llevó a cabo antes de la prueba y la prueba se llevó a cabo en un baño de PBS para mantener la
65

hidratación durante el período de prueba. La extracción de las fibras se observó en la superficie de fractura después de las pruebas, indicando una verdadera integración de las capas del andamiaje.

Referencias

- 5 Aigner T, Stove, 2003 - Collagens - major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair, *Advanced Drug delivery Reviews* 55 (2003) 1569 - 1593
- 10 Newman AP, 1998 - Newman A. P., (1998), *Current Concepts, Articular Cartilage Repair*, *The American Journal of Sports Medicine*, Vol. 26., N.º 2
- Beris AE 2005 - Beris A. E., et al. (2005), *Advances in articular cartilage repair*, *Injury, The International Journal of the Care of the Injured*, 36S, S14-S23
- 15 Hunziker EB, 2001 - Hunziker EB (2001) *Growth-factor-induced healing of partial-thickness defects in adult articular cartilage*, *Osteoarthritis Cartilage* 9: 22-32
- Sherwood JK et al, 2002 - Sherwood, J. K., (2002), *A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair*, *Biomaterials* 23, 4739-4751
- 20 Engler 2006 - Engler A.J., Sen S., Sweeney H.L., Discher D.E. *Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification*. *Cell*, Volumen 126, Edición 4, Páginas 677-689, 2006
- 25 Lee SH, Shin H 2007 - Lee, S. H., Shin, H., (2007), *Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering*, *Advanced drug delivery reviews*, 59:339-359
- Miljkovic et al. 2008- Miljkovic N. et al. (2008) *Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells*, *Osteoarthritis and Cartilage*, Volumen 16, Edición 10, Páginas 1121-1130
- 30 O'Brien FJ, 2005 - O'Brien F.J., Harley B.A., Yannas I.V. y Gibson L.J. *The effect of pore size on cell adhesion in collagen-gag scaffolds*. *Biomaterials*, 26:433-441, 2005
- 35 Murphy CM, 2009 - Murphy C. M., (2010) *The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering*, *Biomaterials*, Volumen 31, Edición 3, Enero 2010, Páginas 461-466

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un procedimiento para producir un andamiaje de colágeno multicapa en el que cada capa tiene una estructura porosa, comprendiendo el procedimiento una técnica de estratificación iterativa en la que cada capa se forma independientemente por congelación o liofilización seguida de rehidratación, antes de la adición de una capa siguiente, en el que la capa final se forma por liofilización de la estructura multicapa.
- 10 **2.** Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 1, en el que todas las capas del andamiaje se forman por liofilización.
- 15 **3.** Un procedimiento de producción de un andamiaje de colágeno de tres capas de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- preparar una primera suspensión homogénea de colágeno y liofilizar la suspensión para proporcionar una primera capa;
 - rehidratar la primera capa formada;
 - preparar una segunda suspensión homogénea de colágeno y verter la segunda suspensión homogénea sobre la primera capa rehidratada para formar un material compuesto de dos capas, y liofilizar el material compuesto de dos capas;
 - rehidratar el material compuesto de dos capas; y
 - preparar una tercera suspensión homogénea de colágeno y verter la tercera suspensión homogénea sobre el material compuesto de dos capas para formar un material compuesto de tres capas, y liofilizar el material compuesto de tres capas para formar el andamiaje de colágeno de tres capas.
- 25 **4.** Un procedimiento como se reivindica en cualquier reivindicación precedente en el que el andamiaje comprende tres capas, una primera capa que comprende colágeno de tipo I e hidroxiapatita (HA), una segunda capa que comprende colágeno de tipos I y II e hidroxiapatita, y una tercera capa que comprende colágeno de tipos I y II y poca o ninguna hidroxiapatita, en el que la proporción del colágeno de tipo I respecto al colágeno de tipo II en la segunda capa es de 1:4 a 4:1 (p/p).
- 30 **5.** Un procedimiento como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, en el que la tercera capa comprende un polímero, en el que el polímero es opcionalmente un glicosaminoglicano (GAG).
- 35 **6.** Un procedimiento para preparar un andamiaje de colágeno de tres capas de acuerdo con la reivindicación 1, adecuado para su uso como un andamiaje de reparación osteocondral, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- preparar una primera suspensión de colágeno de tipo I e hidroxiapatita (HA) en forma de suspensión y congelar o liofilizar la suspensión para proporcionar una primera capa;
 - cuando la primera capa se forma por criodesecación, rehidratar la primera capa formada;
 - preparar una segunda suspensión de colágeno de tipo I, colágeno de tipo II y HA en forma de suspensión y añadir la suspensión sobre la primera capa para formar un material compuesto de dos capas, y congelar o liofilizar el material compuesto de dos capas;
 - cuando la segunda capa se forma por criodesecación, rehidratar la segunda capa;
 - preparar una tercera suspensión de colágeno de tipo I y de tipo II y opcionalmente un polímero y/o una molécula biológicamente activa, y añadir la tercera suspensión sobre el material compuesto de dos capas para formar un material compuesto de tres capas, y liofilizar el material compuesto de tres capas para formar el andamiaje de colágeno de tres capas; y
 - opcionalmente, reticular una o más de las capas del andamiaje.
- 45 **7.** Un el andamiaje de colágeno multicapa que comprende tres capas criodesecadas en el que una primera capa comprende colágeno de tipo I e hidroxiapatita (HA), una segunda capa comprende colágeno de tipo I y un colágeno de tipo II y HA, y una tercera capa comprende colágeno de tipo I y de tipo II y un polímero y/o una molécula biológicamente activa, y en el que el andamiaje se prepara mediante un procedimiento de la reivindicación 1.
- 50 **8.** Un andamiaje de colágeno multicapa como se reivindica en la reivindicación 7, en el que el polímero de la tercera capa comprende un GAG.
- 55
- 60
- 65

