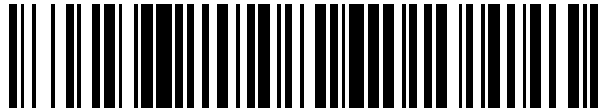


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 479**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/26**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2009 PCT/KR2009/007188**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2011 WO11049265**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2009 E 09850624 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2491960**

54 Título: **Composición para la reparación de tejido cartilaginoso y un método de producción de la misma**

30 Prioridad:

**23.10.2009 KR 20090101388**

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

**19.07.2017**

73 Titular/es:

**SEWON CELLONTECH CO., LTD (100.0%)  
10th Floor Shinhan Investment tower 23-2  
Yeouido-dong  
Yeongdeungpo-gu, Seoul 150-712, KR**

72 Inventor/es:

**JANG, CHEONG-HO;  
YU, JI-CHUL;  
LEE, SAE-BOM;  
PARK, HYUN-SHIN;  
KIM, HYUN-JO;  
JANG, JAE-DEOG;  
YEO, SE-KEN;  
PARK, JU-HEE y  
KIM, SEOK-JUNG**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 625 479 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**

Composición para la reparación de tejido cartilaginoso y un método de producción de la misma

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a una composición para la reparación de tejido cartilaginoso y a un método de producción de la misma, más precisamente, se mezclan biomateriales, tales como colágeno y fibrina para permitir que el tejido cartilaginoso dañado sea reparado hasta un estado que permite el trasplante sobre el tejido, y se induce una regeneración eficiente, haciendo posible de este modo reducir la tensión relacionada con la cirugía en las personas y los animales, a la vez que se induce la reparación y regeneración del cartílago de modo relativamente rápido y eficiente, y, como resultado, haciendo posible mejorar sustancialmente la calidad y la fiabilidad del producto y causar una buena impresión a los pacientes.

**Descripción de la técnica relacionada**

15 El cartílago articular que se encuentra en muchas superficies de articulaciones es un material extremadamente resbaladizo y brillante que funciona para reducir la fricción y la resistencia al desgaste de las articulaciones durante el funcionamiento de las articulaciones. La fricción del cartílago articular se incrementa cuando el cartílago articular está dañado, y los cartílagos articulares se desgastan y erosionan, y aparecen el dolor y los trastornos funcionales, y el daño del cartílago en la articulación se convierte en osteoartritis. Las causas de los daños del cartílago son traumatismos tales como caídas, golpes directos o fuerza de giro, o enfermedades tales como artritis, osteonecrosis, artritis inflamatoria u osteocondritis disecante, y los síntomas son dolor, edema, y bloqueo. Durante decenas de años, se han realizado muchos estudios para la regeneración fisiológica del cartílago articular para tratar el daño del cartílago articular y se han utilizado diversos tratamientos.

20 Sin embargo, según las publicaciones, hasta ahora, se utiliza un tratamiento común tal como una terapia física o un tratamiento con fármacos para el tratamiento del daño del cartílago articular debido a que los tejidos del cartílago articular no se pueden regenerar. Se utilizan tratamientos quirúrgicos y no quirúrgicos. Las compresas calientes y frías y medicamentos tales como los AINE, y la inyección intraarticular de esteroides son ejemplos del tratamiento no quirúrgico que solamente alivia los síntomas y no debilita la enfermedad. Procedimientos reparadores tales como desbridamiento, microfractura, artroplastia de perforación/abrasión, trasplante osteocartilaginoso autólogo, implantación de condrocitos, y sustitución del cartílago articular son ejemplos del tratamiento quirúrgico.

25 Recientemente, hay varios intentos de un tratamiento quirúrgico en el que se aplican biomateriales sobre la región defectuosa del cartílago.

30 Los biomateriales son compatibles con el cuerpo humano y no presentan ningún rechazo. Estos biomateriales pueden reemplazar o regenerar el tejido y los órganos dañados hasta tejido normal y órganos normales. Por lo tanto, ha aumentado la atención que se presta a los biomateriales que se pueden utilizar para reemplazar o regenerar el tejido y los órganos dañados.

35 El cuerpo humano rechaza el material extraño en su cuerpo. Por lo tanto, la sustitución de una parte de un órgano humano con otros materiales es muy difícil. Los biomateriales contribuyen al progreso de la cirugía médica porque los biomateriales tienen afinidad biológica con el cuerpo humano.

Hay dos tipos de biomateriales, biomateriales sintéticos y naturales que se pueden utilizar para la fabricación de dispositivos médicos de implantación para diagnóstico y tratamiento.

40 Los metales, materiales inorgánicos, cerámicas, polímeros sintéticos pertenecen a los biomateriales sintéticos que no presentan rechazo, pero que no tienen vitalidad.

Se han desarrollado y comercializado biomateriales naturales, tales como fibrina, colágeno, ácido hialurónico y quitosano.

45 Los materiales que forman el cuerpo humano y mantienen la vida son polímeros y células biológicos. Los polisacáridos y proteínas que se encuentran en el cuerpo humano son ejemplos representativos. Si no tienen ningún rechazo inmunitario, pueden estar en un estado similar a un estado natural y esperado para la regeneración de órganos humanos que tienen la función de crecimiento. Los tejidos naturales se pueden utilizar para un biomaterial médico que puede conferir funciones biológicas a los materiales poliméricos inorgánicos y sintéticos. La biocompatibilidad entre los tejidos circundantes y los biomateriales inorgánicos trasplantados en un cuerpo humano puede ser establecida por los tejidos naturales, y además, los tejidos naturales pueden conferir funciones biológicas a los biomateriales inorgánicos.

50 La fibrina biocompatible y biodegradable se utiliza como un adhesivo natural y un agente antihemorrágico. La fibrina es absorbida en varias semanas durante la cicatrización de las heridas. Se ha descrito que la fibrina no tiene efectos secundarios tales como inflamación, respuesta inmunitaria, necrosis del parénquima, e hipertrofia de las fibras.

