



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 299 481**

(51) Int. Cl.:

**A61F 2/08** (2006.01)

**C12N 5/06** (2006.01)

**D02G 3/44** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01922531 .7**

(86) Fecha de presentación : **22.03.2001**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1272127**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **08.01.2003**

(54) Título: **Procedimientos para la producción de construcciones de reemplazo de ligamentos.**

(30) Prioridad: **24.03.2000 US 191999 P**

(73) Titular/es: **Drexel University  
32nd and Chestnut Streets  
Philadelphia, Pennsylvania 19104, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.06.2008**

(72) Inventor/es: **Laurencin, Cato, T.;  
Ko, Frank, K.;  
Cooper, James, A.;  
Lu, Helen, H. y  
Attawia, Mohamed A.**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.06.2008**

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Procedimientos para la producción de construcciones de reemplazo de ligamentos.

### 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la utilización de tecnología de fibras destinadas al diseño de matrices de utilidad en la ingeniería de tejidos. En particular, se proporciona una construcción de reemplazo viable del ligamento anterior cruzado humano (ACL).

10 Dicha construcción de reemplazo comprende un andamiaje trenzado tridimensional a base de fibras poliméricas poroso y degradable producido mediante la utilización de un procedimiento de trenzado textil industrial tridimensional, en el que el procedimiento de trenzado textil industrial tridimensional comprende un proceso de 4 etapas que utiliza un procedimiento de guiado y columna. Se espera que la biocompatibilidad de dicha construcción de reemplazo junto con el diseño basado en ingeniería de tejidos, promocione la cicatrización y la reparación del ACL dañado.

### 15 Antecedentes de la invención

20 En la reconstrucción ortopédica, los cirujanos frecuentemente reemplazan el tejido dañado por trauma, degeneración patológica, o deformidad congénita mediante un injerto autólogo [Langer, R. and Vacanti, J.P. *Science* 260:920 (1993)]. La cirugía reconstructiva se basa en el principio de reemplazar estos tipos de tejidos defectuosos por alternativas funcionales viables. El injerto de hueso en las reconstrucciones esqueléticas ha sido un práctica común de los cirujanos ortopédicos, con más de 863.200 procedimientos realizados anualmente en U.S. Para reemplazos de cartílago se realizan más de 1.000.000 de procedimientos de múltiples tipos cada año y para la reparación de ligamentos, se 25 producen aproximadamente 90.000 procedimientos anuales [Langer, R. and Vancanti, J.P. *Science* 260:920 (1993)]. En la actualidad, los autoinjertos [Friedman *et al.*, *Clin. Ortho.* 196:9 (1985); Jackson *et al.*, *Amer. J. Sports Med.* 18:1 (1990)] (tejido extraído del paciente) y los aloinjertos (Gadzag *et al.*, *J. Amer. Acad. Ortho. Surg.* 3:1 (1995); Shino *et al.*, *J. Bone, Joint Surg.* 7011:556 (1988); Jackson *et al.*, *Arthroscopy* 10:442 (1994)] (tejido extraído de un cadáver) son las fuentes de reemplazos más comunes para el tratamiento de los problemas músculo esqueléticos. En la 30 reparación de las heridas del ligamento anterior cruzado, se ha utilizado frecuentemente un fragmento del tendón de la patela [Jackson *et al.*, *Amer. J. Sports Med.* 18:1 (1990)]. Para la reparación del hueso y del cartílago el transplante de injertos antólogos es en la actualidad el tratamiento de elección.

35 Sin embargo, existen múltiples problemas asociados a estos tratamientos. Por ejemplo, para los tejidos antólogos, las limitaciones clave son la morbidez del lugar donante donde se daña el tejido remanente mediante la extracción del injerto y la cantidad limitada de tejido disponible para cosechar. La utilización de aloinjertos intenta solventar estos problemas. Sin embargo, este tipo de injerto generalmente es rechazado por el cuerpo huésped debido a la respuesta inmune al tejido. Los aloinjertos también pueden transmitir enfermedades. Aunque un procedimiento concienzudo de selección elimina la mayoría de los tejidos portadores de enfermedades, este procedimiento no es efectivo al 100%.

40 Como consecuencia de las limitaciones de los materiales convencionales para injertos reconstructivos, los cirujanos se han dirigido a las alternativas sintéticas.

