

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 891 828**

(51) Int. Cl.:

**A61L 27/38** (2006.01)

**A61L 27/24** (2006.01)

**A61L 27/36** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2016 PCT/CN2016/094633**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2017 WO17025053**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2016 E 16834677 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.07.2021 EP 3328455**

---

(54) Título: **Preparación de un injerto de cartílago acelular y sus usos**

(30) Prioridad:

**11.08.2015 US 201562203904 P**

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

**31.01.2022**

(73) Titular/es:

**ACRO BIOMEDICAL COMPANY, LTD. (100.0%)  
3rd FL., No.57, Luke 2nd Road, Lujhu District  
Kaohsiung City 82151, TW**

(72) Inventor/es:

**HSIEH, DAR-JEN y  
CHANG, MING-YAO**

(74) Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo**

ES 2 891 828 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

Preparación de un injerto de cartílago acelular y sus usos

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

#### **1. CAMPO DE LA INVENCIÓN**

5 La presente divulgación se refiere en general al campo de la producción de injertos de cartílago acelular, en particular, a procedimientos mejorados para producir injertos de cartílago acelular adecuados para uso como andamio biológico para que las células crezcan en ellos, por lo que los injertos de cartílago acelular son útiles como xenoinjertos para el tratamiento de enfermedades osteocondrales.

#### **2. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA**

10 El daño del tejido cartilaginoso es bastante común en individuos activos y en la población de edad avanzada como resultado de una lesión aguda o repetitiva o del envejecimiento. Las opciones de tratamiento incluyen el reposo, la cirugía artroscópica menor para limpiar la zona dañada del cartílago y otros procedimientos quirúrgicos como la microfractura, la perforación y la abrasión. Todos estos proporcionan sólo un alivio sintomático, con un beneficio temporal, especialmente si la persona mantuvo el mismo nivel de actividades antes de la lesión. Por ejemplo, el daño  
15 crónico del cartílago de la articulación de la rodilla puede conducir a un mayor deterioro del cartílago de la articulación y, eventualmente, puede conducir a un reemplazo total de la articulación de la rodilla. Las enfermedades o lesiones osteocondrales suponen otro desafío, cuyas necesidades de tratamiento no han sido plenamente satisfechas por los procedimientos y procesos médicos actuales. Además de los daños en el cartílago provocados por el envejecimiento,  
20 las lesiones y/o los trastornos descritos anteriormente, también existe una necesidad creciente de injertos de cartílago en la cirugía plástica o cosmética que requiere la reparación o el aumento del tejido cartilaginoso, como el aumento nasal, la cirugía correctiva de la asimetría facial izquierda-derecha, la cirugía correctiva alrededor de los párpados, la cirugía cosmética de la cara, y similares.

El cartílago fabricado por bioingeniería existente generado mediante la siembra de un hidrogel o un andamio polimérico natural o sintético no posee las mismas propiedades mecánicas de un cartílago natural, en el que el colágeno es el componente principal. Para superar este inconveniente, se han utilizado reticuladores, como el glutaraldehído, para mejorar la resistencia mecánica del hidrogel o del andamio polimérico. Sin embargo, los reticuladores son en su mayoría tóxicos para el ser humano, por lo que sus usos son limitados.  
25

Por referencia, por ejemplo, al documento estadounidense US 2008/077251 A se conoce un procedimiento convencional de descelularización de preparación de cartílagos acelulares, en el que las escamas de cartílago se someten a una solución alcalina, un tratamiento enzimático y un tratamiento con fluido supercrítico.  
30

El Documento EP 0 748 632 A1 enseña un procedimiento para descontaminar profilácticamente un tejido colágeno sometiendo el tejido a una serie de tratamientos antivirales, que incluyen el tratamiento con dióxido de carbono en fase supercrítica, el tratamiento con peróxido de hidrógeno, el tratamiento con hidróxido de sodio y el tratamiento con etanol. Cada uno de estos tratamientos sirve, respectivamente, para eliminar los contaminantes víricos del tejido, y la secuencia de tratamientos está diseñada para garantizar la eliminación de todos los contaminantes víricos del tejido tratado.  
35

Además, el artículo de revisión "An overview of tissue and whole organ decellularization processes" escrito por Crapo. *et al.* (Biomaterials, vol. 32, no. 12 (2011), pages 3233-3243) ofrece una descripción general de los procesos comunes de descelularización, de los agentes de descelularización más utilizados (por ejemplo, químicos, enzimáticos y físicos)  
40 y de sus efectos sobre los componentes celulares y extracelulares del tejido. Este desvela una lista de agentes químicos de descelularización adecuados para descelularizar tejidos y órganos, como ácidos y bases, soluciones hipotónicas e hipertónicas, detergentes, alcoholos y otros disolventes.

En resumen, sería ventajoso proporcionar un injerto de cartílago mejorado para el tratamiento de cualquier lesión o cirugía correctiva descrita anteriormente. El injerto de cartílago mejorado no sólo poseería la resistencia mecánica y la conformación de un cartílago natural, por lo que podría restaurar eficazmente el cartílago a su estado anterior a la lesión sin causar más complicaciones (por ejemplo, el problema de la inmunogenicidad), sino que también es fácil de preparar a un costo relativamente bajo.  
45

### **SUMARIO**

El procedimiento de preparación de injertos de cartílago acelular de acuerdo con la presente invención se creó para superar los problemas mencionados anteriormente en la producción de un injerto de cartílago mejorado, especialmente en la producción del injerto de cartílago caracterizado por tener una resistencia mecánica mejorada, y una conformación nativa de un cartílago natural.  
50

Por consiguiente, el primer aspecto de esta divulgación es proporcionar un procedimiento de preparación de un injerto de cartílago acelular adecuado para su uso en cirugía estética (por ejemplo, rinoplastia, cirugía correctiva de la cara, etc.) o para el tratamiento de enfermedades osteocondrales. El procedimiento incluye las etapas de,

(1) cortar en cubos un cartílago de un animal para producir una pluralidad de matrices de cartílago;

5 (2) someter las matrices de cartílago de la etapa (1) a un tratamiento con una solución de hidróxido de sodio a temperatura ambiente durante aproximadamente 3-24 horas;

(3) someter las matrices de cartílago tratadas con hidróxido de sodio de la etapa (2) a un tratamiento de desinfección; y

10 (4) someter las matrices de cartílago desinfectadas de la etapa (3) a un tratamiento de descelularización con fluido supercrítico (SCF) para producir los injertos de cartílago acelular, en el que el tratamiento SCF se lleva a cabo bajo una presión de aproximadamente 15-35 MPa (150-350 bar) a una temperatura de entre 30-50 °C durante aproximadamente 100 minutos, en los que los injertos de cartílago tratados con SCF están desprovistos de cualquier materia celular, de modo que se obtienen injertos de cartílago acelular y no se requiere ningún tratamiento adicional de digestión enzimática.