La fibrina que tiene una forma de soporte natural para las células fibroblastos tiene un papel importante en la cicatrización de las heridas.

5 La concepción de productos de fibrina se estableció en la década de 1970 y el primer producto industrial de fibrina fue comercializado en Europa en 1982 y se ha seguido comercializando hasta ahora. Estudios recientes han demostrado que la fibrina se puede utilizar como soporte para la ingeniería tisular, y la optimización se lleva a cabo en varios campos de la medicina, tales como ortopedia, dentistas, y neurocirugía.

El colágeno es un grupo de proteínas y se encuentra en la dermis, tendones/ligamentos, vasos sanguíneos, huesos y cartílagos. Un tercio de la proteína total de los mamíferos es colágeno.

10 Se han descrito más de 20 tipos diferentes de colágeno, entre ellos la cantidad de colágeno tipo I que se encuentra en la piel, tendones/ligamentos y huesos es aproximadamente el 90 % del colágeno total.

15 El colágeno está compuesto de una triple hélice, cuyo peso molecular es 300.000 dalton (100.000 dalton cada hélice). El aminoácido más pequeño glicina se encuentra en cada tercera posición (-GXY-; X e Y son otros aminoácidos) de la molécula de colágeno. Por lo tanto, la glicina total en el colágeno es un tercio de los aminoácidos totales. El colágeno tiene hidroxiprolina y el contenido de hidroxiprolina es el 10 % de los aminoácidos totales. La hidroxiprolina se utiliza para el análisis cuantitativo de colágeno.

El colágeno se utiliza en diversos campos de la medicina, tal como un astringente, apósito para heridas, vascular artificial, y agentes para reducción de arrugas. El primer astringente de colágeno Aviten que tiene forma de polvo extraído de la piel de vaca se desarrolló en 1974 y se sigue utilizando hasta ahora.

20 Hay 3 modos de uso del colágeno como materia prima. Se utilizan colágeno puro, colágeno procesado que se procesa a través de un procedimiento acelular/descelular de tejido, y colágeno alterado.

El colágeno puro tiene baja resistencia a la tracción, por lo que no se recomienda su utilización para suturas, a pesar de su alta estabilidad y pureza. El colágeno tiene una resistencia a la tracción y al desgarro más baja que otros polímeros, de modo que se añaden al colágeno otros materiales tales como GAG o polímeros sintéticos biocompatibles (PGA/PLA) para mejorar su resistencia.

25 El colágeno tiene muchas ventajas tales como baja antigenicidad, alta biocompatibilidad, y bioabsorbabilidad, adhesión de células, crecimiento celular, inducción de la diferenciación celular, coagulación sanguínea, efecto astringente, y biocompatibilidad con otros polímeros.

Sin embargo, las propiedades y características físicas para mantener el volumen son inferiores y el colágeno puro es caro.

30 La fibrina tiene propiedades moderadas en volumen, elasticidad y adhesividad, y también tiene efecto astringente. Por lo tanto, la fibrina es un biomaterial eficaz para la reparación y regeneración del tejido cartilaginoso.

35 El cartílago articular es un tejido avascular y sin nervios, y tiene una capacidad muy limitada de autocicatrización a diferencia de los otros tejidos mesenquimatosos. Por lo tanto, uno de los objetivos de la presente invención es proporcionar nutrientes que se utilizan para la regeneración del tejido cartilaginoso mediante la adición de componentes del medio para el cultivo de condrocitos.

40 Cuando el tejido del cartílago de una articulación es dañado una vez, no se puede regenerar normalmente en el cuerpo. El paciente sufre limitaciones en su vida diaria con dolor intenso, y cuando éste se convierte en crónico induce a una osteoartritis fatal que hace que la vida normal del paciente se haga imposible. Hay más de 500.000 casos de artroplastia y de cirugía de sustitución de una articulación completa en los Estados Unidos y Europa, respectivamente.

45 Por lo tanto, es necesario un procedimiento sencillo para el tratamiento de la región defectuosa del cartílago mediante el uso o el trasplante de biomateriales tales como colágeno y fibrina. Estos métodos de tratamiento de la región defectuosa del cartílago son muy eficaces en la etapa temprana del daño del cartílago. Y cuando dicho tratamiento se lleva a cabo en la fase precoz del daño del cartílago, el número de pacientes que necesitan cirugía de sustitución de rodilla se puede reducir. Mediante este tratamiento preventivo se reducirá también el número de osteoartritis.

En el pasado, no se ha descrito ninguna composición para la reparación de tejido cartilaginoso mediante el uso de biomateriales tales como colágeno y adhesivo de fibrina ni los métodos para aplicarlos en el tratamiento.

50 El documento WO 2005/060987 A1 se dirige a una composición terapéutica para el cartílago que comprende una mezcla de condrocitos, y trombina y una matriz de fibrinógeno que contiene fibrinógeno. El documento WO 01/37889 A2 se dirige a un material sustituto del hueso, que comprende una matriz blanda, células vivas y una matriz de curación.

## Sumario de la invención

La presente invención se destina a resolver los problemas de la técnica anterior. El primer objetivo de la presente invención es proporcionar una composición para la reparación del tejido cartilaginoso, compuesta de una solución de fibrinógeno y aprotinina, trombina y una solución estabilizante, y una solución de colágeno. El segundo objetivo es la regeneración eficaz del tejido cartilaginoso dañado mediante una forma trasplantable compuesta de biomateriales tales como colágeno y fibrinógeno. Este tratamiento reduce la carga de la cirugía, y se induce la regeneración y restauración de la región defectuosa del cartílago. El tercer objetivo es que este método constituya un tratamiento sencillo de la posible región defectuosa del cartílago. El cuarto objetivo es la reducción del número de pacientes que requieren cirugía de una articulación gracias al tratamiento precoz de la región defectuosa del cartílago. El quinto objetivo es la reducción del número de pacientes que requieren cirugía de una articulación gracias al tratamiento preventivo. El sexto objetivo es proporcionar una composición para la reparación del tejido cartilaginoso y un método de preparación de la composición, para que la mejor calidad y fiabilidad del producto transmita una buena imagen a los pacientes.