45 Los injertos o soportes de ACL sintéticos comprenden fibras de carbono, ligamento Leeds-Keio (polietileneterftalato), la prótesis de Gore Tex (politetrafluoroetileno), la prótesis de ligamento Stryker-Dacron fabricada de cinta de Dacron envueltas en una manga de Dacron y el mecanismo de incremento del ligamento de Gore Tex (LAD) fabricado de polipropileno. Estos injertos han mostrado buenos resultados a corto plazo pero han tenido dificultades clínicas en los estudios a largo plazo. Las limitaciones de estos reemplazos sintéticos del ACL comprenden el estiramiento del material de reemplazo, la debilidad mecánica en comparación a la de la estructura original y la fragmentación debida 50 al uso del material de reemplazo.

El sustituto ideal del ACL es biodegradable, poroso, biocompatible, muestra suficiente resistencia mecánica y promociona la formación de material del ligamento.

55 Múltiples investigadores han dado a conocer construcciones potenciales de ACL que comprenden fibras de colágeno, polímeros biodegradables y compuestos de los mismos. Por ejemplo, se han descrito andamiajes de colágeno para la reconstrucción del ACL sembrados con fibroblastos del ACL y la piel [Dunn *et al.*, *The Tissue Engineering Approach to Ligament Reconstruction. Material Research Society Symposium Proceedings* 331:13-18 (1994), Boston, Materials Research Society; Bellincampi *et al.*, *J. Orthop. Res.* 16:414-420 (1998)]. La patente WO 95/2550 también da a conocer un mecanismo prostético destinado a la reparación de ligamentos que comprende una organización de hebras de colágeno.

60 Asimismo, se ha descrito un modelo de ligamento biológicamente diseñado, que difiere de otros modelos de ligamento por la adición a la estructura de fibroblastos del ACL, la ausencia de agentes entrelazantes y la utilización de tacos de hueso con el fin de anclar el tejido biodiseñado [Goulet *et al.*, *Tendons and Ligaments*. En R.P. Lanza, R. Langer and W.L. Chick (eds.), *Principles of Tissue Engineering*, págs. 639-645, R.G. Landes Company and Academic Press, Inc. 1997].

La patente US nº 5.376.118 da a conocer un material de soporte fabricado con una hebra compuesta semiabsorbible que comprende un núcleo de hebra elástica no absorbible y una funda de hebra relativamente inelástica absorbible.

La patente US nº 4.792.336 describe un mecanismo con un componente absorbible que comprende un enlace glicólico o de éster de ácido láctico. El dispositivo comprende una multiplicidad de fibras que comprenden el componente absorbible que se puede utilizar como una trenza plana en la reparación de un ligamento o tendón.

La patente WO 9745147 da a conocer un biomaterial reabsorbible para la implantación en seres humanos y otros animales que comprende fosfato de calcio cristalino o amorfo condensado de fórmula general:  $[Ca(PO_3)_2]_n$  en la que (n) es 3 o superior y la proporción molar Ca:P se encuentra comprendida entre 0,4 y 0,6.

La patente WO 9501810 describe una prótesis implantable que comprende un material de matriz sustancialmente bioreabsorbible, sintético, biocompatible sembrado con fibroblastos.

## 15 Sumario de la invención

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de fabricación de una construcción para reemplazar ligamentos, comprendiendo la construcción de reemplazo un andamiaje poroso trenzado tridimensional a base de fibras poliméricas formado mediante un procedimiento de trenzado textil tridimensional que comprende 20 un procedimiento en 4 etapas, caracterizado porque el procedimiento de trenzado textil tridimensional comprende un procedimiento de 4 etapas que utiliza un procedimiento de guiado y columna.

Según una forma de realización preferida, la construcción de reemplazo se siembra con células, cuyo crecimiento en esta está apoyado por el andamiaje. Preferentemente, las células son células del “anterior cruzado” del huésped.

25 Preferentemente, la construcción de reemplazo se configura para la implantación en un humano con el fin de reparar un ligamento dañado.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento destinado a producir un material de 30 injerto compuesto de células vivas en una matriz degradable que comprende:

(a) cosechar, hacer crecer y pasar células en cultivo de tejidos; y

35 (b) sembrar las células cultivadas en el andamiaje tridimensional trenzado degradable a base de fibras poliméricas descrito anteriormente.