- 5 **9.** Un andamiaje de colágeno multicapa como se reivindica en la reivindicación 7 u 8, adecuado para su uso en aplicaciones de reparación de tejidos y huesos o aplicaciones de ingeniería de tejidos, especialmente la reparación de defectos osteocondrales, en el que el andamiaje tiene una arquitectura de poros continuos que se extiende a lo largo de las capas.
- 10.** Un andamiaje de colágeno multicapa como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que las capas del andamiaje se integran perfectamente.
- 10 **11.** Un andamiaje de colágeno multicapa como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que el andamiaje tiene una porosidad de al menos el 95 %.
- 12.** Un andamiaje de colágeno multicapa como se reivindica en la reivindicación 11, en el que el andamiaje tiene una porosidad de al menos el 98 %.
- 15 **13.** Una construcción de ingeniería de tejidos con sembrado celular que comprende un andamiaje de colágeno multicapa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en el que las células se disponen dentro de los poros del andamiaje.
- 20 **14.** Un andamiaje de colágeno multicapa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 o una construcción de ingeniería de tejidos con sembrado celular de acuerdo con la reivindicación 13, para su uso en un procedimiento para reparar un defecto de tejido en un mamífero, en el que el procedimiento comprende conformar el andamiaje para que se ajuste al defecto, incorporar opcionalmente en el andamiaje una molécula biológicamente activa, bien antes o después de la conformación, e insertar el andamiaje en el defecto.

