



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 224**

51 Int. Cl.:  
**A61L 27/22** (2006.01)  
**A61K 6/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02749270 .1**  
96 Fecha de presentación : **18.07.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1423082**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.06.2004**

54 Título: **Matrices de proteína del plasma y métodos para su preparación.**

30 Prioridad: **19.07.2001 IL 144446**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.04.2011**

73 Titular/es: **PROCHON BIOTECH Ltd.**  
**P.O. Box 1482**  
**76114 Rehovot, IL**

72 Inventor/es: **Yayon, Avner y**  
**Glicklis, Rachel**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

**ES 2 357 224 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

Matrices de proteína del plasma y métodos para su preparación.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a biomatrices, que comprenden proteínas del plasma liofilizadas útiles para aplicaciones clínicas incluyendo, como implantes para la ingeniería de tejidos, así como, en biotecnología. Las matrices de acuerdo con la presente invención, se pueden utilizar clínicamente, per se o como implantes portadores de células.

Antecedentes de la invención

10 La ingeniería de tejidos se puede definir como el oficio de reconstrucción de tejidos de mamíferos, tanto estructural como funcionalmente (Hunziker, 2002). La ingeniería de tejidos *in vitro*, generalmente incluye la entrega de un armazón polimérico que sirve como un soporte de arquitectura en el que las células se pueden sujetar, proliferar, y sintetizar nuevo tejido para reparar una herida o defecto.

15 Un ejemplo de un tejido, que es propenso al daño por enfermedad y trauma es el cartílago articular, uno de varios tipos de cartílago en el cuerpo, que se encuentra en la superficie articular de los huesos. El daño al cartílago puede resultar de una enfermedad inflamatoria tal como artritis reumatoide, a partir de un proceso degenerativo tal como osteoartritis o de trauma tal como fractura intraarticular o después de las lesiones de ligamento. Las lesiones de cartílago por lo general se asocian con el dolor y la función reducida y generalmente no se curan sin intervención médica.

20 Las estrategias terapéuticas actuales, para reparar el cartílago dañado incluyen procedimientos que inducen una respuesta de reparación espontánea y aquellas que reconstruyen el tejido de una manera estructural y funcional. El anterior, incluyendo técnicas quirúrgicas tales como artroplastia de abrasión, microfactura o perforación micro subcondrial, exponer la región subcondrial del hueso permitiendo así la formación de un coágulo de sangre y la infiltración de células madre pluripotentes para iniciar la respuesta de cicatrización. Por lo general, el tejido inducido no es durable y las mejoras clínicas son de corta duración.

25 Una alternativa es el trasplante de tejido condral u osteocondral de, ya sea, fuentes autólogas o alogénicas. La base detrás del trasplante, radica en la noción que las actividades proliferativas y de diferenciación del tejido de estas células debería dar lugar a la formación de neocartílago. De hecho, esta técnica muestra alta variabilidad y limitado éxito clínico.

30 Las matrices útiles para la regeneración del tejido y/o como superficies compatibles útiles para el cultivo de tejido son bien conocidas en el oficio. Estas matrices, por consiguiente, se pueden considerar como sustratos para crecimiento celular ya sea *in vitro* o *in vivo*. Las matrices apropiadas para el crecimiento y/o regeneración del tejido incluyen tanto entidades biodegradables como bioestables. Entre los muchos candidatos que pueden servir como matrices útiles reivindicadas para apoyar el crecimiento o la regeneración de los tejidos, se incluyen geles, espumas, láminas, y numerosas estructuras de partículas porosas de estados y formas diferentes.

35 Los materiales porosos formados de materiales biodegradables que ocurren naturalmente o sintéticamente han sido utilizados en el pasado como apósitos de herida o implantes. El material poroso proporciona soporte estructural y un armazón para tejido en crecimiento, mientras que la cicatrización progresa. Preferiblemente, el material poroso gradualmente se absorbe como el tejido al rededor de la herida regenera. Las materiales bioabsorbibles típicos para utilizar en la fabricación de implantes o apósitos para heridas porosas incluyen, tanto polímeros sintéticos y biopolímeros tales como proteínas estructurales y polisacáridos. Los biopolímeros pueden ser, tanto seleccionados como manipulados de forma que afectan sus propiedades físico-químicas. Por ejemplo, los biopolímeros pueden ser ligados en cruz ya sea enzimática, químicamente o por otros medios, proporcionando así mayor o menor grado de flexibilidad o susceptibilidad a la degradación.