## Descripción detallada de la invención

Cabe destacar que el alcance de protección es tal como se define en las reivindicaciones.

40 La presente invención se refiere a una estrategia destinada a la reparación de tejidos basada en el principio de utilizar andamiajes bioreabsorbibles que sirven de moldes en la regeneración de tejido. En particular, la presente invención se refiere a andamiajes degradables y, en particular, andamiajes trenzados tridimensionales (3-D) poliméricos a base de fibras.

45 Los andamiajes a base de fibras trenzadas de la presente invención se compararon con matrices de microfibras no urdidas para las aplicaciones de reemplazo de tejidos.

Se utilizó un procedimiento de electrohilado con el fin de fabricar matrices no urdidas de microfibras. El fundamento de este procedimiento es la generación de campo eléctrico entre una pantalla colectora y un fluido polimérico con cargas opuestas. Se añade una disolución de polímero a una jeringa de vidrio con una punta capilar. Se coloca un electrodo en la disolución con otra conexión a una pantalla colectora de cobre. A medida que se incrementa el voltaje, la disolución de polímero se carga y es atraída hacia la pantalla. Una vez que el voltaje alcanza el valor crítico, la carga supera la tensión superficial de las gotas y se produce un chorro de microfibra. Según se van esparciendo las 55 fibras cargadas, el disolvente se evapora rápidamente y las fibras se acumulan al azar sobre la superficie de la pantalla colectora. Esto resulta en una rejilla no urdida de fibras de escala micrométrica. El diámetro de las fibras y el grosor de la rejilla se pueden controlar mediante múltiples parámetros diferentes que comprenden la viscosidad de la disolución, el voltaje, la distancia entre la pantalla y la punta y la duración del electrohilado

60 Los andamiajes trenzados 3-D de la presente invención se formaron mediante un procedimiento de trenzado textil conocido como el procedimiento de 4-etapas que utiliza un procedimiento de guiado y columna con el fin de crear la matriz. El equipo de trenzado de 4-etapas comprende guías con un canal en los que colocan los transportadores de las bobinas de hilo. El movimiento de las bobinas y transportadores en las guías se utiliza con el fin de crear columnas verticales en la estructura 3-D. Las filas y columnas alternativas de transportadores en el enrejado de trenzar se desplazan con el fin de crear la trenza 3-D. Los parámetros geométricos que determinan la forma y la arquitectura de las trenzas 3-D comprenden la distribución del ángulo de trenzado, la fracción de volumen de hebra, número de transportadores y el grosor de la hebra de trenzado. Este sistema muy versátil permite la formación de una multiplicidad de trenzas 3-D con diferentes arquitecturas y propiedades mecánicas.

## ES 2 299 481 T3

Basándose en estas tecnologías de fibra, se fabricó una rejilla de microfibras no urdidas y dos trenzas 3-D rectangulares para experimentos de cultivo celular.

En estos experimentos, se comparó la respuesta de las células a la estructura jerárquica de las dos matrices a base de fibras. En particular, se valoró la capacidad de estas matrices para servir como andamiajes celulares utilizando osteoblastos y fibroblastos en un ambiente *in vitro*.

Primero se realizó microscopía electrónica de las tres estructuras de matriz. Las imágenes de baja ampliación mostraron la estructura básica y la organización de la matriz. El análisis por SEM de la matriz de microfibras mostró una estructura fibrosa muy porosa resultante de la disposición al azar de las fibras. El diámetro de las fibras de PLAGA [50:50] osciló en diámetro entre aproximadamente 2 y 7  $\mu\text{m}$ . Las imágenes de las matrices 3-D trenzadas mostraron una estructura fibrosa muy organizada resultante del procedimiento de trenzado 3-D. La diferencia entre el número de fibras/hebra fue claramente evidente en estas dos estructuras. La Trenza #1 que se fabricó a partir de hebra 30 con 30 fibras/hebra tuvo más trenzas individuales a través de la estructura que la matriz de Trenza #2 fabricada de hebra 60 con 60 fibras/hebra. Estas estructuras se pueden atribuir a la densidad de empaquetamiento de las fibras. Con la mitad de las fibras por hebra, la hebra 30 de la Trenza #1 fue capaz de empaquetarse en una estructura más compacta con una celda unitaria de trenza menor que la de la matriz de hebra 60. La evaluación mediante SEM de estas estructuras indicó que todas las matrices poseían las características estructurales necesarias para funcionar como andamiajes celulares.

