



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 325 206**

51 Int. Cl.:
A61F 2/30 (2006.01)
A61L 27/00 (2006.01)
A61B 17/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03023272 .2**
96 Fecha de presentación : **29.08.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **1384452**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.01.2004**

54 Título: **Método para la provisión de un kit para trasplante autógeno.**

30 Prioridad: **30.08.1996 US 704891**
15.05.1997 US 857090

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.08.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.08.2009

73 Titular/es: **Verigen AG.**
Siemensstrasse 5b
63263 Neu-Isenburg, DE

72 Inventor/es: **Vibe-Hansen, Henrik;**
Lundsgaard, Charlotte;
Idouraine, Ahmed y
Osther, Kurt B.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 325 206 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

Método para la provisión de un kit para trasplante autógeno.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo del trasplante de condrocitos, injerto de hueso y cartílago, curación, reparación de articulaciones y la prevención de patologías artríticas. En particular métodos para el autotrasplante de células al sitio preparado de injerto. La técnica anterior más próxima es la patente internacional WO 96/24310 A, que define el preámbulo de la reivindicación 1.

Fundamentos de la invención

Cada año se realizan en los Estados Unidos más de 500.000 procesos artroplásticos y artroplastias totales. En Europa se realiza aproximadamente el mismo número de procedimientos similares. En estas cifras se incluyen aproximadamente 90.000 artroplastias totales de rodilla y alrededor de 50.000 procedimientos para la reparación de defectos en la rodilla al año en Europa. El número de procedimientos es esencialmente el mismo en los EE.UU. (En Praemer A., Furner S., Rice, D. P., *Musculoskeletal conditions in the United States*, American Academy of Orthopaedic Surgeons, Park Ridge, IL, 1.992, 125). Lo más útil sería un método para la regeneración-tratamiento de cartílago y se podía realizar en una fase más temprana de la lesión de la articulación, reduciéndose así el número de pacientes con necesidad de cirugía para la implantación de una prótesis articular. Con tales métodos de tratamiento preventivo, también disminuiría el número de pacientes que desarrollaría artrosis.

Las técnicas usadas para reparar la superficie de la estructura del cartílago en articulaciones han intentado principalmente inducir la reparación del cartílago usando perforación subcondral, abrasión y otros métodos por los que hay escisión del cartílago enfermo y hueso subcondral, dejando expuesto hueso esponjoso vascularizado (Insall, J., *Clin. Orthop.* 1.974, 101, 61; Fiscal R. P. *et al.*, *Clin. Orthop.*, 1.979, 144, 74; Johnson L. L.; En: *Operative Arthroscopy*, McGinty J. B., Ed., Raven Press, Nueva York, 1.991, 341).

Coon y Cahn (*Science* 1.966, 153, 1.116) describieron una técnica para el cultivo de cartílago sintetizando células de somitas embrionarios de pollo. Más tarde Cahn y Lasher (*PNAS EE.UU.*, 1.967, 58, 1.131) usaron el sistema para el análisis de la afectación de la síntesis de ADN como condición previa para la diferenciación del cartílago. Los condrocitos responden tanto a EFG como a FGF por crecimiento (Gospodarowicz y Mescher, *J. Cell Physiology* 1.977, 93, 117), pero por último perdieron su función diferenciada (Benya *et al.*, *Cell* 1.978, 15, 1.313). Se describieron métodos para cultivar condrocitos y se están usando principalmente con ajustes de poca importancia por Brittberg, M. *et al.*, (*New Engl. J. Med.* 1.994, 331, 889). Se usaron células cultivadas usando estos métodos, como autotrasplante en articulaciones de rodilla de pacientes. Adicionalmente, Kolettas *et al.* (*J. Cell Science* 1.995, 108, 1.991) examinaron la expresión de moléculas específicas del cartílago tales como colágeno y proteoglicanos en cultivo celular prolongado. Encontraron que a pesar de cambios morfológicos durante el cultivo en cultivos monocapa (Aulthouse, A. *et al.*, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 1.989, 25, 659; Archer, C. *et al.*, *J. Cell Sci.* 1.990, 97, 361; Hänselmann, H. *et al.*, *J. Cell. Sci.* 1.994, 107, 17; Bonaventure, J. *et al.*, *Exp. Cell Res.* 1.994, 212, 97), cuando se compara con cultivos de suspensión cultivados en geles de agarosa, perlas de alginato o como cultivos rotativos (que conservan una morfología celular redonda) ensayados por diversos científicos, no cambiaron los marcadores expresados de los condrocitos tales como los colágenos de los tipos II y IX y no cambiaron los proteoglicanos de gran agregación, agreganos, versicanos y proteína de enlace (Kolettas, E. *et al.*, *J. Cell Science* 1.995, 108, 1.991).

Los condrocitos articulares son células derivadas mesenquimatosas, especializadas, encontradas exclusivamente en el cartílago. El cartílago es un tejido avascular cuyas propiedades físicas dependen de la matriz extracelular producida por los condrocitos.

Durante la osificación endocondial los condrocitos experimentan una maduración que conduce a hipertrofia celular, caracterizada por el comienzo de la expresión de colágeno de tipo X (Upholt, W. B., y Olsen, R. R., En: *Cartilage Molecular Aspects* (Eds. Hall, B & Newman, S.) CRC Boca Raton 1.991, 43; Reichenberger E. *et al.*, *Dev. Biol.* 1.991, 148, 562; Kirsch, T. *et al.*, *Differentiation*, 1.992, 52, 89; Stephens, M. *et al.*, *J. Cell Sci.* 1.993, 103, 1.111).

La degradación excesiva de colágeno de tipo II en las capas externas o superficies articulares de articulaciones también está causada por la artrosis. La red de colágeno está de acuerdo con esto debilitada y desarrolla con posterioridad fibrilación, por lo que se pierden sustancias de matriz tales como los proteoglicanos y finalmente son totalmente desplazadas. Tal fibrilación de cartílago con artrosis, debilitado, puede llegar hasta el cartílago calcificado y al hueso subcondral (Kempson, G. E. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1.976, 428, 741; Roth, V. y Mow, V. C., *J. Bone Joint Surgery*, 1.980, 62A, 1.102; Woo, S. L.,-Y. *et al.*, en *Handbook of Bioengineering* (autores. R. Skalak y S. Chien), McGraw-Hill, Nueva York. 1.987, págs. 4.1-4.44).

Se pueden encontrar descripciones del desarrollo básico, histología y anatomía microscópica de hueso, cartílago y otros tejidos conjuntivos, por ejemplo en Wheeler, Burkitt y Daniels, *Functional Histology*, 2ª Edición, (Churchill Livingstone, Londres, 1.987, Cap., 4). Se pueden encontrar descripciones de la histología básica de los defectos en el hueso, cartílago y otro tejido conjuntivo, por ejemplo, en Wheeler, Burkitt, Stevens y Lowe, *Basic Histopathology*, (Churchill Livingstone, Londres, 1.985, Cap. 21).