15 De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, en la etapa (1), el cartílago es un cartílago nasal, un cartílago de costilla, un cartílago de oreja o un cartílago de rodilla.

De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, en la etapa (3), las matrices de cartílago se someten a un tratamiento de un desinfectante, que puede seleccionarse del grupo que consiste en un alcohol, un agente oxidante, una radiación, un fenólico y un compuesto de amonio cuaternario.

20 En algunas realizaciones, en la etapa (3), las matrices de cartílago se tratan con alcohol, que puede ser etanol o isopropanol.

En otras realizaciones, en la etapa (3), las matrices de cartílago se tratan con un agente oxidante, que puede ser peróxido de hidrógeno.

25 En otras realizaciones, en la etapa (3), las matrices de cartílago se tratan con un compuesto fenólico, que puede ser parabeno, ácido benzoico o ácido salicílico.

En otras realizaciones, en la etapa (3), las matrices de cartílago se tratan con un compuesto de amonio cuaternario, que puede ser cloruro de benzalconio, cloruro de alquildimetilbencilamonio, cloruro de didecildimetilamonio o cloruro de amonio.

30 De acuerdo con realizaciones de la presente divulgación, en la etapa (4), el fluido supercrítico (SCF) puede ser cualquiera de un dióxido de carbono supercrítico ( $scCO_2$ ), un óxido nítrico supercrítico ( $scN_2O$ ), un agua supercrítica ( $scH_2O$ ), un alcano supercrítico, un alqueno supercrítico, un alcohol supercrítico o una acetona supercrítica. En un ejemplo, el SCF es  $scCO_2$ . En otro ejemplo, el SCF es  $scN_2O$ .

De acuerdo con una realización preferente, el tratamiento de descelularización se lleva a cabo en una condición, en la que la temperatura es de aproximadamente 37 °C, la presión es de aproximadamente 35 MPa (350 bar).

35 El injerto de cartílago así producido está constituido principalmente por colágenos, en los que se conservan sus estructuras y conformaciones nativas, de modo que pueden servir como un andamio biológico tridimensional que permite que las células crezcan en él después de ser aplicado a un individuo (por ejemplo, la implantación). Además, el injerto de cartílago así producido es acelular, lo que significa que está desprovisto de cualquier materia celular, por lo que es sustancialmente no inmunogénico y no inducirá ninguna respuesta inmunogénica a su huésped. Además, la propiedad mecánica del injerto de cartílago así producido es superior a la de un cartílago nativo, lo que lo convierte en un mejor xenoinjerto sobre el cartílago nativo y/o el cartílago de ingeniería existente.

Los detalles de una o más realizaciones de esta divulgación se exponen en la descripción adjunta a continuación. Otras características y ventajas de la invención se desprenden de las descripciones detalladas y de las reivindicaciones.

45 Debe comprenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son por ejemplos y están destinadas a proporcionar una explicación adicional de la invención tal como se reivindica.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los dibujos adjuntos, que se incorporan a la especificación y forman parte de la misma, ilustran varios ejemplos de sistemas y procedimientos de la presente divulgación. La presente descripción se comprenderá mejor a partir de la siguiente descripción detallada leída a la luz de los dibujos adjuntos, en los que,

La **FIG. 1** son fotografías del injerto de cartílago de la presente mediante tinción H&E (A) antes, y después del tratamiento con SCF a (B) 15 MPa (150 bar), (C) 20 MPa (200 bar), y (D) 35 MPa (350 bar) tomadas con un aumento de 20.000x de acuerdo con una realización de la presente divulgación;

5 La **FIG. 2** son fotografías de la tinción con H&E y DPAI del injerto de cartílago de la presente (A) antes, y (B) después del tratamiento con SCF de acuerdo con una realización de la presente divulgación;

La **FIG. 3** son fotografías de la tinción con azul alcián del injerto de cartílago de la presente (A) antes, y (B) después del tratamiento con SCF de acuerdo con una realización de la presente divulgación;

10 La **FIG. 4** son fotografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) del injerto de cartílago de la presente tratado con SCF tomadas a un aumento de (A) 500k, (B) 1000k y (C) 2.000k de acuerdo con una realización de la presente divulgación; y

La **FIG. 5** es un gráfico de barras que representa las resistencias a la compresión del injerto de cartílago de la presente tratado con SCF del ejemplo 1.1 y del cartílago nativo, respectivamente, presentadas en (A) carga de tensión, y (B) módulo de Young de acuerdo con una realización de la presente divulgación.

## 15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERENTES

La descripción detallada proporcionada a continuación en relación con los dibujos adjuntos pretende ser una descripción de la presente divulgación y no pretende representar las únicas formas en las que la presente divulgación puede ser construida o utilizada.

20 Las formas singulares "un/a" y "el/la" se utilizan en la presente memoria para incluir referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

El término "acelular", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un implante que está libre de cualquier materia celular, como células biológicamente activas y/o sus restos. En consecuencia, el término "injerto de cartílago acelular" se refiere a un injerto de cartílago derivado de un cartílago de un animal (por ejemplo, un mamífero) que está sustancialmente libre de cualquier materia celular. En un ejemplo, el cartílago se toma del cartílago nasal de un cerdo.