Figura 1

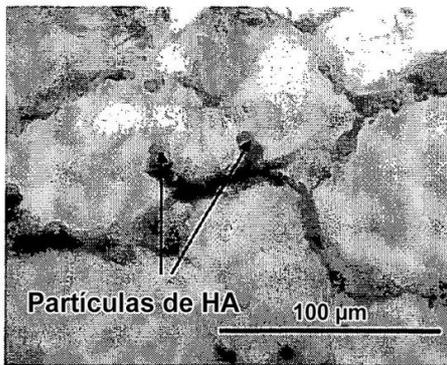


Figura 2

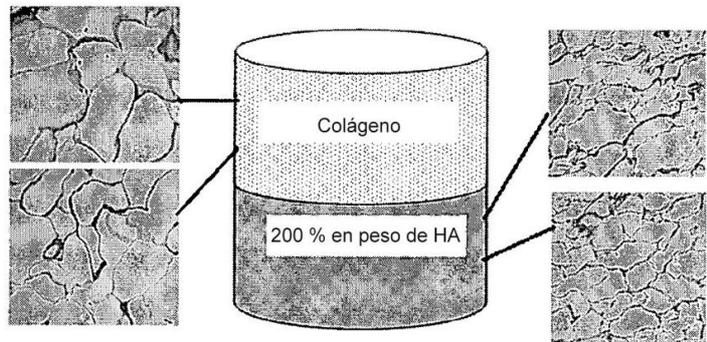


Figura 3

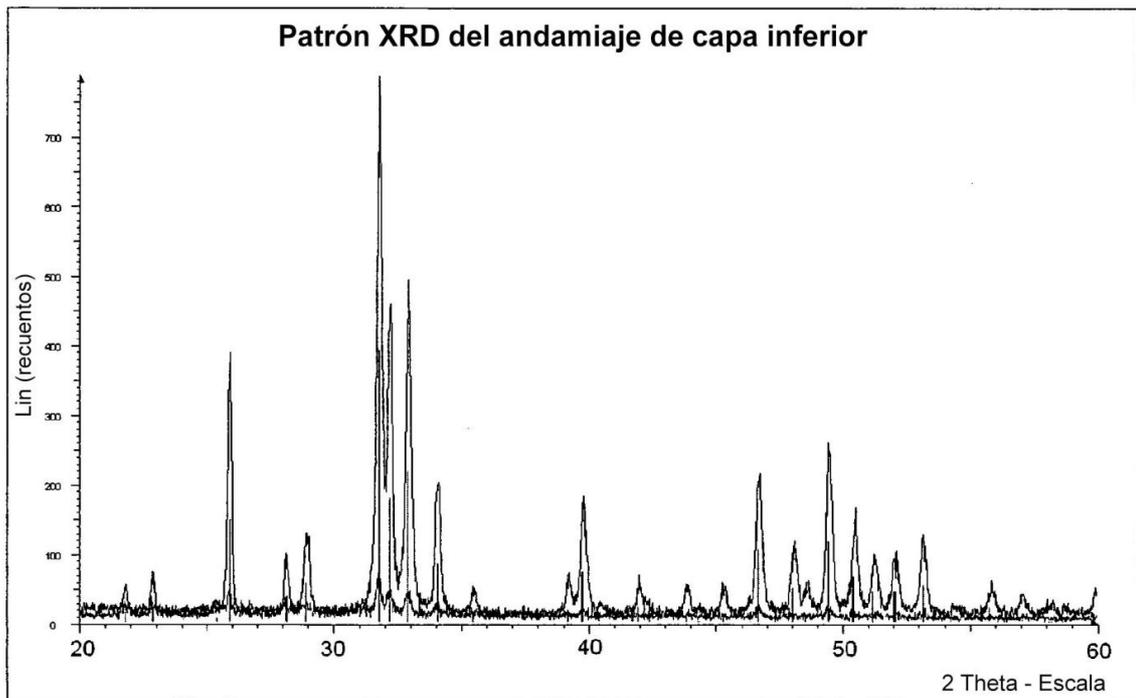


Figura 4