Para alcanzar los objetivos, la presente invención proporciona un método de preparación de una composición para la reparación de tejido cartilaginoso, que comprende las etapas de (a) disolver fibrinógeno liofilizado en una solución de aprotinina; (b) disolver trombina liofilizada en una solución estabilizante; (c) mezclar una solución de colágeno enriquecido con la trombina y la solución estabilizante; y colocar la solución de fibrinógeno (a) en un lado de un kit dual y la solución (c) que contiene la solución de colágeno en el otro lado, y después mezclar (a) y (c), en donde el tiempo de gelificación después de la mezcla de (a) y (c) es de 3 minutos y la tensión máxima es superior a 10 N, cuando se mide con un reómetro CR-500DX, en donde la concentración de fibrinógeno varía de 35 a 55 mg/L, la concentración de la solución de aprotinina es 1500 KIU/mL, la concentración de trombina es 29,41 IU/mL, la concentración de la solución estabilizante es 0,65 mg/mL, y la concentración de colágeno es 13,23 mg/mL, en donde la solución estabilizante se prepara por la adición de cloruro de calcio al medio de cultivo DMEM para el cultivo de las células de cartílago, y el medio de cultivo DMEM comprende sales, aminoácidos y vitaminas.

La presente invención proporciona la regeneración efectiva de tejido cartilaginoso dañado mediante una forma trasplantable compuesta de biomateriales tales como colágeno y fibrinógeno, y este método reduce la carga de la cirugía, e induce la regeneración y restauración rápida y eficaz de la región defectuosa del cartílago.

La presente invención proporciona un método sencillo para el tratamiento de la región defectuosa del cartílago.

La presente invención proporciona la reducción del número de pacientes que requieren cirugía de una articulación gracias al tratamiento precoz de la región defectuosa del cartílago.

Además, la presente invención proporciona la reducción del número de pacientes que necesitan cirugía de una articulación gracias al tratamiento preventivo.

La presente invención proporciona una mejor calidad y fiabilidad del producto que transmite una buena imagen a los pacientes.

## Breve descripción de los dibujos

La figura 1 presenta un método de producción de una composición para la reparación del tejido cartilaginoso según la presente invención.

La figura 2 presenta una fotografía de aplicación del kit dual que contiene la composición para la reparación de tejido cartilaginoso según la presente invención.

La figura 3 presenta una fotografía de aplicación de la composición para la reparación de tejido cartilaginoso según la presente invención a una región defectuosa del cartílago de un animal (cerdo).

La figura 4 presenta fotografías que muestran las observaciones visuales de los resultados experimentales de una aplicación de la composición para la reparación de tejido cartilaginoso según la presente invención a una región defectuosa del cartílago de un animal (conejo).

La figura 5 presenta fotografías que muestran las observaciones histopatológicas de los resultados experimentales de una aplicación de la composición para la reparación de tejido cartilaginoso según la presente invención a una región defectuosa del cartílago de un animal (conejo).

Las figuras 6A y 6B presentan fotografías de gelificación de una solución según la presente invención y según la técnica anterior, respectivamente.

Las figuras 7A y 7B presentan fotografías con microscopio de fluorescencia de la viabilidad de las células del cartílago.

### Descripción detallada de la invención

De aquí en adelante, se describirán las realizaciones de la presente invención en detalle con las figuras adjuntas.

En las figuras 1-5 se muestran una composición para la reparación del tejido cartilaginoso y un método de preparación de la composición según la presente invención, y las aplicaciones de los mismos.

- 5 Cuando una explicación detallada referida a una técnica y configuración técnica relacionadas conocidas confunde innecesariamente el sentido general de la presente invención, se omite la explicación detallada.

Las definiciones en la presente invención se deben interpretar a partir de los contenidos de la presente invención debido a que los términos pueden ser interpretados según la intención del productor o del usuario.

- 10 En primer lugar, la presente invención proporciona un material sólido utilizando biomateriales tales como colágeno y fibrinógeno, y también proporciona la preparación y el uso de una solución estabilizante que aporta nutrición a un entorno para la regeneración del cartílago, y después proporciona una composición para la reparación del tejido cartilaginoso que se prepara siguiendo varias etapas.

En detalle, las etapas para la preparación de una composición para la reparación del tejido cartilaginoso se componen de:

- 15 (a) disolver el fibrinógeno liofilizado en una solución de aprotinina;  
(b) disolver la trombina liofilizada en una solución estabilizante;  
(c) mezclar una solución de colágeno enriquecido con la trombina y la solución estabilizante;  
y poner la solución de fibrinógeno (a) en un lado de un kit dual y la solución (c) que contiene el colágeno en el otro lado, y después mezclar (a) y (c),  
20 en donde el tiempo de gelificación después de mezclar (a) y (c) es de 3 minutos y la tensión máxima es superior a 10 N, medida con un reómetro CR-500DX,  
en donde la concentración de fibrinógeno varía de 35 a 55 mg/mL, la concentración de la solución de aprotinina es 1500 KIU/mL, la concentración de trombina es 29,41 IU/mL, la concentración de la solución estabilizante es 0,65 mg/mL, y la concentración de colágeno es 13,23 mg/mL  
25 en donde la solución estabilizante se prepara por la adición de cloruro de calcio al medio de cultivo DMEM para el cultivo de células de cartílago, y el medio de cultivo DMEM comprende sales, aminoácidos y vitaminas,  
e inyectar en el tejido cartilaginoso dañado.

La solución estabilizante tiene un contenido de cloruro de calcio de 0,26 mg/mL.

La concentración final de cloruro de calcio en la solución estabilizante varía de 0,1 a 0,5 mg/mL.