25 En otro ejemplo, el cartílago se toma del cartílago de la rodilla de un cerdo. En otro ejemplo, el cartílago procede de un cartílago costal de un cerdo.

A pesar de que los intervalos numéricos y los parámetros desvelados en la presente memoria son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se informan con la mayor precisión posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene intrínsecamente ciertos errores que resultan necesariamente de la desviación estándar encontrada en las respectivas mediciones de las pruebas. Alternativamente, el término "aproximadamente" significa dentro de un error estándar aceptable de la media cuando es considerado por un experto en la técnica. Salvo en los ejemplos de funcionamiento/trabajo, o a menos que se especifique expresamente lo contrario, todos los intervalos numéricos, cantidades, valores y porcentajes, como los correspondientes a cantidades de materiales, duraciones de tiempo, temperaturas, condiciones de funcionamiento, proporciones de cantidades y similares, en la presente memoria expuestos deben comprenderse modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la presente divulgación y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar según se deseé. Como mínimo, cada parámetro numérico debe interpretarse a la luz del número de dígitos significativos declarados y aplicando las técnicas ordinarias de redondeo.

40 La presente divulgación, en su término más amplio, se refiere a la preparación de un injerto de cartílago acelular, que es adecuado para uso en una cirugía cosmética o plástica; o para el tratamiento de enfermedades osteocondrales, que incluyen la reparación o restauración de cartílago dañado, lesionado, traumatizado o envejecido y/o la reparación de defectos osteocondrales, mediante la implantación de un injerto de cartílago acelular producido por el procedimiento de la presente en la lesión del cartílago.

45 Por consiguiente, la presente divulgación se dirige a un procedimiento de producción de un injerto de cartílago acelular, en el que se conservan la resistencia mecánica y la estructura y conformación nativas del colágeno, por lo que puede proporcionar un microambiente óptimo para que las células del tejido huésped crezcan en él una vez que el injerto de cartílago de la presente acelular se implante en el huésped para la reconstrucción de tejidos o para el tratamiento de enfermedades osteocondrales. Además, el injerto de cartílago producido por el procedimiento de la presente invención 50 está desprovisto de cualquier materia celular, por lo que es sustancialmente no inmunogénico y no inducirá ninguna respuesta inmunogénica después de la implantación.

Por consiguiente, el procedimiento según la presente invención incluye al menos, las siguientes etapas,

(1) cortar en cubos un cartílago de un animal para producir una pluralidad de matrices de cartílago;

- (2) someter las matrices de cartílago de la etapa (1) a un tratamiento con una solución de hidróxido de sodio a temperatura ambiente durante aproximadamente 3-24 horas;
- (3) someter las matrices de cartílago tratadas con hidróxido de sodio de la etapa (2) a un tratamiento de desinfección; y
- 5 (4) someter las matrices de cartílago desinfectadas de la etapa (3) a un tratamiento de descelularización con fluido supercrítico (SCF) para producir los injertos de cartílago acelular, en el que el tratamiento SCF se lleva a cabo bajo una presión de aproximadamente 15-35 MPa (150-350 bar) a una temperatura de entre 30-50 °C durante aproximadamente 100 minutos, en los que los injertos de cartílago tratados con SCF están desprovistos de cualquier materia celular, de modo que se obtienen injertos de cartílago acelular y no se requiere ningún tratamiento adicional de digestión enzimática.

10 Para producir el injerto de cartílago acelular deseado, se extrae un cartílago intacto, como un cartílago nasal, un cartílago de costilla, un cartílago de oreja o un cartílago de rodilla, de un animal no humano, preferentemente de un animal de granja, y se utiliza como fuente de cartílago. Ejemplos de animales de granja adecuados que pueden actuar como fuente de cartílago incluyen, pero sin limitación, cerdos, vacas, toros, ovejas, cabras, burros, conejos, patos, gansos y aves de corral. El cartílago que sirve de fuente para el injerto de cartílago debe recogerse preferentemente de animales recién sacrificados y colocarse inmediatamente en solución isotónica estéril u otra solución conservante. A continuación, el cartílago cosechado se corta en tamaños y formas adecuados, produciendo así matrices de cartílago que tienen forma de discos, tiras, partículas y conos. En algunos ejemplos, cada una de las matrices de cartílago tiene la forma de un disco, y tiene un diámetro de aproximadamente 8-12 mm, preferentemente de aproximadamente 11 mm. En otros ejemplos, cada una de las matrices de cartílago tiene la forma de una tira de aproximadamente 6 cm de longitud, 10 mm de anchura y 2-5 mm de espesor. En general, el tamaño y la forma de cada injerto de cartílago no son críticos de acuerdo con la presente divulgación, a condición de que se ajuste al tamaño y la forma del lugar de tratamiento.

15 25 Para producir el injerto de cartílago acelular deseado, se extrae un cartílago intacto, como un cartílago nasal, un cartílago de costilla, un cartílago de oreja o un cartílago de rodilla, de un animal no humano, preferentemente de un animal de granja, y se utiliza como fuente de cartílago. Ejemplos de animales de granja adecuados que pueden actuar como fuente de cartílago incluyen, pero sin limitación, cerdos, vacas, toros, ovejas, cabras, burros, conejos, patos, gansos y aves de corral. El cartílago que sirve de fuente para el injerto de cartílago debe recogerse preferentemente de animales recién sacrificados y colocarse inmediatamente en solución isotónica estéril u otra solución conservante. A continuación, el cartílago cosechado se corta en tamaños y formas adecuados, produciendo así matrices de cartílago que tienen forma de discos, tiras, partículas y conos. En algunos ejemplos, cada una de las matrices de cartílago tiene la forma de un disco, y tiene un diámetro de aproximadamente 8-12 mm, preferentemente de aproximadamente 11 mm. En otros ejemplos, cada una de las matrices de cartílago tiene la forma de una tira de aproximadamente 6 cm de longitud, 10 mm de anchura y 2-5 mm de espesor. En general, el tamaño y la forma de cada injerto de cartílago no son críticos de acuerdo con la presente divulgación, a condición de que se ajuste al tamaño y la forma del lugar de tratamiento.