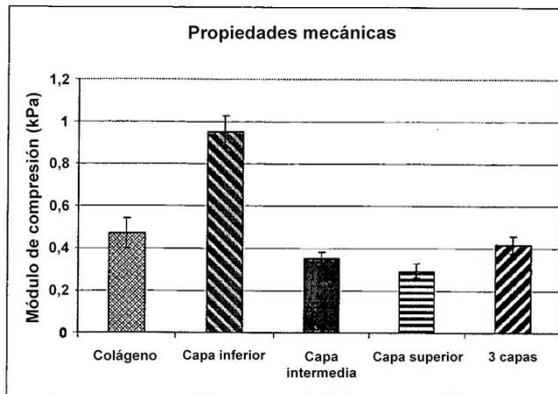


Figura 5

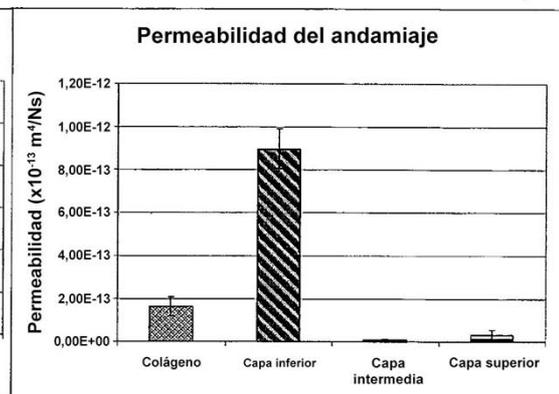


Figura 6

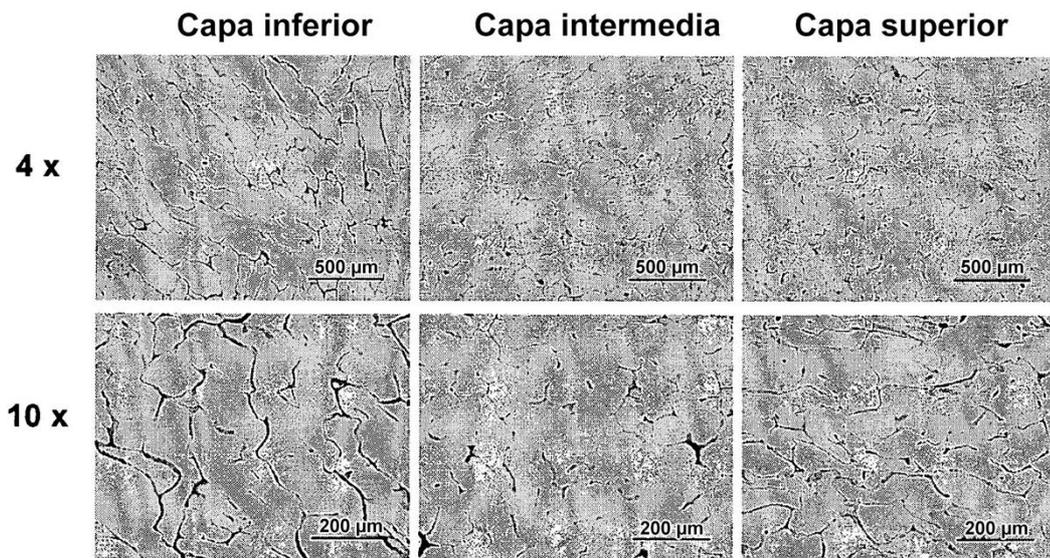


Figura 7