A pesar de las ventajas de cultivar condrocitos y manipular hueso y cartílago, no ha habido mucho éxito con los intentos para trasplantar cartílago o condrocitos para la reparación de superficies de articulaciones dañadas. Las explicaciones de la presente invención proporcionan medios eficaces y eficientes para fomentar el trasplante de cartílago y/o condrocitos en un defecto, en una articulación articulada u otra superficie ósea cubierta de cartílago, por los que se regenera el cartílago para fijar el defecto. La presente invención también proporciona instrumental quirúrgico que se diseña para preparar el sitio de injerto de manera que se facilite la integración eficaz de material injertado en el sitio de injerto.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona un método *in vitro* para adherir condrocitos a un componente sin células, como se define en la reivindicación 1. Se puede usar el producto de este método en el tratamiento de cartílago de la superficie de la articulación articulada por el trasplante de condrocitos en una matriz adecuada, en una superficie que se tenga que tratar, con una barrera hemostática y un parche de recubrimiento sin células. Una barrera hemostática, como se describirá además más adelante, es una barrera que inhibe o evita la penetración de células y tejido de vascularización en el material injertado. Se usa sin células en la presente memoria como en la técnica y significa un material que está sustancialmente exento de células sanas, capaces de más división celular, difusión o actividad biológica. En una realización preferida, un material sin células está exento de toda célula nucleada sana.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se entenderá mejor examinando las siguientes figuras, que ilustran algunas propiedades de la presente invención, en la que:

La Figura 1A es un dibujo que muestra un extremo articulado típico de un hueso. Típicamente, el material óseo esta cubierto en la superficie articulada con un cartílago.

La Figura 1B muestra un ejemplo de dónde tiene lugar un defecto o lesión en la tapa cartilaginosa (hueco en el cartílago) y ese defecto se puede tratar directamente, agrandar ligeramente o esculpir para aceptar el material injertado por procedimientos quirúrgicos previos al tratamiento.

La Figura 1C muestra cómo se coloca la barrera hemostática (numerada 1) dentro del defecto en la tapa del cartílago para inhibir o evitar la vascularización en el cartílago regenerado a partir del hueso subyacente. Los condrocitos que se tienen que implantar en la cavidad del defecto se disponen entonces en capas en la parte de arriba de la barrera hemostática.

La Figura 2 es un dibujo que muestra el defecto tratado (hueco en el cartílago) en la tapa cartilaginosa cubierta por un material semipermeable sin células (numerado 2) que se usa para formar una tapa/parche o venda sobre el sitio del defecto. Esta tapa se fija en el sitio, o suturada al borde de la cavidad en cartílago sano o unida de otro modo. Esta tapa está cubriendo el área anormal de la articulación en que se ha puesto el trasplante de condrocitos/cartílago cultivado o se pondrá debajo de la tapa unida parcialmente.

La Figura 3A es un diagrama que ilustra la respuesta diferencial a las fuerzas de compresión y de cizallamiento por cartílago más duro y más blando con zona posterior de demarcación.

La Figura 3B ilustra el sitio de injerto, después de que se haya esculpido el defecto para tener paredes onduladas.

La Figura 3C ilustra el sitio de injerto esculpido con la barrera (1) hemostática, el material (3) trasplantado y el parche (2) de recubrimiento sin células, en el lugar dentro del cartílago (4) de la superficie articular.

La Figura 4A ilustra una realización del dispositivo quirúrgico de la presente invención, que muestra los dientes (5) de corte y el clavo (6) de colocación prominente. Las ilustraciones de sección transversal a la derecha muestran dos posibles configuraciones de las hojas de corte.

La Figura 4B ilustra una segunda realización del dispositivo quirúrgico de la presente invención.

La Figura 5 es un diagrama que ilustra la respuesta diferencial modificada a las fuerzas de compresión y cizallamiento por cartílago más duro y cartílago más blando después de esculpir el sitio de injerto.

La Figura 6A es una Resonancia Magnética Nuclear de una rodilla de cerdo que muestra defecto de cartílago en la epífisis izquierda (medial).

La Figura 6B es una Resonancia Magnética Nuclear de la misma rodilla de cerdo tres meses después de tratamiento.

Descripción detallada de la invención

Esta invención se refiere al uso de algunos productos que inhiben la formación de tejido vascular, por ejemplo tal como bucles capilares que sobresalen en el cartílago que se está estableciendo, durante el proceso de autotrasplante de

ES 2 325 206 T3

condrocitos en los defectos en el cartílago. La formación de tejido vascular del hueso subyacente tenderá a sobresalir en el nuevo cartílago que se tiene que formar conduciendo a la aparición de células distintas de los condrocitos especializados, mesenquimales, deseados.

5 Las células contaminantes introducidas por la vascularización pueden dar lugar a invasión y sobrecrecimiento en el cartílago que se tiene que formar por los condrocitos implantados. Uno de los tipos de productos comerciales que se puede usar en esta invención es Surgicel[®] (Ethicon Ltd., R.U.) que es absorbible después de un periodo de 7-14 días. El uso de este material en el método de la presente invención es contrario al uso normal de un dispositivo hemostático, tal como Surgicel[®], como se describe en el inserto del envase de Ethicon Ltd.

10 Sorprendentemente, hemos encontrado que en una situación en que se desee inhibir la revascularización en cartílago, un material hemostático actuará como un coágulo artificial parecido a un gel. Si estuvieran presentes glóbulos rojos en el defecto de espesor total de cartílago articular que está tapado por esa barrera hemostática, estas células sanguíneas se cambiarán mediante enlaces químicos a hematina y así se harán incapaces de inducir crecimiento vascular. Así, es eficaz un producto hemostático usado como barrera inhibitoria de revascularización con o sin adhesivos de fibrina, tales como por ejemplo el Surgicel[®]. Otra parte de esta invención es el uso de un componente sin células, que se puede usar como parche que recubre el área anormal de la articulación en que se estén trasplantando los condrocitos/el cartílago cultivado, usando condrocitos autólogos para el trasplante. El método de la invención también considera el uso de condrocitos alogénicos o condrocitos xenogénicos, adecuados.

20 Los métodos para la reparación o el tratamiento eficaz de defectos de cartílago en superficies óseas de articulaciones articulares pueden comprender administrar un agente o dispositivo para bloquear la invasión vascular en el sitio del cartílago que se tiene que reparar y proporcionar también una barrera sin células que aislará el sitio de reparación y mantendrá las células trasplantadas en su lugar. Estos métodos pueden implicar un estuche que comprenda un componente de barrera hemostática para la inserción en el sitio que se tiene que reparar de manera que haya una inhibición eficaz de vascularización en el sitio que se tiene que reparar y una vez que estén colocados los condrocitos que se tienen que trasplantar, en el sitio que se tiene que reparar, se tapa una barrera semipermeable sin células, sobre el sitio de reparación, de manera que se mantengan en su lugar los condrocitos trasplantados, pero aún puedan lograr obtener acceso a los nutrientes.

30 Se han puesto como ejemplo algunos aspectos de la invención usando un sistema *in vitro* para estudiar el comportamiento de los condrocitos cuando se ponen en contacto con un determinado producto o una combinación de determinados productos, que inhibe la formación de tejido vascular. Este ensayo *in vitro* predice la capacidad de determinados materiales ensayados para inhibir la vascularización, como ocurrirá *in vivo* en el caso de que sobresalgan bucles capilares en el cartílago que se está estableciendo durante el proceso de autotrasplante de condrocitos en defectos en el cartílago.