- 30 Y la concentración final de cloruro de calcio en la composición para reparación de tejido cartilaginoso varía de 2,78 a 3,12 mg/mL.

La producción de la solución estabilizante en la presente invención se explica en detalle a continuación.

- 35 - Se añade cloruro de calcio al medio de cultivo DMEM utilizado en el cultivo de condrocitos para preparar la solución estabilizante. El medio de cultivo DMEM contiene sales, aminoácidos y vitaminas. La concentración de cloruro de calcio varía de 0,2 a 6 mg/mL.  
- La concentración final de cloruro de calcio en el colágeno y la solución estabilizante varía de 0,1 a 0,5 mg/mL.  
- La concentración de cloruro de calcio en la solución estabilizante se determina por el tiempo de gelificación y el intervalo de tensión máxima. El tiempo de gelificación es de 3 minutos y la tensión máxima es superior a 10 N.  
40 - El intervalo mínimo de la solución estabilizante es el intervalo mínimo utilizado para las condiciones de cultivo, y 0,5 mg/mL de cloruro de calcio es el intervalo máximo probado para la estabilización. La concentración final de cloruro de calcio utilizada en el adhesivo de fibrina comercial varía de 2,78 a 3,12 mg/mL, lo que afecta a las células.

El colágeno concentrado se prepara como sigue;

Es preferible utilizar colágeno altamente enriquecido.

El colágeno (a menos de 5 mg/mL) se esteriliza utilizando un filtro de 0,22 µm y después se concentra con manipulación aséptica.

5 El peso molecular del colágeno es aproximadamente 300.000 dalton, y la longitud de la molécula de colágeno es aproximadamente 300 nm de modo que la filtración es difícil cuando la concentración de colágeno es superior a 5 mg/mL.

El colágeno se concentra en el intervalo de 5 a 100 mg/mL.

La concentración de colágeno empieza a 5 mg/L y es posible continuar hasta 100 mg/mL (concentración soluble y medible).

10 Se utiliza diálisis y diafiltración para la concentración de colágeno, o se utiliza un método de centrifugación a pH y temperatura determinados. El colágeno concentrado se pone en una jeringa para su uso posterior.

La mezcla de colágeno, fibrinógeno, y solución estabilizante se ilustra en la figura. 2.

- Se disuelve el fibrinógeno liofilizado contenido en un producto adhesivo de fibrina en 2 cm<sup>3</sup> de solución de aprotinina y después se pone la solución en una jeringa.
- 15 - Se disuelve la trombina liofilizada en 2 cm<sup>3</sup> de solución estabilizante y después se pone la solución en una jeringa de 0,4 cm<sup>3</sup>.
- Se mezcla la solución concentrada de colágeno (al 3 %, 3 cm<sup>3</sup>) con la solución de trombina, y después se pone la solución en una jeringa de 2 cm<sup>3</sup>.
- Se colocan la solución de fibrinógeno/aprotinina y la solución de colágeno/trombina en un kit dual y después se aplican a la región defectuosa del cartílago.
- 20 - Hay diferentes productos de fibrinógeno (adhesivo de fibrina) comercializados en varios países, y los productos utilizados en Corea se listan en la tabla 1.

Tabla 1

			Nombre de producto		
			GreenPlast	Beriplast	Tissucol/Tisseel
Fabricación			Green Cross	ZLB Behring GmbH	Baxter AG
País			República de Corea	Alemania	Austria
Factor de coagulación	Fibrinógeno de plasma humano	mg/mL	71,5~126,5	65~115	70~110
	Trombina de plasma humano	IU/mL	400~600	400~600	500
	Factor XIII de plasma humano	U/mL	44~88	40~80	10~50
Catalizador de coagulación	Cloruro de calcio	mg/mL	5,56~6,24	5,9	5,88
Inhibidor de trombolisis	aprotinina	KIU/mL	1000	1000	3000

25 También están disponibles en otros países, Hemassel (Canadá), Quixil (Israel), Bolheal (Japón), Biocol (Francia), y Vanguard (Estados Unidos).

Las realizaciones de una composición para la reparación del tejido cartilaginoso y un método de producción de la misma se explican como sigue.

30 En primer lugar, la presente invención proporciona biomateriales tales como colágeno y fibrina que se mezclan con el fin de permitir que el tejido cartilaginoso dañado sea reparado hasta un estado que permite el trasplante sobre el tejido, y se induce una regeneración eficiente, lo que hace posible reducir el estrés relacionado con la cirugía en las personas y en los animales, a la vez que se induce la reparación y regeneración relativamente rápida y eficiente del cartílago. De aquí en adelante, se describirán en detalle las realizaciones de la presente invención.

Realización 1

Un método para aplicar colágeno y adhesivo de fibrina a una región defectuosa del cartílago de un animal (objetivo: confirmar la posibilidad de una aplicación de colágeno y adhesivo de fibrina a una región defectuosa del cartílago de un cerdo).

- 5
- Una vez que se ha fijado la pata del cerdo sobre un soporte, se daña el cartílago mediante un taladro (2 x 1,5 cm<sup>2</sup>).
  - Se llenan Thera Fill (colágeno enriquecido) y Greenplast (adhesivo de fibrina) en la región defectuosa del cartílago. El método de llenado es como sigue.
    - 1) Abrir el Greenplast y añadir después el fibrinógeno a una solución de aprotinina mediante inyección.
    - 2) Añadir una trombina liofilizada a una solución de calcio.
- 10
- 3) Mezclar 0,1 mL de solución de trombina/calcio con 1 cm<sup>3</sup> de Thera Fill utilizando un adaptador.
  - 4) Las soluciones 1) y 3) se colocan en un kit dual y después se aplican a la región defectuosa del cartílago.

Después de la aplicación, se observa la región defectuosa del cartílago durante 15 minutos.