20 30 35 A continuación, las matrices de cartílago cortadas en cubos se someten a un tratamiento de hidróxido de sodio y a un tratamiento de desinfección, como se describe en las etapas (2) y (3), respectivamente. En otros ejemplos no comprendidos en el ámbito de las reivindicaciones, el tratamiento de la etapa (2) puede llevarse a cabo utilizando otros agentes alcalinos, como hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, urea, sulfuro de sodio, tioacetato de calcio, etc., en lugar de hidróxido de sodio. Preferentemente, las matrices de cartílago se tratan con una solución de hidróxido de sodio a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 horas. La desinfección puede llevarse a cabo sometiendo las matrices de cartílago al tratamiento de un agente desinfectante, como un alcohol, un agente oxidante, un compuesto fenólico, un compuesto de amonio cuaternario, un antibiótico y radiación, para esterilizar las matrices de cartílago. Los ejemplos adecuados de agentes de desinfección útiles para el procedimiento de la presente divulgación incluyen el etanol, el isopropanol, el bicarbonato de sodio, el peróxido de hidrógeno, el ácido acético, las sulfonamidas, el parabeno, el ácido benzoico, el ácido salicílico, el cloruro de benzalconio, el cloruro de alquildimetilbencilamonio, el cloruro de didecildimetilamonio, el cloruro de amonio, los rayos X, la radiación gamma y la luz UV. En algunas realizaciones, las matrices de cartílago se tratan con una solución de peróxido de hidrógeno. Además, después de cada etapa, las matrices de cartílago se lavan con cantidades abundantes de agua para eliminar cualquier materia soluble, antes de ser sometidas al siguiente tratamiento.

40 45 A continuación, las matrices de cartílago desinfectadas obtenidas en la etapa (3) se someten a un proceso de descelularización. El proceso de descelularización se lleva a cabo con el fin de eliminar los materiales celulares del tejido cartilaginoso, conservando las propiedades físicas y bioquímicas del colágeno, para que pueda servir mejor como andamio tisular (por ejemplo, un xenoinjerto). Por consiguiente, en la etapa (4), las matrices de cartílago desinfectadas de la etapa (3) se tratan con un fluido supercrítico (SCF) a una presión de aproximadamente 15 - 35 MPa (150 - 350 bar), tal como 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 y 35 MPa (150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340 y 350 bar). Además, la etapa (4) se realiza a una temperatura entre 30-50 °C, tal como 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 y 50 °C; preferentemente entre 35-45 °C, tal como 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 y 45 °C.

50 El SCF puede ser cualquiera de los siguientes: dióxido de carbono supercrítico (scCO<sub>2</sub>), óxido nitroso supercrítico (scN<sub>2</sub>O), agua supercrítica (scH<sub>2</sub>O), alcano supercrítico, alqueno supercrítico, alcohol supercrítico o acetona supercrítica. En un ejemplo, el SCF es scCO<sub>2</sub> dado que scCO<sub>2</sub> tiene unas condiciones críticas suaves de 37 °C a aproximadamente 35 MPa (350 bar), por lo que permite eliminar los materiales biológicos a la temperatura del cuerpo o cerca de esta (es decir, 37 °C). En otro ejemplo preferente, el SCF es scN<sub>2</sub>O.

55 Opcionalmente, en otro ejemplo de la divulgación que no entra en el ámbito de las reivindicaciones, el SCF se aplica a las matrices de cartílago desinfectadas de la etapa (3) junto con un codisolvente. El codisolvente puede ser un alcohol C1-4, tal como el etanol, el propanol, el isopropanol, el butanol, el isobutanol, el sec-butanol, el t-butanol y el ciclobutanol. Por ejemplo, el codisolvente puede ser etanol, y se aplica junto con el SCF en una proporción de volumen de 1:20 a 1:4, tal como 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5 y 1:4. En un ejemplo, el etanol se aplica con SCF en una proporción de volumen de 1:19. En otro ejemplo, el etanol se aplica con SCF en la proporción de volumen de 1:10. En otro ejemplo, el etanol se aplica con SCF en una proporción de volumen de 1:4.

Lo más preferente es que el etanol y el SCF se apliquen simultáneamente en una proporción de volumen de aproximadamente 1:10.

De acuerdo con la presente divulgación, los injertos de cartílago tratados con SCF de la etapa (4) están sustancialmente desprovistos de cualquier materia celular, por lo que no requieren ningún tratamiento adicional de digestión enzimática (por ejemplo, digestión con proteasa, y/o glucosidasa) para eliminar las moléculas de carbohidratos antigenicos de la superficie que podrían servir como fuente de rechazo inmunogénico de un xenoinjerto. De acuerdo con la presente divulgación, los injertos de cartílago producidos carecen de ácidos nucleicos y de proteínas no colágenas.

Además, los injertos de cartílago tratados con SCF de la etapa (4) están constituidos por fibras de colágeno en las que se mantiene la resistencia mecánica y la integridad de las fibras de colágeno, por lo que son adecuados para uso como andamios biológicos para que las células huésped crezcan en ellos. De acuerdo con la presente divulgación, los injertos de cartílago de la presente divulgación conservan la estructura y la conformación nativa de las fibras de colágeno, y son capaces de soportar el crecimiento de células de fibroblastos.

Cabe destacar que el procedimiento de la presente invención difiere del procedimiento de la técnica anterior en que, se elimina el uso convencional de la solución salina hipertónica, la deshidratación y/o los tratamientos de congelación para la preparación de un injerto de cartílago, lo que hace que el procedimiento de la presente invención sea más simplificado y fácil de utilizar, al tiempo que se mantiene la integridad y/o la resistencia mecánica de las fibras de colágeno en el injerto de cartílago producido. Además, el procedimiento de la presente invención difiere del procedimiento del arte previo en que, no requiere el uso de un agente de reticulación (por ejemplo, glutaraldehído, formaldehído, y similares) para reticular las proteínas de los injertos de cartílago, de modo que la toxicidad y la inmunogenicidad de los injertos de cartílago se reducen o disminuyen.