40 Entre los múltiples polímeros naturales que se han revelado por ser útiles para la ingeniería o cultivo de tejidos, se pueden enumerar varios constituyentes de la matriz extracelular incluyendo fibronectina, varios tipos de colágeno, y laminina, así como queratina; fibrina y fibrinógeno; ácido hialurónico, heparán sulfato, sulfato de condroitina y otros.

45 La fibrina es una principal proteína del plasma, que participa en el proceso de coagulación sanguínea. La coagulación de la sangre es un proceso complejo incluyendo la interacción secuencial de un número de proteínas del plasma, en particular de fibrinógeno (factor I), factor II, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII y factor XIII. Otras proteínas del plasma tales como factor Von Willebrand (vWF), albúmina, inmunoglobulina, factores de coagulación, y los componentes complemento también pueden jugar un papel en la formación de redes de proteínas o coágulos en la sangre.

- La fibrina se conoce en el oficio como un dispositivo médico adhesivo al tejido y puede ser utilizado en la curación de heridas y reparación de tejidos. El concentrado de proteína derivado del plasma liofilizado (que contiene Factor XIII, fibronectina, y fibrinógeno), en la presencia de trombina y calcio forma una goma biológica inyectable. US Patent No. 5,411,885 revela un método de inclusión y cultivo de tejido que emplea la goma de fibrina. US Patent No. 4,642,120
- 5 revela el uso de goma de fibrinógeno en combinación con células condrocíticas o mesenquimales autólogas para promover la reparación del cartílago y los defectos del hueso. US Patent No. 5,260,420, revela un método para la preparación y uso de goma biológica que comprende fibrina para la inyección en el sitio de lesión. US Patent No. 6,074,663 revela un material similar a una lámina de fibrina entrecruzada para la prevención de formación de adhesión.
- 10 US Patent No. 6,310,267 revela un proceso de preparación específico de una red de fibrina flexible biodegradable para la cicatrización de una herida. El proceso requiere de la dialización de una solución de fibrinógeno con una solución que contiene quelantes y que forman la red flexible por la adición de una solución de trombina, la liofilización y la liofilización de la red.
- 15 US Patent No. 5,972,385 revela una matriz de polisacárido de colágeno reticulado que se administra solo o en combinación con otros terapéuticos, tales como factores de crecimiento, para reparación de tejido. La invención también revela la matriz de polisacárido de colágeno reticulado en combinación con la fibrina. Las etapas de preparación de la matriz incluyen congelación y liofilización así como la adición de fibrinógeno y trombina para formar la fibrina en dicha matriz.
- 20 Una red de fibrina liofilizada para la cicatrización de una herida se ha revelado en US Patent No. 6,310,267. La preparación de la red, según se revela, requiere una diálisis de una o varias etapas de la solución de fibrinógeno. De acuerdo con esta divulgación, la diálisis de una o varias etapas de la solución de fibrinógeno fundamentalmente cambia su composición y la concentración de sales y aminoácidos habitualmente contenidos en esta, se reduce considerablemente. La diálisis se lleva a cabo en una solución acuosa de una sal inorgánica fisiológicamente compatible tal como NaCl y un agente complejante orgánico tal como sales de metal alcalino de EDTA, de ácido oxálico o de ácido cítrico.
- 25 Una esponja de fibrina que contiene un activador de coagulación de la sangre para hemostasis, adhesión de tejido, cicatrización de la herida y soporte de cultivo celular se revela en WO 99/15209.
- De acuerdo con esta divulgación, la restauración de humedad o contenido de agua después de la liofilización es crucial para obtener una esponja suave, adaptable, altamente absorbente.
- 30 US Patent Nos. 5,955,438 y 4,971,954 revela matrices basadas en colágeno reticulado por azúcares, útiles para la regeneración del tejido. US Patent No.5,700,476 proporciona un material de implante bioabsorbible que contiene agentes farmacológicamente activos, apropiados para utilizar en la reparación de heridas. El método describe la mezcla de dos componentes biopolímeros, la liofilización para formar una esponja heteromórfica, que permite una liberación gradual de un agente activo farmacológicamente.
- 35 US Patent No. 5,736,372 revela una matriz fibrosa polimérica sintética biodegradable que contiene condrocitos para la producción *in vivo* de una estructura cartilaginosa funcional que se utiliza en revestimiento de la articulación.
- US Patent No. 5,948,429 revela un método de preparación de una espuma de biopolímero que comprende la formación de una solución de biopolímero, reticulado de dicha solución con radiación ultravioleta y posteriormente el liofilizado para formar una estructura reticular.
- 40 US Patent No. 5,443,950 se relaciona con un método para la implantación de una variedad de tipos de células que crecen en una matriz celular tri dimensional, que ha sido inoculada con células estromales para formar una matriz estromal tri dimensional. Además se revela en US Patent No. 5,842,477 un método de reparación del cartílago *in vivo*, mediante la implantación de un armazón biocompatible tri-dimensional en combinación con tejido del periostio/pericondrio y células estromales, con o sin agentes bioactivos, para la producción de nuevo cartílago en el
- 45 sitio del implante. El armazón utilizado se selecciona de un grupo que consiste de materiales biodegradables o no-biodegradables.
- Existe una necesidad insatisfecha de un tratamiento de los defectos de tejido, incluyendo pero no limitado a aquellos encontrados en cartílago y hueso enfermo o lesionado. En ninguna parte del oficio anterior se enseña o sugiere que los parámetros mecánicos y físicos de matrices liofilizadas compuestas de proteínas del plasma se pueden controlar por el uso de componentes auxiliares o aditivos, que pueden ser retirados después de la matriz se forma, con el fin de mejorar las propiedades biológicas de la matriz. Las matrices de la invención son útiles para el crecimiento celular, como un implante per se y/o como un implante portador de células, apropiado para el trasplante.
- 50