Sin embargo, los resultados de los estudios *in vitro* revelaron que la respuesta celular dependió de la estructura de la matriz. Tanto los fibroblastos como los osteoblastos tuvieron la misma morfología en la matriz no urdida de microfibras. Después de un día en cultivo en la matriz de microfibras, las células tuvieron apariencia de huso y mostraron espaciamiento sobre la superficie. Se pudieron observar pequeñas proyecciones citoplasmáticas que se extendían del cuerpo de las células hacia la superficie de las matrices. Sin embargo, el SEM no reveló una estructura de microfibras en ninguna de las muestras, independientemente del punto temporal. Debido a que solamente se sembraron 50.000 células en una matriz de 1  $\text{cm}^2$ , se cree que las células se habían dispersado por completo sobre la superficie oscureciendo la estructura de microfibras. La morfología de huso observada en el día 1 es indicativa de una adhesión inicial y no de la formación de monocapas celulares.

Se realizó también un estudio de degradación con el fin de valorar todo cambio en la estructura de la matriz debido a la degradación en el medio de cultivo de tejidos. Este estudio reveló que la matriz se degradó rápidamente mientras estuvo en el medio de cultivo celular. Se cree que la exposición al DMEM produjo la hinchazón y la degradación de las microfibras. La hinchazón fue tan significativa en algunas de las muestras que la estructura perdió casi toda la porosidad. De este modo, esta degradación cambió la matriz de una matriz de microfibras porosa a una masa polimérica no porosa durante el transcurso del estudio de cultivo celular.

Contrariamente a la matriz de microfibras, la morfología celular en la trenza 3-D difirió entre los osteoblastos y los fibroblastos. Durante el transcurso del experimento de 2 semanas, los dos tipos de células siguieron la secuencia de eventos característica que describe la adhesión de las células, dispersión y proliferación. Sin embargo, la velocidad a la que estos eventos tuvieron lugar difirió entre los osteoblastos y los fibroblastos. Además, la adhesión celular pareció ser más pronunciada con los osteoblastos que con los fibroblastos. Por ejemplo, después de un día de cultivo celular sobre la Trenza #1 3-D, los osteoblastos mostraron un estiramiento significativo sobre la superficie y la formación de una monocapa celular. En comparación, en el día 1, los fibroblastos todavía retenían la morfología en forma de huso característica de la adhesión inicial. Además, los fibroblastos se organizaron a lo largo de las fibras. Las células tenían la apariencia de haberse agrupado a lo largo del canal creado entre dos fibras adyacentes. Se observaron ligeras extensiones citoplasmáticas entre las células alineadas.

De este modo, tal como demostró la respuesta celular observada en los presentes experimentos, la estructura jerárquica tiene una función importante en la morfología y organización celular. Las células respondieron dinámicamente a la estructura cambiante de la matriz en rápida degradación que comprende las microfibras no urdidas. Las células no se organizaron en tal estructura y la morfología de los tipos celulares específicos fue similar. Por el contrario, en las estructuras lentamente degradables de la trenza 3-D, los fibroblastos se organizaron a lo largo de las fibras y los osteoblastos mostraron una morfología claramente diferente a la de los fibroblastos.

En consecuencia, la utilización de la tecnología de fibras en la ingeniería de tejidos tiene múltiples ventajas sobre un multiplicidad de estructuras 3-D no fibrosas. Es importante la capacidad de impartir una elevada organización estructural a la matriz permite un control preciso de la estructura de la matriz. Las matrices 3-D urdidas y no urdidas son ejemplares del rango de arquitecturas de fibras 3-D que se pueden diseñar y producir. Las matrices trenzadas comprenden hebras de PLAGA altamente organizadas urdidas en una estructura 3-D. Aunque la matriz no urdida fue el resultado de microfibras orientadas al azar, la estructura fue muy uniforme. Así, tanto el procedimiento de trenzado 3-D en 4-etapas y el procedimiento de electrohilado son procedimientos de fabricación de utilidad que muestran un elevado nivel de versatilidad para múltiples aplicaciones de ingeniería de tejidos. La capacidad de fabricar una multiplicidad de matrices diferentes y de mantener un control preciso sobre la fabricación de las matrices son factores extremadamente importantes en el diseño de un andamiaje para la ingeniería de tejidos.