De acuerdo con la presente divulgación, los injertos de cartílago tratados con SCF pueden ser opcionalmente esterilizados utilizando cualquier procedimiento conocido (por ejemplo, tratamiento con un agente de desinfección como se ha descrito anteriormente) y almacenados en una condición desecada y esterilizada hasta su uso. Por ejemplo, los injertos de cartílago pueden ser expuestos a rayos gamma con una intensidad de 10-60 kGy, tal como 10, 20, 30, 40, 50 y 60 kGy, para esterilizar los injertos de cartílago. Los injertos de cartílago pueden ser expuestos, por ejemplo, a rayos gamma con una intensidad de 10-30 kGy, como 10, 15, 20, 25 y 30 kGy para esterilizar los injertos de cartílago.

El injerto de cartílago acelular así producido es adecuado para uso en una cirugía cosmética o plástica; o para el tratamiento de enfermedades osteocondrales, que incluyen la reconstrucción, reparación o restauración de cartílago dañado, lesionado, traumatizado o envejecido y/o la reparación de defectos osteocondrales, mediante la implantación de un injerto de cartílago acelular producido por el procedimiento en la presente memoria desvelado en un sitio de tratamiento (por ejemplo, una lesión de cartílago).

Los injertos de cartílago obtenidos por el procedimiento de la presente divulgación pueden aplicarse a un lugar de tratamiento (por ejemplo, un sitio de lesión) de un individuo necesitado de dicho tratamiento para tratar enfermedades osteocondrales, tal como defectos congénitos, fracturas óseas, lesiones o defectos meniscales, deformación ósea/espinal, osteosarcoma, mieloma, displasia ósea y escoliosis, osteoporosis, enfermedad periodontal perdida de hueso dental, osteomalacia, raquitismo, osteitis fibrosa, distrofia ósea renal, fusión espinal, reconstrucción o extirpación de disco espinal, enfermedad ósea de Paget, lesiones de menisco, artritis reumatoide, artrosis o una lesión traumática o quirúrgica del cartílago. Se prevé que tras el injerto de cartílago tratado con SCF obtenido por el procedimiento desvelado en la presente memoria se implante en el lugar de la lesión, los condrocitos vecinos se activen y se desplacen a la estructura porosa del injerto de cartílago en la que comienzan a crecer hasta reemplazar finalmente el cartílago dañado en el lugar de la lesión, y el injerto de cartílago se degrada completamente sin dejar residuos tóxicos en el sujeto.

## 45 EJEMPLOS

### Materiales y procedimientos

#### *Cultivos celulares*

Las células de fibroblastos NIH-3T3 se cultivaron en DMEM-alta glucosa con suplementos, incluyendo 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 unidades/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>.

#### *Aislamiento de condrocitos*

Los condrocitos se aislaron del cartílago articular porcino. El cartílago se enjuagó en medio de cultivo y luego se transfirió a un medio de digestión (DMEM, 10% FBS, 1%P/S, 0,1 mg/ml de estreptomicina) que contenía colagenasa tipo H y se incubó durante 24 horas a 37°C. Las células se recogieron por centrifugación (300x g durante 5 minutos).

**Tinción H & E**

El tejido cartilaginoso seccionado se desparafinó sumergiéndolo en xileno durante 10 minutos, y el tratamiento se repitió una vez. A continuación, el tejido desparafinado se hidrató pasando por una serie de baños de alcohol, en los que la concentración de alcohol varió del 100%, al 95%, 85% y 75%, respectivamente. En cada pasada, se dejó que

- 5 la muestra de tejido permaneciera en las soluciones de alcohol durante 2 minutos, y luego se enjuagó con abundante cantidad de agua desionizada. Tras la hidratación, la muestra de tejido se tiñó con hematoxilina durante 3-5 minutos, y luego se lavó con agua desionizada y etanol al 75%. El cartílago teñido con hematoxilina se tiñó además con Eosina Y al 1% durante aproximadamente 30 segundos, seguido de un lavado con agua desionizada y etanol al 95% y al 100%, secuencialmente.

**10 Tinción con azul Alcian**

La sección de tejido cartilaginoso se desparafinó e hidrató de acuerdo con los procedimientos descritos en la sección "Tinción H & E". A continuación, la muestra se tiñó con azul alcáin durante 30 minutos, seguido de un lavado en agua corriente durante 2 minutos y un enjuague con agua desionizada. La muestra de cartílago teñida con azul alcáin se sometió a contratinción con una solución de rojo rápido nuclear durante 5 minutos, y luego se lavó en agua corriente durante 1 minuto. A continuación, la muestra de cartílago se deshidrató pasando por etanol al 95% y etanol al 100% (dos veces, cada una de ellas durante 2 minutos), y se montó con un medio de montaje resinoso.

**Recelularización de células 3T3 en los injertos de cartílago**

Las células 3T3 se cultivaron hasta un 80% de confluencia, luego se cosecharon mediante tratamiento enzimático (0,25% de tripsina en 1 mM de EDTA) y centrifugación a 500xg durante 5 minutos. Las células recogidas se resuspendieron en medio de cultivo hasta una concentración final de  $2 \times 10^6$  células/ml. Los injertos de cartílago de la presente tratados con SCF se humedecieron previamente con medio de cultivo y se incubaron durante la noche, y luego se colocaron en placas de 24 pocillos de baja adherencia (Corning). La mitad de la suspensión celular (200 $\mu$ L) se colocó cuidadosamente en un lado de cada injerto de cartílago tratado con SCF, y se cultivó durante 2 horas en la incubadora para garantizar que las células se adhirieran a la superficie. La suspensión celular restante se colocó en el otro lado (es decir, el lado que no había estado en contacto con las células) de los injertos de cartílago tratados con SCF de acuerdo con el mismo procedimiento que se acaba de describir. A continuación, los injertos de cartílago sembrados con células se cultivaron en 2 ml de medio de cultivo durante 7 días, y luego se fijaron en formol al 10% para el siguiente análisis.