40 Se caracterizarán productos hemostáticos adecuados por tener la capacidad de inhibir el crecimiento o la invasión de tejido vascular, osteocitos, fibroblastos, etc. en el cartílago que se desarrolla. Un material hemostático adecuado conseguirá el objetivo de que se deba evitar la invasión vascular y celular en el cartílago que se desarrolla para optimizar la formación de cartílago y conseguir reparar el espesor total de cualquier defecto en el cartílago articular. Idealmente, la barrera hemostática será estable durante un periodo de tiempo prolongado, suficiente para permitir que se repare el cartílago completo y después poder ser reabsorbido o descompuesto con el tiempo de otra manera. Un material identificado como adecuado se denomina Surgicel[®] W1912 (un hemostático absorbible que contiene celulosa estéril regenerada, oxidada; Lote GG3DH, Ethicon Ltd. R.U.). Otro ejemplo de un material adecuado es BioGide[®] (una almohadilla de matriz de colágeno de tipo I comercialmente disponible; Geistlich Söhne, Suiza).

50 Se puede encontrar comercialmente material de cola orgánica, adecuado, tal como por ejemplo Tisseel[®] o Tissucol[®] (adhesivo a base de fibrina; Immuno AG, Austria), Proteína Adhesiva (Cat. A-2707, Sigma Chemical, EE.UU.) y Dow Coming Medical Adhesive B (Cat. 895-3, Dow Corning, EE.UU.).

55 El instrumental quirúrgico se puede fabricar de metal y/o plástico adecuado para preparar instrumentos quirúrgicos desechables de un solo uso o reutilizables multiuso. El instrumento de corte puede contener dientes de corte que sean completamente circulares o planos o algo intermedio. Como el cartílago es un material relativamente blando puede ser ventajoso fabricar bordes de corte de plástico endurecido que puedan esculpir cartílago sin poder dañar al hueso. Se puede hacer que esos instrumentos de corte incorporen aberturas para administración de fluido, eliminación de succión de partículas de corte y fluido y hebras de fibra óptica para la iluminación y visualización del sitio anormal.

60 Algunos aspectos de la presente invención se pueden entender mejor como se ilustra por los siguientes ejemplos, que se pretende que sirvan como medio de ilustración y no como limitación.

Ejemplo 1

65 Para usar el Surgicel[®] de acuerdo con la invención, para evitar el desarrollo de vasos sanguíneos en cartílago o condrocitos implantados, autógenos, se trató primero Surgicel[®] con un fijador, tal como aldehído glutárico. En resumen, se trató el Surgicel[®] con aldehído glutárico al 0,6%, durante 1 minuto, seguido por varios lavados para eliminar restos de aldehído glutárico que puedan ser tóxicos de otro modo para el tejido. Alternativamente, se trató el Surgicel[®] con el adhesivo de fibrina denominado Tisseel[®] previamente al tratamiento con aldehído glutárico, como se

ES 2 325 206 T3

describe en el Ejemplo 2. Se encontró que el Surgicel® fijado por ejemplo con un fijador tal como aldehído glutárico, lavado con disolución salina fisiológica estéril (0,9%) y almacenado en refrigerador, no se disuelve durante 1 a 2 meses. Generalmente, el Surgicel se reabsorbe en un periodo entre 7 y 14 días. Este tiempo sería demasiado corto, debido a que se requiere un tiempo mayor para evitar el desarrollo de vasos sanguíneos o vascularización como la de la estructura ósea en el cartílago implantado antes de que hayan crecido los condrocitos implantados en una capa de cartílago, sólida, que consigue sus requerimientos de nutrición del cartílago cercano. En otras palabras, se requiere suficiente inhibición de la vascularización durante un tiempo mayor tal como por ejemplo un mes. Por lo tanto, el producto no debería ser absorbido significativamente previamente a ese tiempo. Por otra parte, finalmente se requiere reabsorción. Por lo tanto, el material orgánico usado como barrera inhibidora tendrá estas capacidades y se ha encontrado que el Surgicel® tratado de esta manera proporciona esa función.

Ejemplo 2

También se recubrió el Surgicel® con una cola orgánica, en este ejemplo la cola usada fue Tisseel® pero también se pueden usar otras. Este producto, junto con el Surgicel® produce una barrera utilizable para el propósito particular de la invención. Se podía usar cualquier otro hemostático o barrera inhibitoria vascular. Se mezcló el Tisseel® como se describe a continuación. Después se recubrió el Surgicel® con Tisseel® por pulverización del material de Surgicel® en ambos lados hasta que se empapó. Se permitió después que el Tisseel® (cola de fibrina) solidificara a temperatura ambiente. Inmediatamente antes de que acabara la solidificación, se puso entonces Surgicel® recubierto en aldehído glutárico al 0,6%, durante 1 minuto y después se lavó con disolución salina fisiológica, estéril (0,9%). Después se ajustó el pH con PBS y/o con NaOH hasta que el pH fue estable a 7,2 a 7,4. Después, el Surgicel® así tratado se lavó después en medio de cultivo de tejido tal como medio mínimo esencial/ F 12 con tampón de Hepes 15 mM.

Como se mencionó en este ejemplo, hemos usado Tisseel® como el adhesivo de fibrina para recubrir el Surgicel®. Además, también se puede aplicar directamente el adhesivo de fibrina o cola en el fondo de la lesión hacia el hueso, en que se pega el Surgicel®. El sistema *in vitro* usado, en lugar del ensayo *in vivo*, consiste en una placa desechable, estéril, de 6 pozos, Delta, NUNCLON™ para trabajo de investigación celular (NUNC, InterMed, Roskilde, Dinamarca). Cada pozo mide aproximadamente 4 cm de diámetro.

En la invención el adhesivo de fibrina puede ser cualquier adhesivo que junto con el componente de fibrina produzca una cola que se pueda tolerar en seres humanos (Ihara, N., *et al.*, Burns Incl. Therm. Inj. 1.984, 10, 396). La invención también cuenta con cualquier otro componente de cola que se pueda usar en lugar del adhesivo de fibrina. En esta invención usamos Tisseel® o Tissucol® (Immuno AG, Viena, Austria). El estuche de Tisseel® consiste en los siguientes componentes:

Tisseel®, un Sellador inactivado de virus, liofilizado, que contiene proteína coagulable, del mismo: fibrinógeno, fibronectina de Plasma (CIG) y Factor XIII y Plasminógeno.

Disolución de Aprotinina (bovina)

Trombina 4 (bovina)

Trombina 500 (bovina)

Disolución de Cloruro de Calcio

El estuche de Tisseel® contiene un Sistema de Aplicación DUPLOJECT®. El adhesivo de fibrina o el material de sellado de dos componentes usando el Estuche Tisseel® se combina de la siguiente manera de acuerdo con la lámina de inserto del producto Immuno AG:

Ejemplo 3

Se cultivaron condrocitos en medio de cultivo mínimo esencial que contenía HAM F12 y tampón Hepes 15 mM y autosuero de 5 a 7,5%, en una incubadora de CO₂ a 37°C y se manipularon en un laboratorio Clase 100 en Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Copenhague, Dinamarca. Se pueden usar otras composiciones de medio de cultivo para cultivar los condrocitos. Se tripsinizaron las células usando tripsina AEDT, durante 5 a 10 minutos y se contaron usando coloración de viabilidad Azul de Trypan en una cámara Bürker-Türk. Se ajustó el hemograma a 7,5x10⁵ células por ml. Se destapó una placa NUNCLON™ en el laboratorio de Clase 100.