Por ejemplo, la rodilla humana comprende ligamentos grandes tales como el ligamento anterior cruzado (ACL) que conecta el fémur a la tibia y participa en el control del movimiento, actuando como estabilizador del movimiento de la articulación. El ACL es el ligamento de la rodilla más comúnmente reemplazado, con cerca de 250.000 pacientes

## ES 2 299 481 T3

cada año diagnosticados con heridas del ACL. Este tipo de herida ocurre generalmente en los deportes y durante el ejercicio físico y frecuentemente produce la invalidez que puede ser permanente e incapacitante para el paciente.

- Se cree que los andamiajes 3-D trenzados sería particularmente útil como construcción de reemplazo de ligamentos tales como el ligamento ACL de la rodilla humana ya que tales andamiajes son degradables, porosos, biocompatibles, muestran suficiente resistencia y promocionan la formación de tejido de ligamento. El diseño del andamiaje a base de fibras imita al ligamento natural y la estructura trenzada ofrece resistencia mecánica así como la necesaria porosidad para la adhesión celular y penetración. Mientras que las fibras de PLAGA se utilizaron en los andamiajes trenzados de los experimentos descritos en la presente memoria, se puede utilizar una fibra cualquiera polimérica degradable a base de polihidroxíésteres que comprenda, aunque sin que ello sea limitante, poliláctico, poliglicólico, y sus copolímeros.

Con el fin de auxiliar en la selección de las fibras de polímeros que se pueden utilizar en el trenzado de las construcciones 3-D para los reemplazos del ACL, se examinaron las características de degradación de los tres tipos de haces de fibras de polímero y el efecto de la degradación en las propiedades mecánicas a largo plazo. Los tres polímeros examinados fueron fibras de multifilamento de L-poli-láctido (PLA, 70 denier), poli-glicólido (PGA, 60 denier) y su copolímero 82:18 (PLAGA, 70 denier) trenzados en 10 haces de múltiples fibras. La retención de masa y las propiedades mecánicas de todos los polímeros decrecieron con el incremento del tiempo de inmersión tanto en tampón fosfato disolución salina (PBS) y medio de cultivo celular ( $\alpha$ MEM). Sin embargo, los haces de PGA mostraron la pérdida más rápida de fuerza masa e integridad de las hebras, y este polímero se había degradado extensamente después de 2 semanas y se deshizo en pequeñas fibras.

Los haces de PLA y PLAGA se degradaron más lentamente tal como reflejaron las disminuciones en su fuerza mecánica, retención de masa y peso molecular. Después de 4 semanas, el PLA aguantó una carga tensil máxima superior que el PLAGA. Se encontró que la retención de masa del polímero fue independiente de los cambios en la fuerza mecánica y peso molecular.

El peso molecular del PLAGA se redujo a la mitad de su valor original después de dos semanas de inmersión en  $\alpha$ MEM, lo que puede ser demasiado rápido para que tenga lugar la cicatrización de los ligamentos.

A medida que se degradaron los polímeros, el pH del PBS disminuyó a medias que se liberaron productos ácidos de degradación. Aunque inicialmente se midió una disminución en el pH del  $\alpha$ MEM, la disolución volvió posteriormente a los valores control. Esto es posiblemente debido a la absorción de proteínas y la mayor capacidad de tampón del  $\alpha$ MEM, lo que lo hace una disolución más realista en la que modelar la degradación de polímeros *in vivo*.

Así, con base en el examen de los cambios en el peso molecular, fuerza mecánica y retención de masa a medida que se degradaba el polímero, PLA (en comparación a PLAGA 82:18 o PGA) tiene ventajas específicas para la utilización en construcciones 3-D de reemplazo del ACL de diseño tisular de la presente invención. Debido a su degradación acelerada y a la pérdida de propiedades mecánicas, el PGA por si solo puede no ser adecuado para el reemplazo del ACL.

Se pueden utilizar ensayos mecánicos con el fin de caracterizar la relación fuerza-tensión de las construcciones fibrosas 3-D. Se cree que se puede dar una relación fuerza-tensión similar a la del ACL del conejo mediante un diseño jerárquico utilizando trenzado 3-D de un andamiaje absorbible a base de fibras. En consecuencia, se puede crear una estructura para modelar un ligamento de conejo. Este ligamento sintético debe tener una longitud de 1 cm. Es preferible realizar los ensayos mecánicos con un número de muestras de por lo menos 6 para cada ensayo particular.