**Recelularización de condrocitos primarios en los injertos de cartílago**

30 Los injertos de cartílago se colocaron en una placa de 24 pocillos (200mg/pocillo), y luego se sembraron condrocitos recién aislados en los injertos de cartílago. El número final de células fue de  $1,2 \times 10^7$  células por pocillo en medio de cultivo. El medio se cambió tres veces por semana. Tras 2 semanas de cultivo, se recogieron los injertos de cartílago y se fijaron en formol al 10% para su análisis posterior.

**Medición de la resistencia a la compresión**

35 Todas las muestras de cartílago se rehidrataron en una solución de PBS durante al menos 16 horas, y luego se midieron las respectivas alturas y/o diámetros, dependiendo de las formas de las muestras; si la muestra de cartílago tenía forma de tira, se midió su altura; por otro lado, si la muestra de cartílago tenía forma de disco, se registró su diámetro antes de la prueba. La medición de la resistencia a la compresión se realizó en máquina Lloyd (LRX Instrument, England). Cada prueba comenzó con una precarga de 2N, y la velocidad de carga se fijó en 0,18mm/min, la prueba se abortó cuando la carga provocó una caída del 65% de la altura y/o el diámetro de la muestra.

**EJEMPLO 1 Preparación y caracterización de los injertos de cartílago****1.1 Preparación de los injertos de cartílago descelularizado**

Se esterilizaron las articulaciones porcinas y se extrajo quirúrgicamente el cartílago. El cartílago se lavó con agua y luego se cortó en matrices de diversos tamaños y formas de acuerdo con las aplicaciones previstas.

45 Las matrices de cartílago se sumergieron primero en una solución de hidróxido de sodio (1N) durante 3 horas a temperatura ambiente, y luego en una solución de peróxido de hidrógeno (5%) a 4°C durante 48 horas. Despues de cada tratamiento con solución, las matrices de cartílago se lavaron con cantidades abundantes de agua para eliminar cualquier solución de tratamiento residual.

50 Luego, las matrices de cartílago fueron sometidas a un tratamiento de scCO<sub>2</sub> a 35 MPa (350 Bar), 37°C durante 100 min para eliminar cualquier materia celular residual y así generar los injertos de cartílago descelularizados, los cuales fueron irradiados con rayos gamma (30 kGy) y almacenados en una condición desecada y esterilizada hasta su uso.

### 1.2 Caracterización de los injertos de cartílago del Ejemplo 1.1

El análisis morfológico indicó que, antes del tratamiento con SCF, se observaban materias celulares residuales en la laguna, un pequeño espacio que contiene los condrocitos en el cartílago (**FIG. 1**, panel A); sin embargo, después del tratamiento con SCF a varios niveles de presión, las materias celulares residuales observadas anteriormente en la

- 5 laguna, desaparecieron completamente (**FIG. 1**, paneles B, C y D), lo que confirmó que el tratamiento con SCF era un medio eficaz para eliminar las materias celulares del cartílago. Los resultados se confirmaron además mediante tinción con H&E, DAPI y azul alcián, en las que no se tiñeron positivamente ni los núcleos celulares (**FIG. 2**), ni los polisacáridos ácidos (por ejemplo, los glicosaminoglicanos del cartílago) (**FIG. 3**). En conjunto, los resultados de las

10 **FIGS. 1 a 3** confirmaron que no había materias celulares residuales (por ejemplo, núcleos y restos de carbohidratos) en los injertos de cartílago tratados con SCF.

Además, la porosidad de los injertos de cartílago tratados con SCF permaneció relativamente intacta (**FIG. 4**), prestando apoyo a la recelularización de las células 3T3 así como de los condrocitos primarios en ellos, en los que se observó que los condrocitos primarios migraban a la estructura porosa de los injertos de cartílago del ejemplo 1.1 y se incrustaban en la laguna (datos no mostrados).

- 15 La propiedad mecánica del injerto de cartílago tratado con SCF del ejemplo 1.1 era superior a la de un cartílago nativo, en el que el injerto de cartílago tratado con SCF del ejemplo 1.1 podía soportar al menos 2 pliegues de tensión en una prueba de compresión (**FIG. 5**).

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de preparación de injertos de cartílago acelular que comprende:

(1) cortar en cubos un cartílago de un animal para producir una pluralidad de matrices de cartílago;

5 (2) tratar las matrices de cartílago de la etapa (1) con una solución de hidróxido de sodio a temperatura ambiente durante aproximadamente 3-24 horas;

(3) someter las matrices de cartílago tratadas con hidróxido de sodio de la etapa (2) a un tratamiento de desinfección; y

10 (4) someter las matrices de cartílago desinfectadas de la etapa (3) a un tratamiento de descelularización con fluido supercrítico (SCF) para producir los injertos de cartílago acelular, en el que el tratamiento SCF se lleva a cabo bajo una presión de aproximadamente 15-35 MPa (150-350 bar) a una temperatura de entre 30-50 °C durante aproximadamente 100 minutos, en el que los injertos de cartílago tratados con SCF están desprovistos de cualquier materia celular, de modo que se obtienen injertos de cartílago acelular y no se requiere ningún tratamiento adicional de digestión enzimática.

15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cartílago es un cartílago nasal, un cartílago de costilla, un cartílago de oreja o el cartílago de rodilla obtenido de un cerdo.

3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que cada injerto de cartílago tiene forma de disco, tira, cono o partícula.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el tratamiento de desinfección de la etapa (3) comprende tratar las matrices de cartílago con un agente de desinfección seleccionado del grupo que consiste en, un alcohol, un agente oxidante, una radiación, un compuesto fenólico y un compuesto de amonio cuaternario.

20 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el alcohol es etanol o isopropanol.

6. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el agente oxidante es peróxido de hidrógeno.

7. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el compuesto fenólico es parabeno, ácido benzoico o ácido salicílico.

25 8. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el compuesto de amonio cuaternario es cloruro de benzalconio, cloruro de alquildimetilamonio, cloruro de didecildimetilamonio y cloruro de amonio.