- 15
- (Resultado: después de la aplicación de Thera Fill/adhesivo de fibrina a la región defectuosa del cartílago, se forman materiales sólidos antes de 10 minutos y los materiales sólidos tienen buenas características para los profesionales sanitarios. Véase la figura 3)

#### Realización 2

Un experimento de aplicación de colágeno y adhesivo de fibrina a una región defectuosa del cartílago de un conejo (objetivo: confirmar la regeneración del cartílago del conejo utilizando colágeno y adhesivo de fibrina).

- 20
- Una vez que se ha inducido un defecto del cartílago de 4 mm en la región del surco rotuliano de un conejo NZW, se aplican colágeno y adhesivo de fibrina a la región defectuosa y después, pasadas 4 semanas de la aplicación se realizan observaciones a simple vista y observaciones de histopatología (figuras 4 y 5). Se utilizan para el experimento, colágeno (Thera Fill de Sewoncellontech) y fibrina (Tisseel de Baxter).

Para la tinción en las observaciones de histopatología, se utilizan hematoxilina-eosina, safranina-O, azul alcian, tinción tricrómica de Masson, y colágeno tipo I/II.

- 25
- (Resultado: se confirmó por la observación a simple vista que los tejidos de la región defectuosa se restauran, y por la observación de histopatología se confirmó que los tejidos de la región defectuosa se regeneran como tejidos de cartílago)

Las propiedades físicas de la solución estabilizante que dependen de la concentración de cloruro de calcio se miden y se resumen como sigue:

- 30
- A. Medida del tiempo de gelificación y de las propiedades físicas según la concentración de cloruro de calcio en la solución estabilizante.

#### 1) Concentración de cloruro de calcio

	Concentración final (mg/mL)					
	0,26	0,20	0,10	0,05	0,01	0
Concentración de la solución estabilizante	4,4	3,38	1,69	0,845	0,169	0

#### 2) Método de aplicación

- 35
- Preparar una solución de colágeno (al 3 %, 3 cm<sup>3</sup>) y un adhesivo de fibrina (de Greenplast).
  - El fibrinógeno de Greenplast se mezcla con una aprotinina (1 cm<sup>3</sup>).
  - La trombina se mezcla con la solución estabilizante (1 cm<sup>3</sup>).
  - La solución de colágeno (3 cm<sup>3</sup>) se mezcla con la trombina (3 cm<sup>3</sup>) y con la solución estabilizante (0,4 cm<sup>3</sup>).
- 40
- Colocar la solución de fibrinógeno (1 cm<sup>3</sup>) y la solución de colágeno (1 cm<sup>3</sup>) en un kit dual y después poner la mezcla en un molde cilíndrico (Ø 12 X 15 mm) para preparar una materia sólida.
- 3) Concentración de cloruro de calcio / tiempo de gelificación y gelificación.

Concentración (mg/mL)	Tiempo de gelificación (min) / Gelificación				
	0,5	1	1,5	2	3
0,26	*	*	**	**	***
0,2	*	*	**	***	***
0,1	*	*	**	**	***
0,05	*	*	*	*	**
0,01	*	*	*	*	**
0	*	*	*	*	**

\*: incluye fase líquida

\*\* : en curso de gelificación

\*\*\*: gelificación terminada

Medida de las propiedades físicas que dependen de la concentración de cloruro de calcio

- 5
- Se utiliza el reómetro, CR-500DX, para medir las propiedades físicas del material sólido.
  - Elementos de medida: la tensión máxima, la resistencia del gel, y la resistencia a la tracción.
  - Distancia de entrada: 50 % de la altura de la muestra, 7,5 mm.
  - Velocidad: 50 mm/min, tensión máxima: 10 kg
  - Adaptador: No.1, 20 mm de diámetro

Concentración de cloruro de calcio (mg/mL) (concentración en el producto final)	Tensión máxima (Max 1)	Resistencia del gel	Resistencia a la tracción
	N	g.cm	g/cm
0,26	19,3	1212,9	2493,7
0,2	20,1	1246,6	2591,1
0,1	14,9	918,8	1920,3
0,05	6,1	303,1	789,9
0,01	6,9	366,7	888,6
0	5,4	281,6	691,1

10

Método de mezcla de colágeno y adhesivo de fibrina con la solución estabilizante en la región defectuosa del cartílago, y medida de las propiedades físicas, y confirmación de la degradabilidad (objetivo: se bloquea la nutrición cuando los cartílagos han sido dañados. Se añade medio de cultivo DMEM que se utiliza para cultivar células de cartílago para ayudar a la restauración del cartílago, y el producto que contiene colágeno mantiene la forma durante largo tiempo).

15

1) Preparación de una solución estabilizante que es un medio de cultivo DMEM que se utiliza para el cultivo de células de cartílago fortalecido con cloruro de calcio. El medio de cultivo DMEM contiene sales, aminoácidos y vitaminas. La solución estabilizante es una solución fortalecida con cloruro de calcio, y la concentración varía de 0,2 a 6 mg/mL.

20

2) La concentración de cloruro de calcio varía de 0,1 a 0,5 mg/mL en el uso final.

3) Este experimento se lleva a cabo como sigue.

- Preparar solución de colágeno (al 3 %, 3 cm<sup>3</sup>), y adhesivo de fibrina (Greenplast)
- El fibrinógeno de Greenplast se mezcla con una aprotinina (1 cm<sup>3</sup>).
- La trombina se mezcla con la solución estabilizante (1 cm<sup>3</sup>).

25

- La solución de colágeno (3 cm<sup>3</sup>) se mezcla con la trombina/solución estabilizante (0,4 cm<sup>3</sup>).
- El adhesivo de fibrina que no contiene colágeno se utiliza para un grupo de comparación.

- Colocar la solución de fibrinógeno ( $1 \text{ cm}^3$ ) y la solución de colágeno ( $1 \text{ cm}^3$ ) en un kit dual y después poner la mezcla en un molde cilíndrico ( $\varnothing 12 \times 15 \text{ mm}$ ) para preparar una materia sólida. La concentración final de cloruro de calcio es de  $0,26 \text{ mg/mL}$ .