Los ensayos de tensión se realizan preferentemente a velocidades de tensión de 0,01%/s, 2,2%/s y 50%/s ya que ello ayuda a determinar si el material es dependiente de la velocidad de tensión. Es preferible que se ensaye un tamaño de muestra de 18 tal como sugiere la Food and Drug Administration (Guidance Document for the Preparation of Investigational Device Exemptions and Premarket Approval Applications for Intra Articular Prosthetic Knee Ligament Devices, 1987).

La construcción trenzada puede comprender tres zonas, con dos secciones extremas designadas a la unión de la construcción al fémur y la tibia y la zona intermedia que sirve de reemplazo del ACL. En este ejemplo, la zona intermedia difiere de las dos zonas de los extremos en tamaño, ángulo de trenzado, porosidad y fuerza mecánica. La longitud y anchura de la construcción de reemplazo se puede hacer a medida según se necesite.

Para la reparación y reconstrucción del ACL, los andamiajes 3-D trenzados se siembran con células del ACL del huésped. Primero se cosechan las células del ACL del huésped, se crecen y se pasan en cultivos de tejidos. A continuación se siembran las células cultivadas en los andamiajes trenzados 3-D con el fin de producir un material de injerto compuesto de células vivas y matriz degradable. Este material de injerto se puede implantar quirúrgicamente en un paciente en el lugar de la herida del ligamento con el fin de promocionar la cicatrización y reparación del ACL dañado. Las ventajas adicionales de la estructura trenzada comprenden su mayor facilidad de implantación en comparación con las construcciones de la técnica anterior preparadas a partir de haces de fibras.

Se examinaron parámetros de diseño tales como la composición del polímero y la respuesta a las células primarias del ACL a las construcciones 3-D trenzadas. La fibronectina (FN), una de las proteínas extracelulares de adhesión

# ES 2 299 481 T3

más abundantes que se encuentran en el cuerpo, se cree que está positivamente regulada durante la formación de ligamentos. En consecuencia, en los presentes experimentos las construcciones se recubrieron previamente con FN con el fin de incrementar la adhesión celular inicial. Se examinó la adhesión y el crecimiento de células del ACL en tres tipos de polímeros degradables con múltiples porosidades.

5 La porosidad de los andamiajes estuvo comprendida entre el 54% y el 63%, teniendo las estructuras de PLA una porosidad comprendida entre el  $53,5 \pm 6,9\%$ , teniendo PGA una porosidad de  $63,3 \pm 7,3\%$  y las construcciones de PLAGA una porosidad media de  $62,9 \pm 3,6\%$ . El diámetro medio de poro fue semejante entre las construcciones de PLAGA y PLA ( $235$  a  $250 \mu\text{m}$ ), pero el menor fue el del PGA ( $177 \mu\text{m}$ ).

10 Las células primarias semejantes a las de ACL muestran una morfología semi ovoide, semejante a la de los fibroblastos y cuando están confluentes, forman cultivos multinucleados con direcciones de crecimiento específicas. El crecimiento celular y la morfología dependió del la composición del polímero y de la porosidad. Se observaron extensas láminas de células en los tres tipos de polímeros, pero la morfología y la dispersión de las células fueron 15 diferentes entre los andamiajes de PLAGA y PLA. La dispersión de las células fue menor en PLAGA, mientras que la superficie tanto en PGA como en PLA fue más suave y tuvo menos haces celulares. El crecimiento celular cuantitativo ( $n = 4$ ) también reveló números de células superiores en PLAGA y PLA, cuando se comparó con PGA. El recubrimiento previo de las construcciones con fibronectina produjo un incremento en la proliferación, tal como se refleja en una disminución más rápida del pH de la disolución en comparación con las construcciones no recubiertas 20 y con los controles sin células o fibronectina. Es posible que la fibronectina incremente el número inicial de células adheridas a la construcción y en consecuencia incremente el crecimiento celular y el metabolismo en los cultivos a largo plazo. Así, la respuesta celular del ACL dependió de la composición del polímero y de la porosidad. Además, el recubrimiento previo de las construcciones con fibronectina incrementó la adhesión de las células y el crecimiento en estos andamiajes.