Se cortó la barrera hemostática Surgicel® en un tamaño adecuado que se ajustara al fondo del pozo en la bandeja de cultivo de tejido NUNCLON™. En este caso un círculo, de un tamaño de aproximadamente 4 cm (pero podía ser de cualquier tamaño posible) y colocado en condiciones asépticas en el fondo del pozo en una placa desechable, estéril, de 6 pozos, Delta, NUNCLON™, para trabajo de investigación celular (NUNC, Intermed, Roskilde, Dinamarca). La barrera hemostática que se tenía que poner en el fondo del pozo se trató previamente como se describe en el Ejemplo 1.

Este tratamiento retrasó la absorción del Surgicel significativamente. Se lavó después esta barrera hemostática varias veces con agua destilada y con posterioridad varias veces hasta que se enjuagó el glutaraldehído no reaccionado.

ES 2 325 206 T3

Se aplicó una pequeña cantidad del medio de cultivo celular que contenía suero para que se absorbiera en la barrera hemostática y al mismo tiempo se mantuviera húmeda la barrera hemostática en el fondo del pozo.

Se pusieron aproximadamente 10^6 células en 1 ml de medio de cultivo, directamente, en la parte de arriba de la barrera hemostática, dispersadas en la superficie de la barrera hemostática pretratada con glutaraldehído al 0,4%, como se describió anteriormente. Después se incubó la placa en una incubadora de CO_2 a 37°C , durante 60 minutos. Se añadió cuidadosamente al pozo una cantidad de 2 a 5 ml de medio de cultivo de tejido que contenía 5 a 7,5% de suero, conteniendo las células, evitando esparcir las células manteniendo la punta de la pipeta tangencial al lado del pozo cuando se está expulsando el medio. Pareció que el pH del medio era demasiado bajo (pH $\sim 6,8$). Después se ajustó el pH a 7,4 a 7,5. Al día siguiente algunos condrocitos habían comenzado a crecer en la barrera hemostática, dispuestos en grupos. Algunas de las células habían muerto debido a la exposición al bajo pH previamente al ajuste del pH. La placa se incubó durante 3 a 7 días con cambio de medio el día 3.

Al final del periodo de incubación se decantó el medio y se añadió glutaraldehído al 2,5% que contenía sal sódica del ácido dimetilarsínico 0,1M (también denominada cacodilato de sodio, el pH se ajustó con HCl a 7,4), refrigerado en frío, como fijador para la preparación de la célula y el soporte (barrera hemostática) para la preparación posterior para microscopía electrónica.

Ejemplo 4

Se cultivaron condrocitos en medio de cultivo mínimo esencial que contenía HAM F12 y tampón Hepes 15 mM y autosuero al 5 a 7,5% en una incubadora de CO_2 a 37°C y se manipuló en un laboratorio Clase 100 en Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Copenhagen, Dinamarca. Se pueden usar otras composiciones de medio de cultivo para cultivar los condrocitos. Las células se tripsinizaron usando tripsina AEDT, durante 5 a 10 minutos y se contaron usando coloración de viabilidad Azul de Trypan en una cámara Bürker-Türk. Se ajustó el hemograma a $7,5 \times 10^5$ células por ml. Se destapó una placa NUNCLON™ en el laboratorio Clase 100.

El Surgicel® (para uso como la barrera hemostática) se trató con aldehído glutárico al 0,6%, durante un minuto, como se describe en el Ejemplo 1 y se lavó con disolución de cloruro de sodio, estéril, al 0,9% o, preferiblemente, con un tampón tal como un tampón de PBS o el medio de cultivo tal como MEM/F12, debido a que el pH después del tratamiento de aldehído glutárico es 6,8 y debería ser preferiblemente 7,0 a 7,5. Se aplicó el Tisseel® en ambos lados del Surgicel® usando el sistema DUPLOJECT®, recubriendo así los dos lados del Surgicel®, el parche que se desea usar, con adhesivo de fibrina. Se dejó secar la cola en condiciones asépticas durante al menos 3 a 5 minutos. Se puso la barrera hemostática "recubierta" en el fondo del pozo en una placa desechable, estéril, de 6 pozos, Delta, NUNCLON™, para trabajo de investigación celular. Se aplicó una pequeña cantidad de medio de cultivo de tejido conteniendo suero, para que se absorbiera en la barrera hemostática. Se pusieron directamente aproximadamente 10^6 células en 1 ml de medio de cultivo de tejido conteniendo suero, en la parte de arriba del Hemostático, dispersadas sobre la superficie de la barrera hemostática. Después se incubó la placa en una incubadora de CO_2 a 37°C , durante 60 minutos. Se añadió cuidadosamente una cantidad de 2 a 5 ml de medio de cultivo de tejido conteniendo suero al 5 a 7,5%, al pozo que contenía las células, evitando esparcir las células manteniendo la punta de la pipeta tangencial al lado del pozo cuando se estaba expulsando el medio. Después de 3 a 6 días, el examen microscópico mostró que las células se estaban adhiriendo a y creciendo en el Surgicel® de una manera satisfactoria, sugiriendo que el Surgicel® no mostraba toxicidad para los condrocitos y que los condrocitos crecían de una manera satisfactoria en el Surgicel®.

La placa se incubó durante 3 a 7 días con cambio de medio el día 3. Al final del periodo de incubación se decantó el medio y se añadió glutaraldehído al 2,5% refrigerado en frío, que contenía sal sódica del ácido dimetilarsínico, 0,1 M, también denominada cacodilato de sodio, el pH se ajustó con HCl a 7,4, como fijador para la preparación de la célula y el soporte (barrera hemostática) para preparación posterior para microscopía electrónica.

Ejemplo 5

Se cultivaron condrocitos en medio de cultivo mínimo esencial que contenía HAM F12 y tampón Hepes 15 mM y autosuero al 5 a 7,5% en una incubadora de CO_2 a 37°C y se manipuló en un laboratorio Clase 100 en Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Copenhagen, Dinamarca. Se tripsinizaron las células usando tripsina AEDT, durante 5 a 10 minutos y se contaron usando coloración de viabilidad Azul de Trypan en una cámara Bürker-Türk. El hemograma se ajustó a $7,5 \times 10^5$ a 2×10^6 células por ml. Se destapó una placa NUNCLON™ en el laboratorio de Clase 100.

Se ha encontrado que se puede usar el Bio-Gide® como membrana bicapa reabsorbible que se usará como parche o venda que cubra el área anormal de la articulación en que se estén trasplantando los condrocitos cultivados así como la barrera hemostática. El Bio-Gide® es una membrana de colágeno puro obtenida por procedimientos de fabricación controlada, normalizados (por E. D. Geistlich Söhne AG, CH-6110 Wolhusen). Se extrae el colágeno de cerdos certificados por el veterinario y se purifica cuidadosamente para evitar reacciones antigénicas y se esteriliza en doubles ampollas por irradiación γ . La membrana bicapa tiene una superficie porosa y una superficie densa. La membrana se hace de colágeno de tipo I y de tipo III sin más reticulación o tratamiento químico. El colágeno se reabsorbe en 24 semanas. La membrana mantiene su integridad estructural incluso cuando está húmeda y se puede fijar por suturas o clavos. También se puede "pegar" la membrana usando adhesivo de fibrina tal como Tisseel® al cartílago o tejido cercano o en vez de suturas o junto con suturas.