4) Medida de las propiedades físicas

- 5
- Se utilizó un reómetro, CR-500DX, para medir las propiedades físicas del material sólido.
  - Elementos de medida: la tensión máxima, la fuerza de gel, y la resistencia a la tracción.
  - Distancia de entrada: 50 % de la altura de la muestra, 75 mm.
  - Velocidad: 50 mm/min, tensión máxima: 10 kg.
  - Adaptador: No.1,  $\varnothing 20 \text{ mm}$ .
- 10
- Los resultados son como sigue. Un material sólido que contiene colágeno muestra un color opaco similar al color del cartílago, y un producto de adhesivo de fibrina es un material sólido translúcido.

	Colágeno/solución estabilizante (la presente invención)	Producto de adhesivo de fibrina (técnica anterior)
Fotografías de gelificación (gelificación en 3 minutos)	Figura 6A	Figura 6B

5) Confirmación de la degradabilidad

- El material sólido se pone en el medio de cultivo (DMEM) y se observa durante un mes a 37 grados Celsius.
- 15
- El medio de cultivo se cambia todos los días o cada 2 días.
  - El producto de adhesivo de fibrina que no contiene colágeno se descompone en 2 a 3 semanas, pero el material sólido que contiene colágeno mantiene su forma más de un mes.

El siguiente es un experimento sobre la viabilidad celular de las células del cartílago en la composición de mezcla de colágeno y fibrinógeno.

- 20
- A) Preparación de una composición de colágeno y fibrinógeno que contiene células de cartílago.
- 1) El fibrinógeno en adhesivo de fibrina (Tisseel) se disuelve en una solución de aprotinina ( $2 \text{ cm}^3$ ).
  - 2) Se disuelve una trombina liofilizada en la solución estabilizante.
  - 3) Se mezcla una solución de colágeno (Thera Fill,  $3 \text{ cm}^3$ ) con la trombina/solución estabilizante ( $0,4 \text{ cm}^3$ ) utilizando un adaptador.
- 25
- 4) Se ponen  $1,5 \text{ cm}^3$  de la solución de mezcla de colágeno/trombina/solución estabilizante en una jeringa, y después se mezcla la solución con las células del cartílago ( $0,5 \text{ cm}^3$  ( $6,0 \times 10^6$  células/ $0,5 \text{ cm}^3$ )). La concentración final de cloruro de calcio es  $0,24 \text{ mg/mL}$ .
  - 5) Las mezclas 1) y 4) se colocan respectivamente, en un kit dual, y después se ponen en una placa de Petri de 100 mm.
- 30
- B) Experimento de confirmación de la viabilidad de las células de cartílago en la composición.
- 1) El producto de gel separado se transfiere a una placa de Petri de 35 mm, y se añaden 3 mL de medio de cultivo DMEM a la placa de Petri, y después se pone en marcha una incubación con  $\text{CO}_2$  a 37 grados Celsius.
  - 2) El medio de cultivo se cambia dos veces al día, y se incuba durante 3 días. La composición de medio de cultivo está compuesta de DMEM/F12, 1 % de gentamicina, 5 mg/mL de ITS + Premix, 50  $\mu\text{g/mL}$  de ácido ascórbico, piruvato de sodio 1 mM, y 100 ng/mL de BMP-2.
  - 3) Para el análisis se utiliza el método de calceína-AM.

Análisis de calceína-AM

- 40
- Método: Se prepara una solución de trabajo de la viabilidad celular, células vivas/células muertas, que contiene 10 mL de PBS, 5  $\mu\text{L}$  de calceína-AM 4 mM y 20  $\mu\text{L}$  de EthD-1 2 mM.

Se elimina el medio de cultivo de la composición de incubación, y después se añaden 3 mL de solución de trabajo de la viabilidad celular, células vivas/células muertas. Se incuba 1 hora a temperatura ambiente, y después se traslada a un portaobjetos de vidrio. Se observa en el microscopio de fluorescencia.

Las células vivas se tiñen de verde, y las células muertas se tiñen de rojo.

- 5 - Resultado: Fotografías del microscopio de fluorescencia de la viabilidad de las células del cartílago por análisis de calceína-AM.

Las fotografías del microscopio de fluorescencia se muestran en la figura 7A (inicial (40X)) y figura 7B (3 días de incubación (40X))

Después de 72 horas en la composición, la observación confirma que el 90 % de las células están vivas.

10

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de producción de una composición para la reparación del tejido cartilaginoso, que comprende las etapas de (a) disolver fibrinógeno liofilizado en una solución de aprotinina; (b) disolver trombina liofilizada en una solución estabilizante; (c) mezclar una solución de colágeno enriquecido con la trombina y la solución estabilizante; y
- 5 colocar la solución de fibrinógeno (a) en un lado de un kit dual y la solución (c) que contiene el colágeno en el otro lado y después mezclar (a) y (c), en donde el tiempo de gelificación después de mezclar (a) y (c) es de 3 minutos y la tensión máxima es superior a 10 N medida con un reómetro CR-500DX,
- 10 en donde la concentración de fibrinógeno varía de 35 a 55 mg/L, la concentración de solución de aprotinina es 1500 KIU/mL, la concentración de trombina es 29,41 IU/mL, la concentración de la solución estabilizante es 0,65 mg/mL, y la concentración de colágeno es 13,23 mg/mL,
- en donde la solución estabilizante se prepara por la adición de cloruro de calcio al medio de cultivo DMEM para cultivo de células de cartílago y el medio de cultivo DMEM comprende sales, aminoácidos y vitaminas.