25 Los siguientes ejemplos no limitantes se proporcionan con el fin de ilustrar todavía más la presente invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### *Matrices de microfibra*

30 Se utilizó un procedimiento de electrohilado con el fin de producir andamiajes de fibras biodegradables no urdidas con un grosor aproximado de  $0,5 \text{ mm}$ . En este proceso, se disolvió PLAGA (50:50) en cloruro de metileno con el fin de producir una disolución con una proporción peso:volumen de 1:4. En el proceso de electrohilado, se aplicó un potencial eléctrico de  $20 \text{ kV}$  entre la disolución de polímero y la pantalla colectora con el fin de crear un campo eléctrico. A continuación se roció la disolución de polímero sobre la pantalla colectora durante 30 minutos. Esto 35 produjo una matriz uniforme de microfibra no urdida adherida a la pantalla. Se extrajo la matriz, y se cortó en piezas de  $1 \text{ cm}^2$ .

### Ejemplo 2

#### *Trenza tridimensional de fibra*

40 Las matrices tridimensionales fibrosas se fabricaron utilizando un procedimiento de trenzado 3-D tal como se describe en Ko, F.K. en Textile Structural Composites, eds. Chou, T.W. and Ko, F.K. (Elsevier, Amsterdam, 1989). En este proceso, la fibra de PLAGA (5:95 PLAGA) se trenzó con el fin de producir hebras con una densidad de fibra de 30 y 60 fibras por hebra. A continuación las hebras se colocaron en un telar construido a medida con una disposición de 6 45 por 12 transportadores. El movimiento secuencial del transportador (alternando filas y columnas) produjo la formación de dos trenzas 3-D rectangulares: una trenza de 30 hebras (Trenza #1) y una trenza de 60 hebras (Trenza #2).

### Ejemplo 3

#### *Cultivo de células in vitro*

50 Se evaluaron las matrices en un estudio de 2 semanas de cultivo celular utilizando fibroblastos y cultivos primarios de osteoblastos. Todas las matrices se esterilizaron con UV durante 24 horas por cada lado antes del cultivo celular. Los cultivos primarios de osteoblastos aislados de la calvaria de ratas neonatas se crecieron a confluencia en medio de Ham F-12 (GIBCO), suplementado con 12% suero bovino fetal [FBS] (Sigma), tal como describe Jarcho, M. [*Clin. Ortho.* 157:259 (1981)]. Los fibroblastos de ratón (BALB/C C7, adquiridos de ATCC: Arlington Virginia) se crecieron a confluencia en DMEM suplementado con 10% FBS. Se sembraron las células en matrices esterilizadas mediante UV a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/matríz. Las células se cultivaron en las matrices durante 1, 3, 7, 10 y 14 dfas y se mantuvieron en DMEM (10% FBS). A los múltiples puntos de tiempo las células se fijaron con glutaraldehído y se deshidrataron mediante una serie de diluciones de etanol. Las muestras para la microscopía electrónica de rastreo (SEM) se recubrieron con oro mediante rociado (Denton Desk-1 Sputter Coater). La matriz y la estructura celular se visualizaron mediante SEM (Amray 3000) a un voltaje acelerador de 20 kV.