ES 2 325 206 T3

Se destapó el Bio-Gide® en un laboratorio clase 100 y se puso en condiciones asépticas en el fondo de los pozos en una placa desechable, estéril, de 6 pozos, Delta, NUNCLON™, para trabajo de investigación celular o con la superficie porosa de la membrana bicapa boca arriba o con la superficie densa boca arriba. Se pusieron directamente aproximadamente 10⁶ células en 1 ml de medio de cultivo de tejido conteniendo suero, en la parte de arriba del Bio-Gide®, se dispersaron o sobre la superficie porosa o la densa del Bio-Gide®. Después se incubó la placa en una incubadora de CO₂ a 37°C, durante 60 minutos. Se añadió cuidadosamente una cantidad de 2 a 5 ml de medio de cultivo de tejido que contenía suero al 5 a 7,5%, al pozo que contenía las células, evitando esparcir las células manteniendo la punta de la pipeta tangencial al lado del pozo cuando se está expulsando el medio.

El día 2 después de que se pusieran los condrocitos en el pozo que contenía el Bio-Gide®, se examinaron las células en un microscopio invertido Nikon. Se observó que algunos condrocitos se habían adherido al borde del Bio-Gide. Por supuesto, no fue posible poder mirar por el propio Bio-Gide® usando este microscopio.

Se incubó la placa durante 3 a 7 días, con cambio de medio el día 3. Al final del periodo de incubación se decantó el medio y se añadió glutaraldehído al 2,5% refrigerado en frío, conteniendo sal sódica del ácido dimetilarsínico 0,1 M, también denominada cacodilato de sodio, el pH se ajustó con HCl a 7,4, como fijador, para la preparación de la célula y el soporte Bio-Gide®, con las células o cultivadas en la superficie porosa o la superficie densa. Después se enviaron los parches Bio-Gide® para microscopía electrónica al Departamento de Patología, Herlev Hospital, Dinamarca.

La microscopía electrónica demostró que los condrocitos cultivados en la superficie densa del Bio-Gide®, no crecieron en la estructura de colágeno del Bio-Gide®, mientras que las células cultivadas en la superficie porosa sí crecieron en la estructura de colágeno y además, demostró la presencia de proteoglucanos y ninguna señal de estructuras de fibroblastos. Este resultado demuestra que cuando se cose el parche de colágeno, como por ejemplo un parche Bio-Gide®, como un parche que cubre un defecto de cartílago, la superficie porosa estará boca abajo hacia el defecto en que se tienen que inyectar los condrocitos cultivados. Entonces podrán penetrar en el colágeno y producir una superficie del cartílago lisa, en línea con la superficie sana y en este área se construirá una capa lisa de proteoglucanos. Mientras, si la superficie densa del colágeno está boca abajo en el defecto los condrocitos que se tienen que implantar no se integrarán con el colágeno y las células no producirán la misma superficie lisa, como se describió anteriormente.

Ejemplo 6

Se cultivaron condrocitos en medio de cultivo mínimo esencial que contenía HAM F12 y tampón Hepes 15 mM y autosuero al 5 a 7,5%, en una incubadora de CO₂ a 37°C y se manipuló en un laboratorio Clase 100 en Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Copenhagen, Dinamarca. Se tripsinizaron las células usando tripsina AEDT, durante 5 a 10 minutos y se contaron usando coloración de viabilidad Azul de Trypan en una cámara Bürker-Türk. Se ajustó el hemograma a 7,5x10⁵ a 2x10⁶ células por ml. Se destapó una placa NUNCLON™ en el laboratorio de Clase 100.

El Bio-Gide® usado como membrana bicapa reabsorbible también se puede usar junto con una cola orgánica tal como Tisseel® con contenido de Aprotinina significativamente mayor, adicional, que el encontrado normalmente en Tisseel®, como se describe en el inserto del producto. Aumentando el contenido en aprotinina a aproximadamente 25.000 KIU/ml, la reabsorción del material se retardará por semanas en vez del intervalo normal de días.

Para ensayar esta característica *in vitro*, se aplicó el Tisseel® al fondo del pozo de la placa NUNCLON™ y se permitió que solidificara parcialmente. Después se aplicó un parche de colágeno tal como un Bio-Gide® sobre el Tisseel® y se pegó al fondo del pozo. Esta combinación de Bio-Gide® y Tisseel® se diseña para que sea una barrera homeostática que inhiba o evite el desarrollo o la infiltración de vasos sanguíneos en el área de trasplante de condrocitos. Este parche de colágeno híbrido se puede usar ahora tanto como barrera homeostática en el fondo de la lesión (lo más proximal a la superficie que se tiene que reparar) como también como soporte para la formación de cartílago debido a que la superficie distal puede ser el lado poroso del parche de colágeno y estimula así la infiltración de matriz de condrocitos y cartílago. Así, también se puede usar este parche de colágeno híbrido para cubrir la parte de arriba del implante con la superficie porosa de colágeno dirigida abajo hacia los condrocitos implantados y la barrera que forma la parte de arriba. También se puede usar el parche de colágeno híbrido, con componente de Aprotinina elevado, sin cola orgánica tal como Tisseel® y se puso en el defecto directamente, adhiriéndose por fuerzas naturales. Así, el parche de colágeno se puede usar tanto como barrera homeostática como como recubrimiento sin células del sitio de reparación/trasplante, con las superficies porosas de los parches orientadas hacia los condrocitos/cartílago trasplantado. Otra variante usaría un parche de colágeno que consiste en colágeno de tipo II (es decir, de Geistlich Sohne AG, CH-6110 Wolhusen).

Así, el presente método proporciona un parche de colágeno híbrido, donde dicho parche es una matriz de colágeno con niveles elevados de componente de aprotinina, preferiblemente aproximadamente 25.000 KIU/ml, junto con una cola de matriz orgánica, cuando el componente de colágeno es similar al Bio-Gide®, material bicapa reabsorbible o colágeno de Tipo II y la cola orgánica es similar al material Tisseel®. En otro ejemplo, el parche de colágeno híbrido no usa cola orgánica para que se adhiera al sitio de la reparación.

Ejemplo 7

Debido a la estructura debilitada de cartílago con artrosis, se puede inhibir la adherencia de los condrocitos autógenos cultivados, trasplantados a un sitio de injerto en cartílago anormal, creándose así una zona marginal (zona de

demarcación) entre el cartílago/condrocitos recién implantados y el cartílago establecido circundante. Esta zona marginal será la más pronunciada si se prepara el sitio de injerto para el injerto creando paredes lisas, rectas, cortadas de una manera lineal. Las fuerzas de cizallamiento y compresión a través de tal zona marginal (como se ilustra en la Figura 3A) ejercerán gran fuerza para sacar el injerto cuando el sitio de injerto sea cortado de una manera lineal. Esta zona marginal y el movimiento diferencial de materiales a lo largo de esta zona inhibirá la curación confluyente entre el material injertado y el material circundante. Este cizallamiento de la zona marginal se ve exacerbado cuando la dureza del material confinado es diferente. En muchos casos el material de injerto es más blando que el material circundante, sin embargo, en algunos casos de artrosis, el cartílago circundante puede ser de hecho más blando que los condrocitos/cartílago implantado.