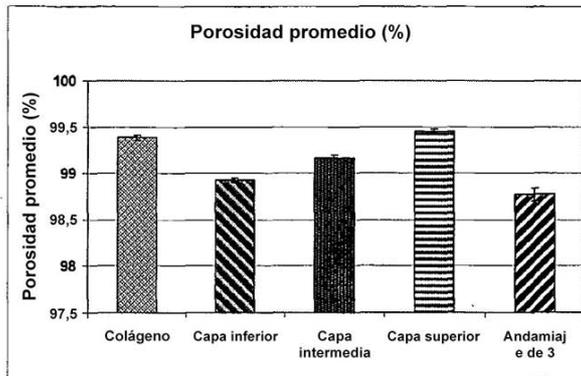


Figura 8

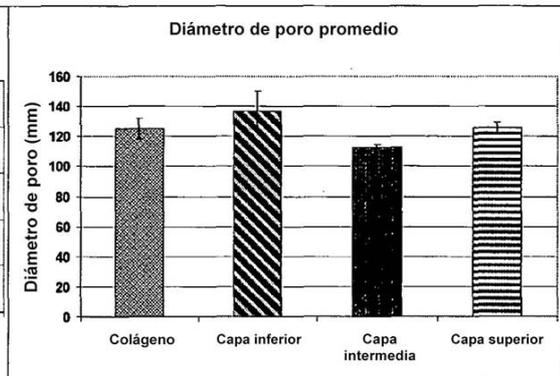


Figura 9

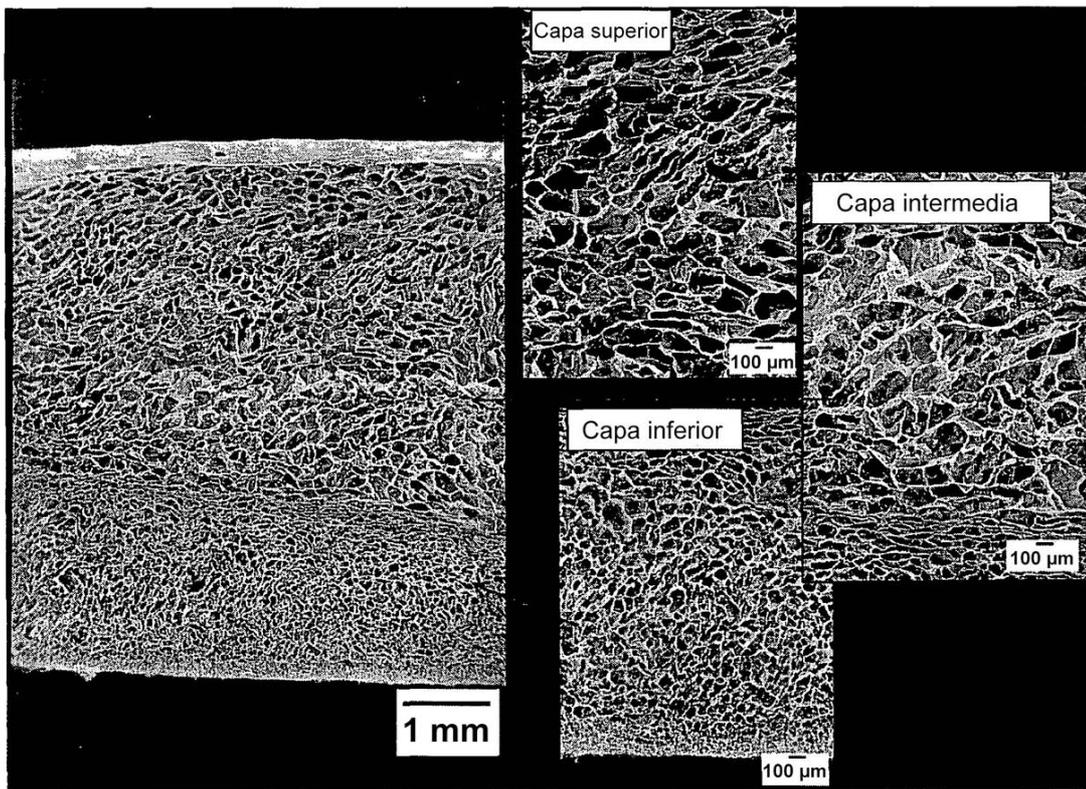


Figura 10

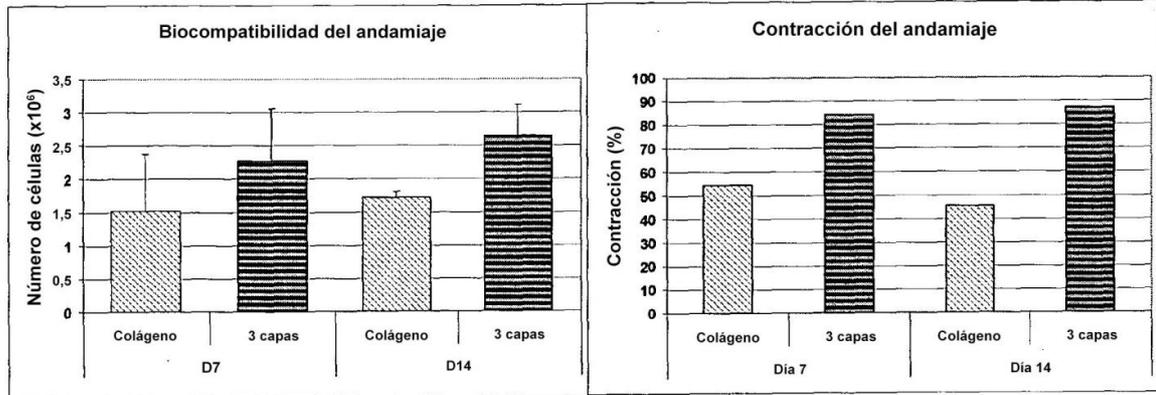