## ES 2 299 481 T3

### Ejemplo 4

#### *Propiedades de degradación de los múltiples polímeros*

- 5 Se trenzaron en 10 haces de multifibras de fibras multifilamento de L-poli-láctido (PLA, 70 denier), poli-glicólido (PGA, 60 denier) y su co-polímero 82:18 (PLAGA, 70 denier) con el fin de utilizarlas en estudios de degradación. Los haces se cortaron a una longitud de 6 cm y se esterilizaron con alcohol al 70% seguido irradiación UV. Los haces de polímero se mojaron en 10 ml disolución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,3) y en 10 ml de medio de cultivo celular ( $\alpha$ MEM, pH = 7,3) suplementado con 10% suero bovino fetal, L-glutamina y 1% antibióticos. Las muestras  
10 se agitaron y se mantuvieron a 37°C en un baño de agua durante 3 semanas. Las proporciones de inmersión para las dos disoluciones fueron las siguientes, PLA a 0,6 mg/ml, PLAGA a 0,8 mg/ml y PGA a 0,7 mg/ml. Las disoluciones se cambiaron cada semana a 1, 2, 3 y 4 semanas, el pH (n = 8) se midió y se cuantificó la cantidad de monómero en disolución mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC).
- 15 A las 2 y 4 semanas de la inmersión, se determinó el peso molecular, la retención de masa y las propiedades mecánicas de los haces (n = 5). Los cambios morfológicos relacionados con la degradación se examinaron utilizando microscopía electrónica de barrido. Para las mediciones de retención de masa los haces se enjuagaron y liofilizaron durante 24 horas. Se registró el peso seco (n = 4) y se utilizaron las mismas muestras con el fin de determinar los pesos moleculares (MW). Los pesos moleculares (n = 3) para PLA y PLAGA (82:18) se midieron mediante cromatografía  
20 de exclusión en tetrahidrofurano, utilizando estándares de poliestireno. Las propiedades mecánicas de la hebra bajo tensión se ensayaron en un instrumento Instron (Modelo 4442, Instron Inc., MA), utilizando una celda de carga de 500 N (longitud de calibre = 3 cm), a una velocidad de tensión de 2% por segundo.

### Ejemplo 5

- 25 *Efecto de la construcción de polímero sobre la morfología y el crecimiento de las células del ligamento anterior cruzado*

30 Los andamiajes fibrosos se fabricaron utilizando el procedimiento de trenzado 3-D descrito en el Ejemplo 2. Se trenzaron fibras de L-poliláctido (PLA, 70 deniers), poliglicólido (PGA 60 deniers) y poli-láctido-co-glicólido 82:18 (PLAGA, 70 deniers) en 10 haces de fibra/hebra y a continuación se trenzaron estas hebras utilizando una máquina de trenzar circular 3-D. Las trenzas 3-D circulares de 24 hebras se formaron y se cortaron en longitudes de 1,5 cm para los experimentos presentes. Se produjeron construcciones de Dacron de modo semejante y se utilizaron como controles.

35 La porosidad, el diámetro de poro y el área total de poro de las construcciones se determinó mediante la utilización de un porosímetro Autopore III (Micromimetics). Se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para confirmar la distribución de poro y examinar la geometría de poro. Las muestras se esterilizaron con UV antes del cultivo. Cada una de las construcciones se recubrió con fibronectina humana reconstituida (10  $\mu$ g/ml) durante 30 minutos.

40 Las células primarias de ACL se aislaron de 1 kg de conejos blancos New Zealand. El ACL aislado se digirió utilizando una disolución de 0,1% colagenasa y solamente se seleccionaron para el estudio las células recogidas de la cuarta digestión. Las células se cultivaron en  $\alpha$ MEM + 10% suero bovino fetal, L-glutamina y 1% antibióticos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células de ACL se sembraron en los andamiajes a una densidad de 80.000 células/andamiaje y se crecieron durante hasta 28 días. Plástico de cultivo de tejidos y Dacron sirvieron de grupos control. El medio se intercambió cada dos días y para cada punto de tiempo se midió el pH. El crecimiento celular se midió utilizando el ensayo Cell-titer 96. Se hicieron imágenes de la morfología celular y el crecimiento en los andamiajes mediante SEM.

50

55

60

65

# ES 2 299 481 T3

## REIVINDICACIONES

- 5        1. Procedimiento de fabricación de una construcción de reemplazo para ligamentos, comprendiendo la construcción de reemplazo un andamiaje trenzado tridimensional a base de fibras poliméricas, poroso, degradable, que se forma utilizando una técnica de trenzado textil tridimensional, **caracterizado** porque la técnica de trenzado textil tridimensional comprende un procedimiento de 4 etapas que utiliza un procedimiento de guiado y columna.
- 10      2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la construcción de reemplazo se siembra con células, el crecimiento de las cuales dentro del mismo está soportado por el andamiaje.
- 15      3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que las células son células del anterior cruzado del huésped.
- 20      4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 configurado para una implantación en un ser humano con el fin de reparar un ligamento dañado.
- 25      5. Procedimiento de producción de un material de injerto que comprende células vivas en una matriz degradable que comprende:
  - (a) cosechar, hacer crecer y pasar células en un cultivo de tejidos; y
  - (b) sembrar las células cultivadas en un andamiaje trenzado tridimensional polimérico degradable a base de fibras fabricado según el procedimiento de la reivindicación 1.

25

30

35

40

45

50

55

60

65