FIG.1

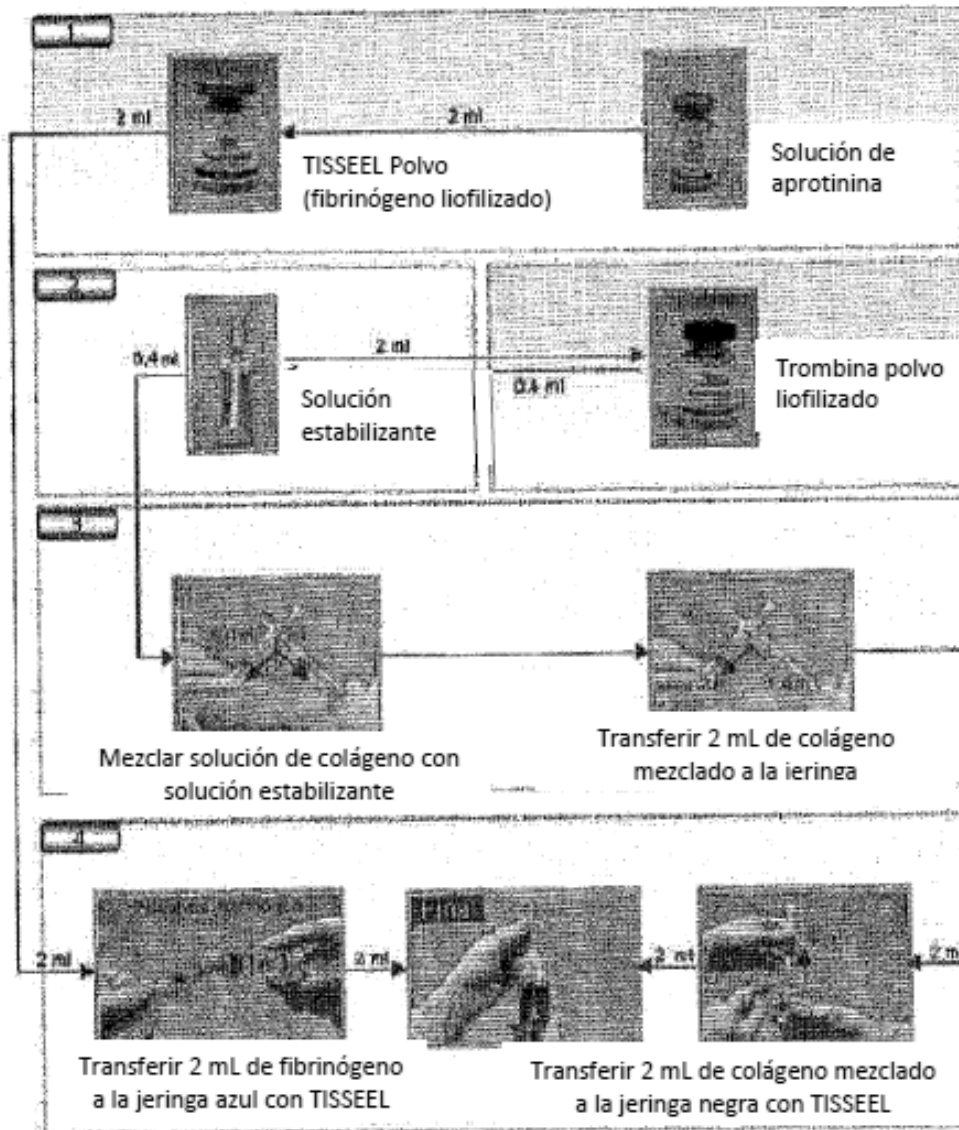


FIG.2



FIG. 3

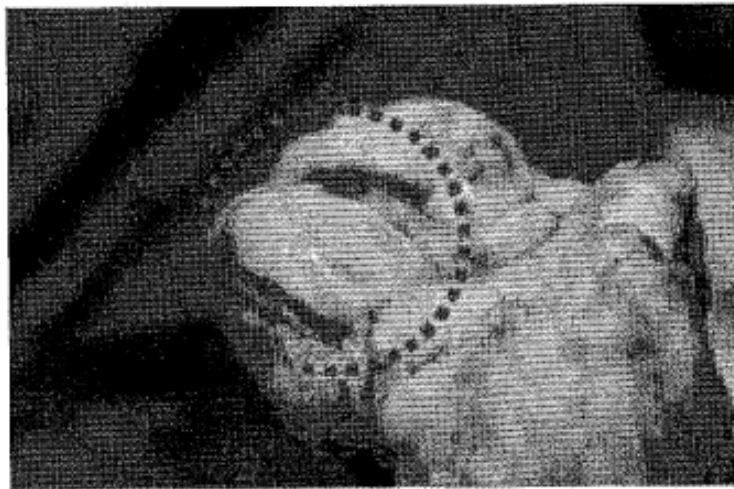


FIG. 4

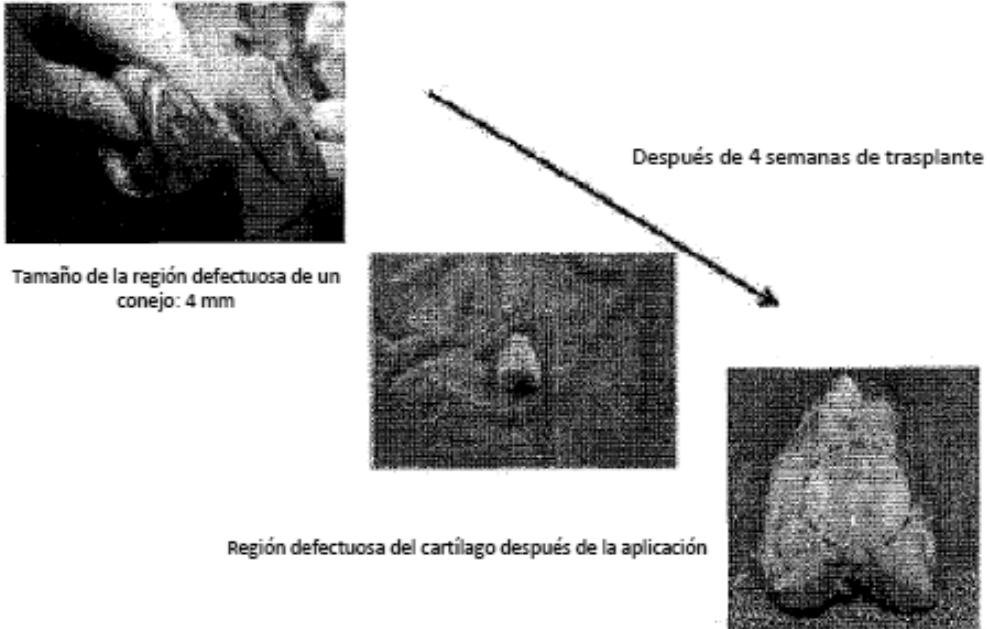