9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el SCF es cualquiera de un dióxido de carbono supercrítico ( $scCO_2$ ), un óxido nitroso supercrítico ( $scN_2O$ ), un agua supercrítica ( $scH_2O$ ), un alcano supercrítico, un alqueno supercrítico, un alcohol supercrítico o una acetona supercrítica.

30 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el SCF es  $scCO_2$ , la temperatura es de aproximadamente 37 °C, y la presión es de aproximadamente 35 MPa (350 bar).

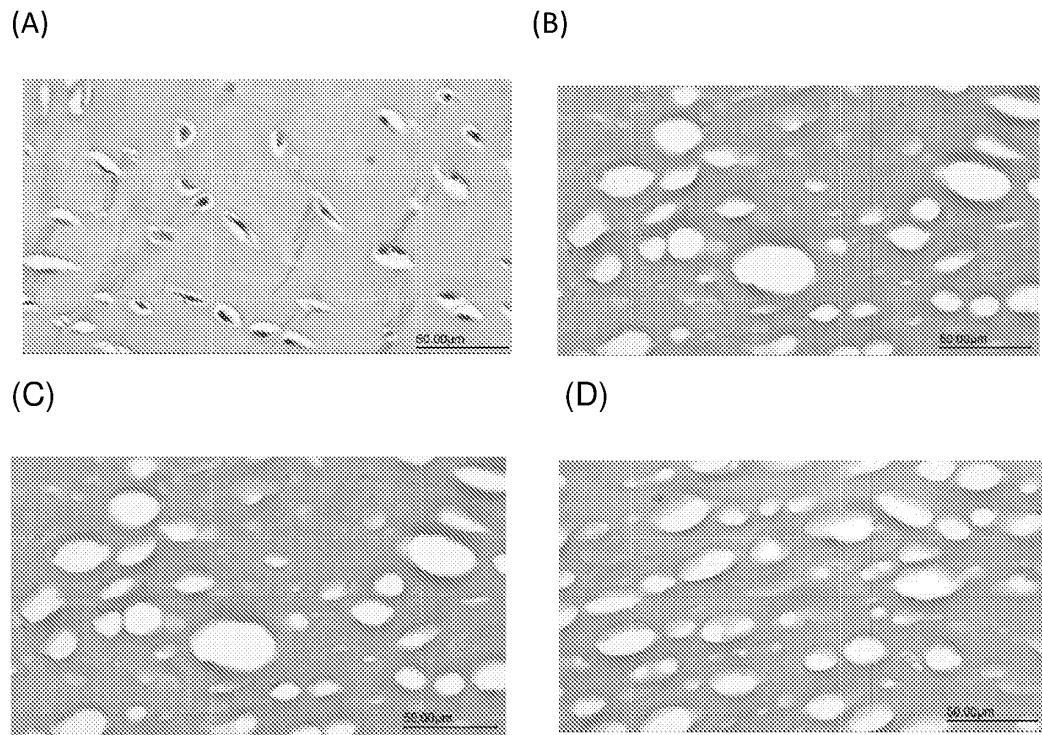
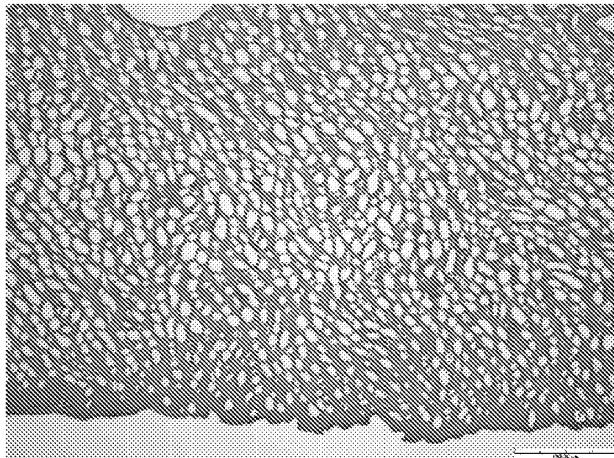


FIG 1

(A)



(B)

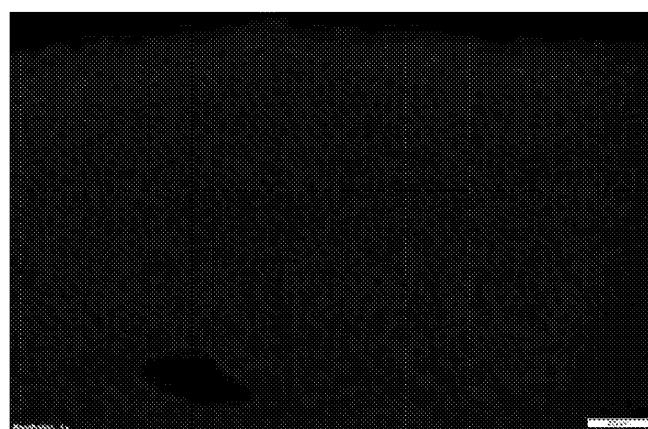
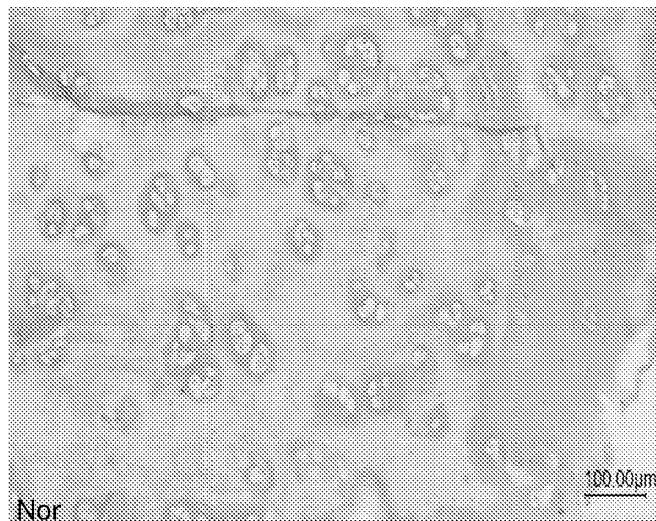