Figura 11

Figura 12

Día 14 - 20x

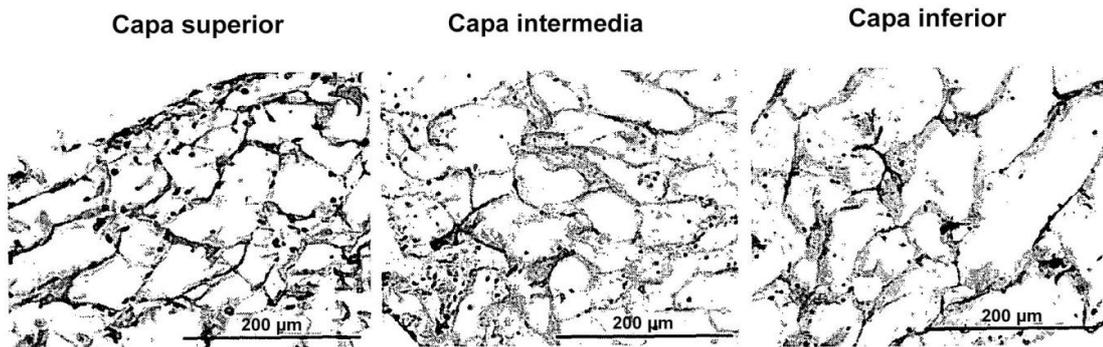


Figura 13

Día 21 - 20x

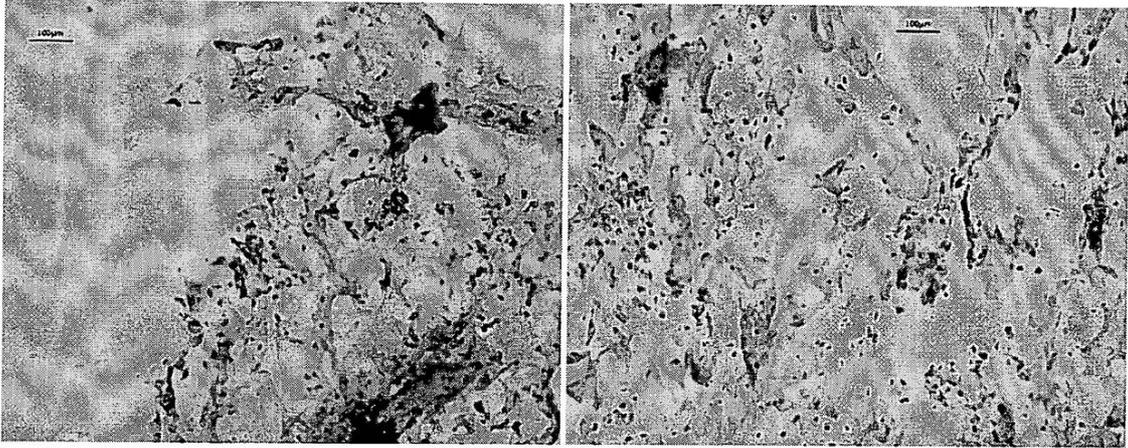