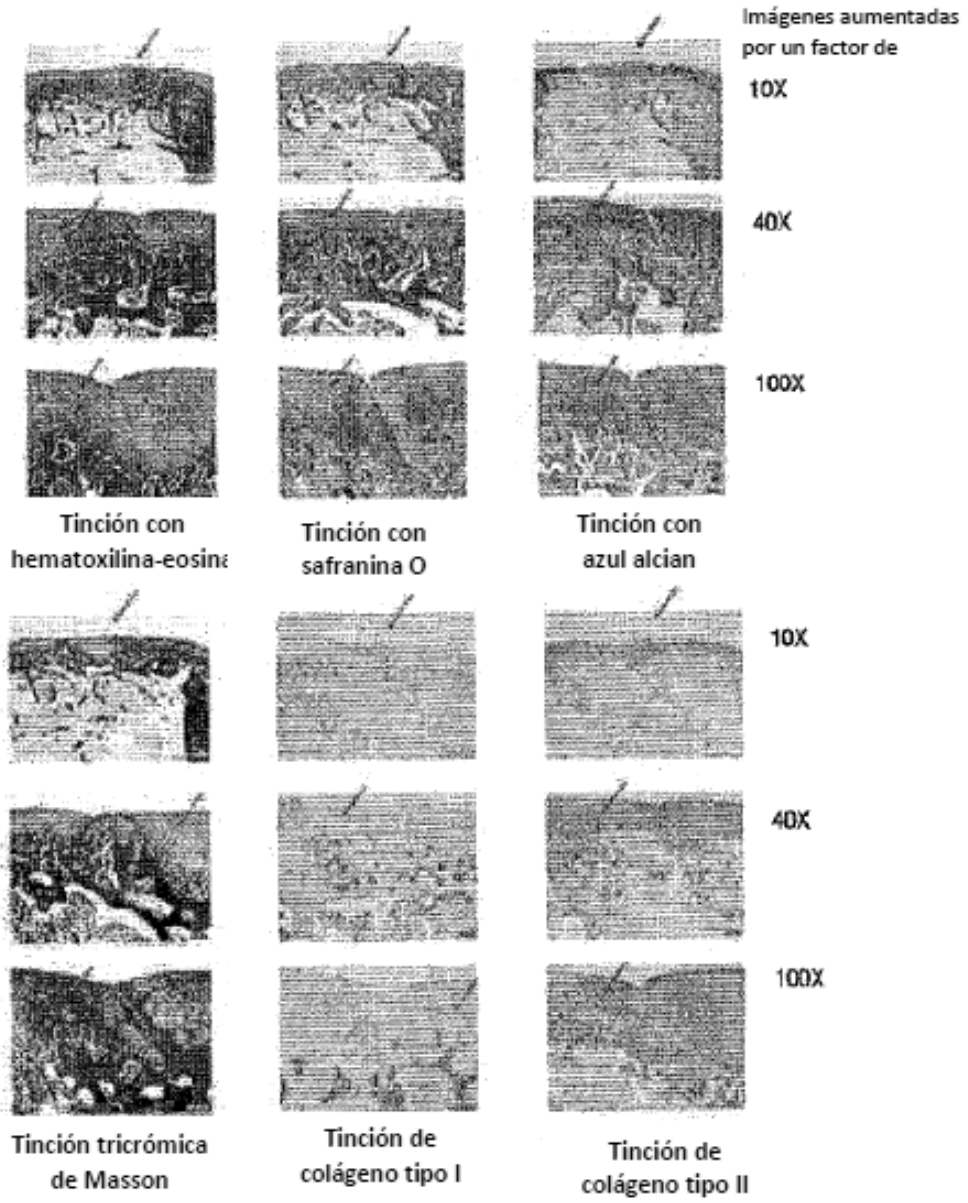


FIG. 5



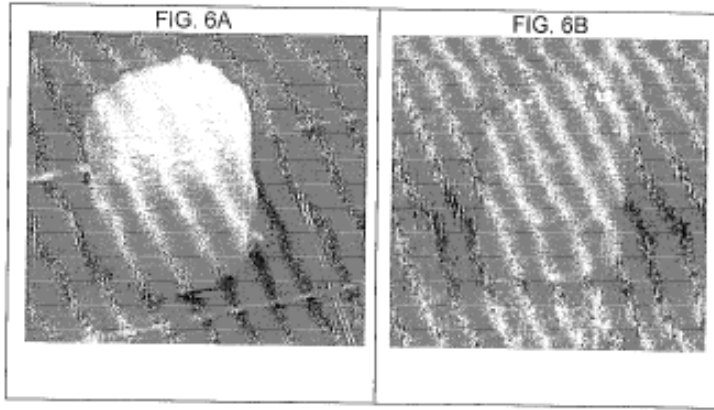


FIG. 7A

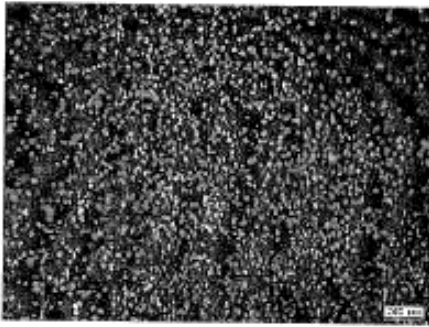


FIG. 7B