Por lo tanto, para resolver este problema, se pueden usar instrumentos quirúrgicos para esculpir las paredes del sitio de injerto de manera que las paredes no sean lineales y proporcionen así superficies onduladas que reduzcan el cizallamiento de la zona marginal y proporcionen anclaje para el material injertado. También es posible conformar el sitio de injerto de manera que el diámetro del sitio proximal a la superficie ósea tenga una dimensión mayor que la abertura distal al hueso y a la superficie del cartílago que se tiene que reparar de manera que haya un efecto de “embudo invertido”. Una abertura estrecha en la superficie ayudará a reducir el cizallamiento de la zona marginal y la expulsión del material de injerto del sitio de injerto. Un ejemplo preferido describe la escultura de las paredes del sitio de injerto de una manera similar a una abertura roscada para recibir un perno o tornillo (como se ilustra en la Figura 3B), proporcionando así resistencia mecánica a la compresión y o expulsión del material injertado del sitio de injerto, que se puede describir como roscado “macho” y “hembra”.

Los instrumentos quirúrgicos se pueden fabricar de metal y/o plástico adecuado para preparar instrumentos quirúrgicos desechables de un solo uso o reutilizables multiuso. Como el cartílago es un material relativamente blando puede ser ventajoso fabricar bordes de corte de plástico endurecido que puedan esculpir cartílago sin dañar al hueso. Se pueden fabricar tales instrumentos de corte incorporando aberturas para la administración de fluido, eliminación de succión de partículas de corte y fluido y hebras de fibra óptica para la iluminación y visualización del sitio del defecto. En algunos instrumentos, la base del instrumento puede tener un punto saliente o una estructura en forma de clavo que ayude a guiar y colocar el instrumento en el sitio del injerto. Por supuesto tal clavo se diseñaría para minimizar el daño al hueso subyacente.

Al tiempo que la superficie de corte del instrumento puede ser de un solo diente o multidentado o describir un modelo parecido a un tornillo tal como el de una tapa de metal usada para generar agujeros roscados en partes de metal, la característica requerida del instrumento de corte es que los lados esculpidos resultantes del sitio de injerto sean ondulados y no lineales. Por ejemplo, en algunos instrumentos, el borde de corte del instrumento se puede conformar similar a lo mostrado en la Figura 4A o como en la Figura 4B. El borde de corte puede ser plano o circular por que enrolle el diámetro del instrumento de corte. Se pueden diseñar muchas otras conformaciones para realizar el propósito de crear una interfase que proporcione resistencia mecánica para reacción diferencial a fuerzas de compresión y cizallamiento en el material trasplantado y el material circundante.

Ejemplo 8

Se sometió a un cerdo de raza Yorkshire, mixta, de cuatro meses, a anestesia general y se colocó sobre su lomo. Se lavó al cerdo y se cubrió en un área quirúrgica en Harrington Arthritis Research Center, Phoenix, Arizona. Se realizó asépticamente todo el procedimiento quirúrgico. Se limpió con yodo el tercio posterior izquierdo y el abdomen adyacente y el área inguinal. Se localizó la articulación de la rodilla y se localizó la rótula. Se realizó una incisión medial a aproximadamente 3 cm de la parte posterior de la rótula y los diversos tejidos celulares subcutáneos, capas musculares y ligamentos se cortaron aproximadamente para conseguir acceder a la epífisis femoral medial. Usando un cortador circular se preparó una lesión en el cartílago blanco en la parte medial de la epífisis medial, dejando un margen de 0,5 a 1 cm al borde del cartílago que cubre la parte posterior medial de la epífisis (epífisis izquierda, Figura 6A). El defecto de 0,5 a 1 cm se puso en una parte que soportaba el peso del caudal de la epífisis medial. Todo el procedimiento quirúrgico se hizo sin torniquete en el fémur izquierdo. Se suturaron apropiadamente las diferentes capas y la piel.

El día 3 se llevó de nuevo al animal al área quirúrgica y se colocó como anteriormente en la mesa de operaciones y se dio anestesia general. Se dio con yodo al tercio posterior izquierdo, el abdomen y la región inguinal, como se describió anteriormente. Se cortaron las suturas y se abrió el área. Se observó que había un hematoma moderado en la articulación de la rodilla. Se retiró el coágulo sanguíneo y se inspeccionó el defecto. Había un coágulo sanguíneo en el defecto que se retiró. Se atornilló cuidadosamente en el defecto un instrumento quirúrgico estéril, diseñado con un borde de corte roscado macho, con un tamaño correspondiente a o ligeramente mayor que la circunferencia de la lesión. Se cortó una almohadilla de BioGide® en un tamaño igual al fondo del defecto. Se aplicó la primera cola usada, denominada Proteína Adhesiva (A-2707, Sigma Chemical, EE.UU.), en el lado denso de la almohadilla de la barrera hemostática recortada y se puso la almohadilla con el lado denso hacia abajo en el fondo de la lesión, usándola como una barrera, como se describió anteriormente. Se encontró que esta cola no parecía secarse muy rápido. La ligera hemorragia del fondo del defecto cesó inmediatamente. Se cortó un segundo BioGide® algo mayor en circunferencia que la lesión y se puso con el lado denso hacia arriba (así el lado poroso abajo hacia el injerto), como se describió anteriormente.

ES 2 325 206 T3

Se suturó después esta almohadilla de recubrimiento no celular, sobre la cavidad, dejando un borde abierto, donde se podía inyectar el condrocito que se tenía que explantar, en el sitio de injerto. La parte circundante del borde de la almohadilla se cubrió con la segunda cola, Dow Corning Medical Adhesive B (Cat 895-3, Dow Corning, EE.UU.). Esta segunda cola se secó mucho más rápido y más eficazmente que la primera cola. Se encontró que durante este procedimiento particular, la primera cola no se había secado lo suficiente para mantener la barrera hemostática en su lugar cuando se intentó suturar la tapa. La principal barrera formada en la superficie proximal del sitio de injerto fue por la propia cola.

Usando una jeringa de 1 ml y una aguja de calibre 16, se aspiró la suspensión de células de condrocitos (aproximadamente 0,6 ml) en el cilindro de la jeringa. Se cambió una aguja corta de calibre 23 por la aguja de calibre 16 y se inyectó la suspensión de células en el parche de recubrimiento suturado en el sitio de injerto (aproximadamente 10×10^6 células). Se pegó después el borde abierto de la tapa previamente a la eliminación de la aguja y se retiró la aguja cuidadosamente. No se observó filtración de células. La herida se suturó y como anteriormente, no se usó torniquete, no se observó hemorragia. Se suturaron las capas finales de piel. No tuvo lugar protusión de la piel después de suturar, que indica que no había hematoma. La recuperación postoperatoria fue sin incidentes.

Como se esperaba, los condrocitos injertados produjeron matriz de cartílago suficiente para reparar el defecto hecho en la superficie del cartílago articular de la articulación de la rodilla del cerdo del ensayo. La Figura 6A es una Resonancia Magnética Nuclear de una rodilla de cerdo que muestra el defecto de cartílago creado en la rodilla (epífisis izquierda, la epífisis medial) y la Figura 6B es una Resonancia Magnética Nuclear de la misma rodilla de cerdo tres meses después de tratamiento, que muestra la reparación del defecto.