FIG 2

(A)



(B)

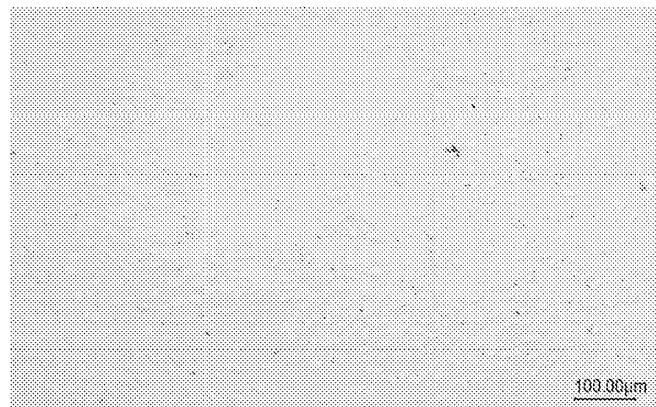
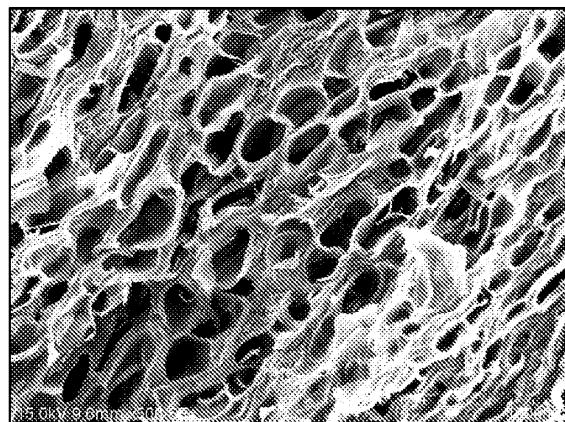
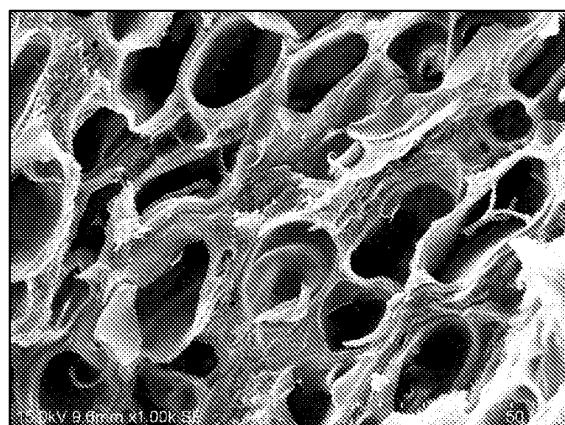


FIG 3

(A)



(B)



(C)

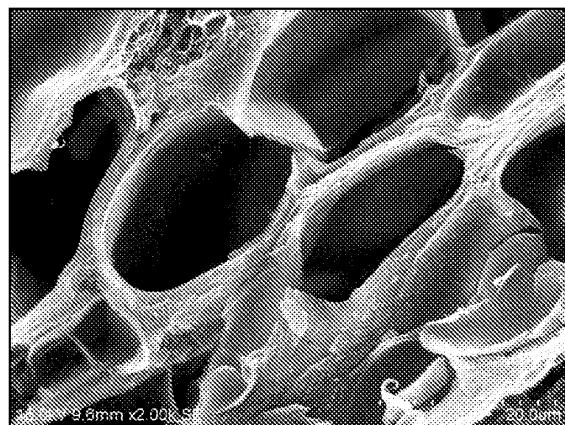
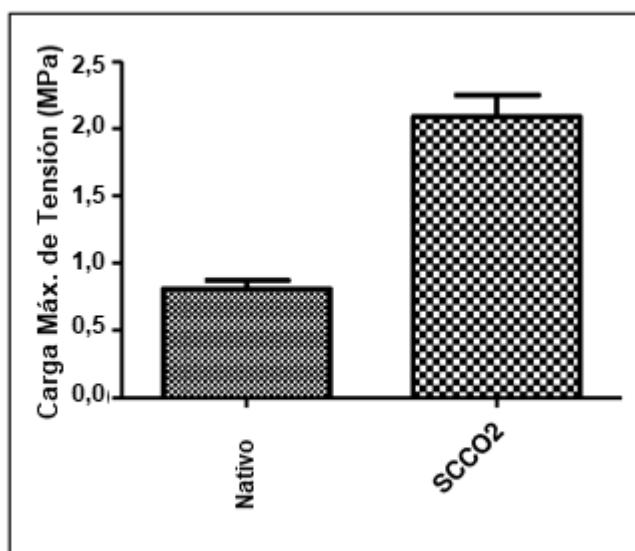


FIG 4

(A)



(B)

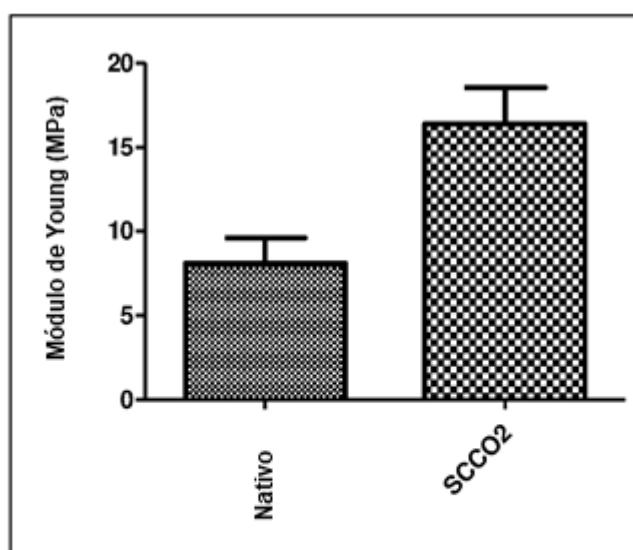


FIG 5