Figura 14

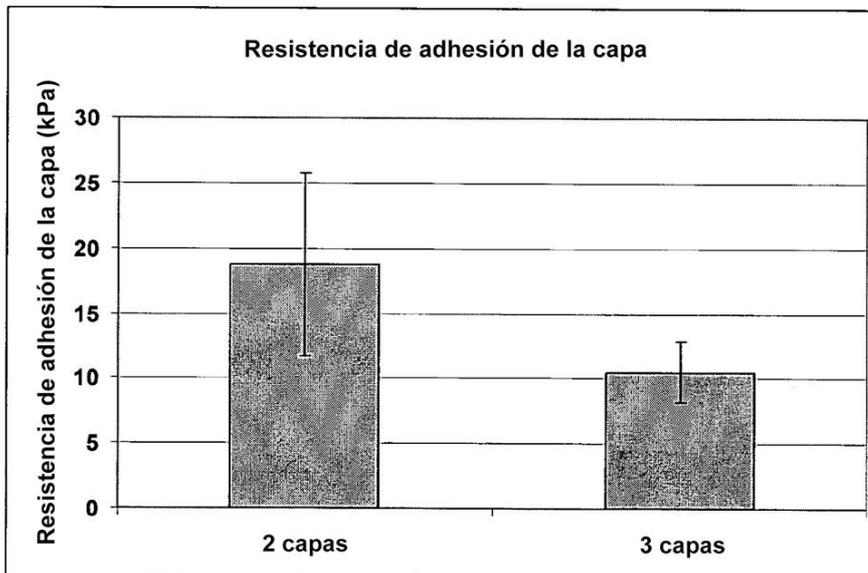


Figura 15

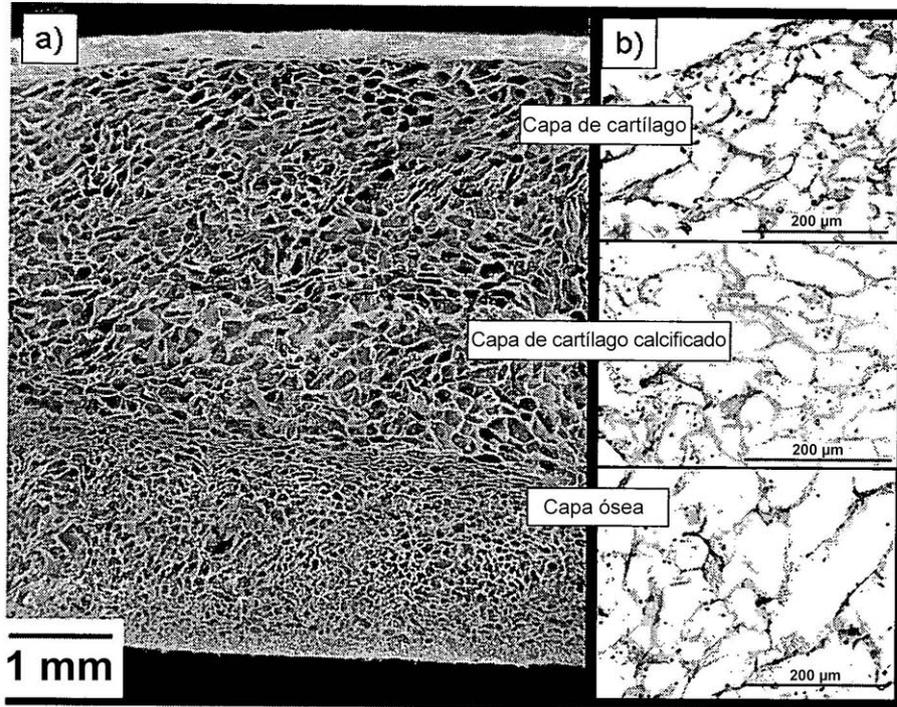


Figura 16

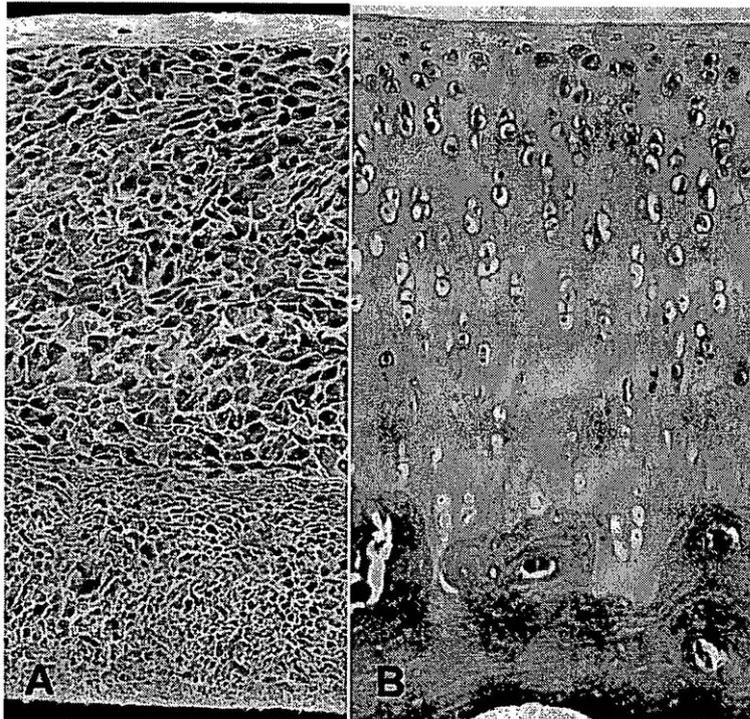


Figura 17