Ejemplo 9

Un estuche que comprenda los componentes permitirá la práctica oportuna del método en un marco quirúrgico. Tal estuche proporcionará componentes estériles adecuados para uso fácil en el entorno quirúrgico y proporcionará una barrera hemostática adecuada, parche de recubrimiento adecuado y si se requiere cola orgánica. Un estuche también puede proporcionar material de matriz sin células, estéril, adecuado para soportar condrocitos autógenos que se tengan que implantar en un defecto de la superficie de la articulación articular. En un ejemplo, un estuche contiene una barrera hemostática Surgicel[®] y un parche de recubrimiento Bio-Gide[®] con recubrimiento adecuado de cola orgánica Tisseel[®], donde se han tratado la Surgicel[®] y el Bio-Gide[®] para aumentar el tiempo hasta la reabsorción. En ejemplos en que se recubre previamente Tisseel[®], la Tisseel[®] está enriquecida con aprotinina adicional para aumentar el tiempo hasta la reabsorción.

En otro ejemplo preferido, la barrera hemostática y el parche de recubrimiento son ambos una matriz de colágeno semipermeable que se trata para prolongar el tiempo hasta la reabsorción del material. También es posible proporcionar cola Tisseel[®] en forma mejorada como componente separado, para aplicarse cuando sea necesario debido a la variabilidad inherente y a las circunstancias únicas con que se encontrará cada procedimiento de reparación/trasplante.

Un ejemplo más de un estuche incluirá un instrumento quirúrgico, como se describe en el Ejemplo 7 anterior o variaciones adecuadas del mismo.

Se apreciará por expertos en la materia que se pueden hacer numerosas variaciones y/o modificaciones a la invención mostrada en las realizaciones específicas sin apartarse del alcance de la invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para adherir condrocitos a un componente sin células, que comprende las etapas de:

proporcionar un componente sin células y un medio de cultivo de células que comprenda condrocitos e
incubar dicho componente sin células con el medio de cultivo de células dispersado sobre una superficie
porosa del componente sin células,

caracterizado por que

dicho componente sin células comprende una membrana bicapa con una superficie porosa y una superficie densa y
los condrocitos se adhieren a dicha superficie porosa.

2. El método según la reivindicación 1, en el que dicho componente sin células es una matriz de colágeno.

3. El método según la reivindicación 2, en el que dicha matriz de colágeno consiste en colágeno de tipo I y de tipo
III.

4. El método según la reivindicación 2, en el que dicha matriz de colágeno consiste en colágeno de tipo II.

5. El método según la reivindicación 2, en el que dicha matriz de colágeno consiste en colágeno de tipo I.

6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha matriz de componente sin células o de
colágeno es reabsorbible.

7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dichos condrocitos son autógenos, alogénicos
o xenogénicos.

8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además la etapa de aplicar un adhesivo
biocompatible sobre dicho componente sin células.

9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho componente se adapta para que se
disponga en un defecto de cartílago articular.

FIG. 1A

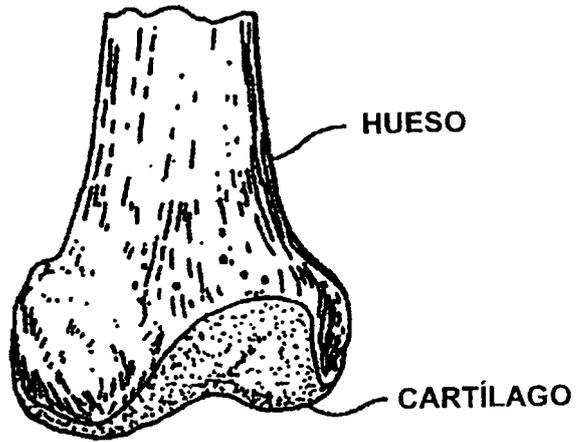


FIG. 1B

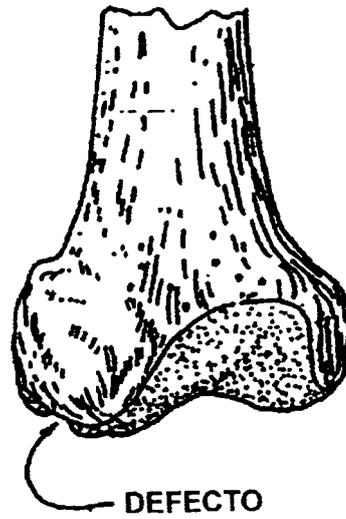


FIG. 1C

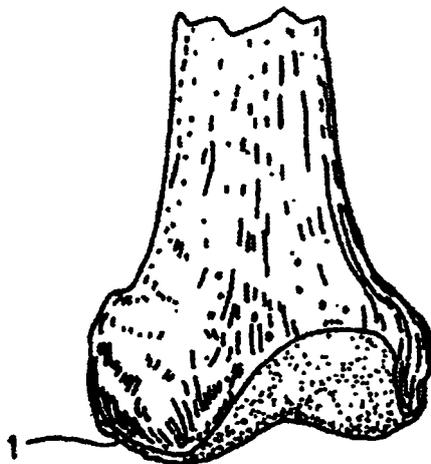


FIG. 2

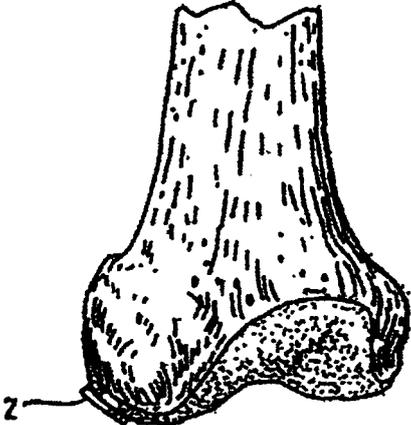


FIG. 3A

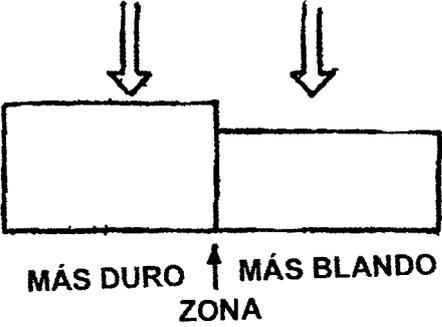


FIG. 3B

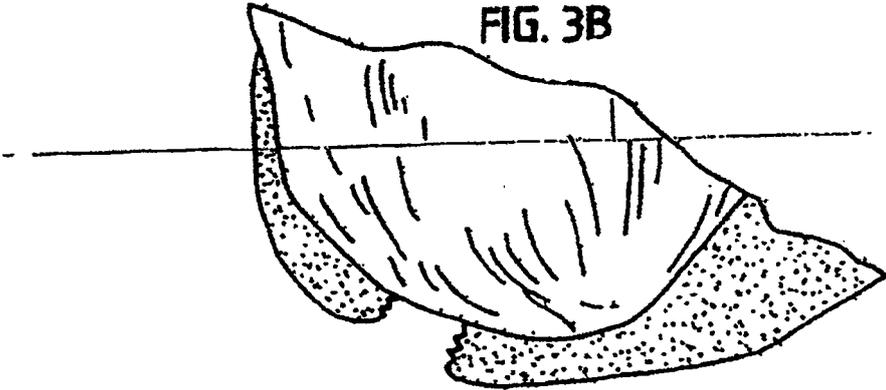


FIG. 3C

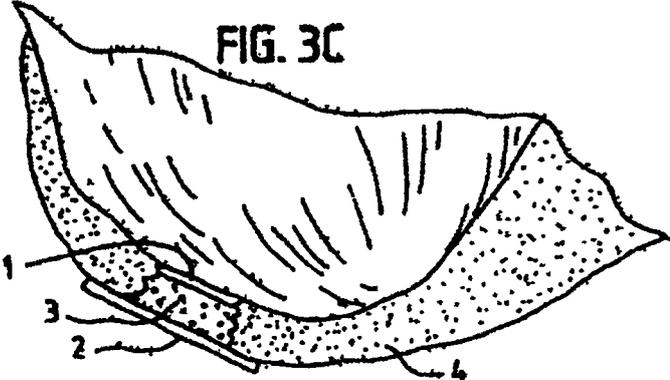


FIG. 4A

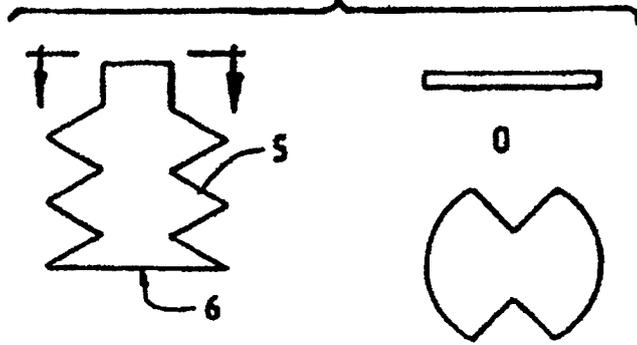


FIG. 4B

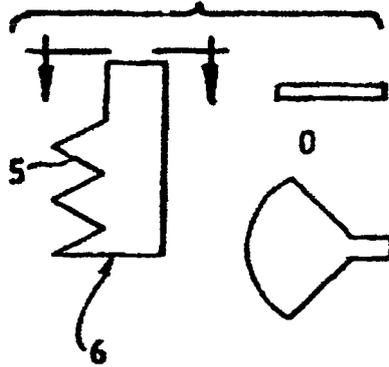
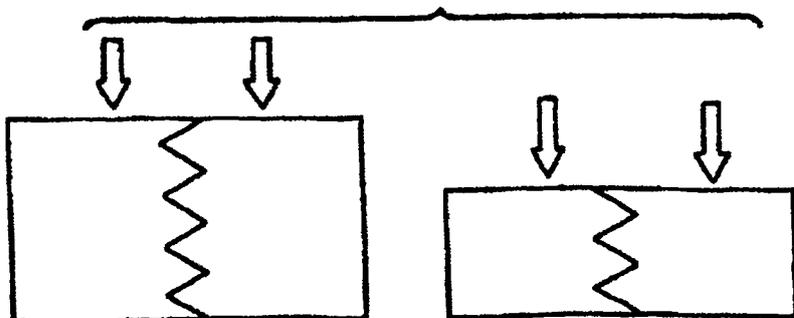


FIG. 5



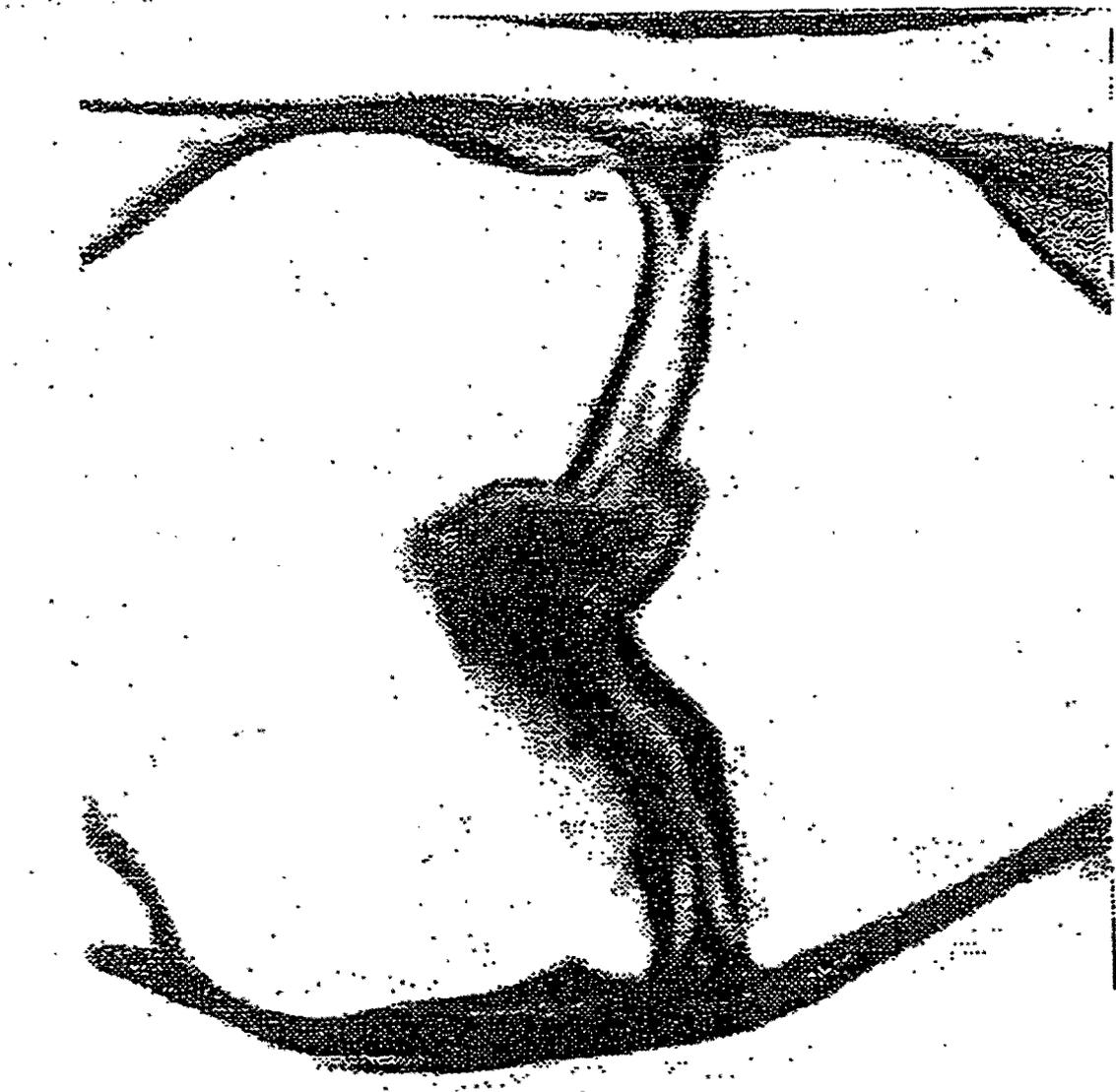


FIG. 6A



FIG. 6B