## Resumen de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar una matriz porosa que sea útil como un soporte para el crecimiento de células, tanto *in vitro* como *in vivo*. Es otro objeto de la presente invención proporcionar una matriz que es biodegradable y no inmunogénica. Incluso otro objeto de la presente invención es proporcionar una matriz porosa que es útil como un implante per se, o como un implante portador de células para reparar tejido dañado por enfermedad o trauma. Es otro objeto de la presente invención proporcionar un método de promover el crecimiento y la reparación del cartílago *in vivo*. Es incluso otro objeto de la presente invención proporcionar métodos de preparación de dicha matriz.

Estos y otros objetos se cumplen por la invención revelada en este documento.

10 Aunque numerosas biomatrices que comprenden varias proteínas del plasma o tejido se conocen en el oficio anterior, ninguna ha demostrado ser completamente satisfactoria en el cumplimiento del criterio necesario para la ingeniería de tejido exitosa. La matriz porosa revelada en este documento, también denominada como una esponja, tiene la peculiaridad, que la hace particularmente ventajosa para soportar y promover el crecimiento celular tanto *in vivo* como *in vitro*. Entre las propiedades ventajosas de las matrices de la invención:

15 1. Las matrices se pueden formar exitosamente con proteínas purificadas parcialmente, tales como fracciones crudas de proteínas del plasma.

2. Las proteínas del plasma se pueden recuperar de material autólogo, eliminando así la necesidad de fuentes de sangre mezcladas con los riegos de salud concomitantes.

20 3. Las matrices tienen propiedades mecánicas superiores, controladas variando los componentes auxiliares utilizados en la composición. Las propiedades deseables incluyen resistencia a la tracción, elasticidad, compresibilidad, resistencia a la cizalla, moldabilidad.

4. Las matrices tienen propiedades físicas superiores, controladas por la variación de los componentes auxiliares utilizados en la composición. Las propiedades deseables incluyen textura, tamaño de poro y uniformidad de poros, carga y distribución de carga, hidrofiliidad, adhesión, humectabilidad.

25 5. Las matrices tienen propiedades biológicas superiores, controladas por la variación de los componentes auxiliares utilizados en la composición. Las propiedades deseables incluyen biodegradabilidad, falta de inmunogenicidad, la capacidad de mantener y promover el crecimiento, proliferación, diferenciación y migración celular.

Ahora se revela por primera vez que la peculiaridad y propiedades deseables de las matrices se pueden controlar por el uso de componentes auxiliares, algunos de los cuales pueden ser considerados detrimento al posterior soporte del crecimiento y de la proliferación celular. Por lo tanto, de manera explícita tiene la intención de ser entendido que estos componentes se utilizan en los procesos de generación y formación de las matrices liofilizadas, y luego se retiran según sea necesario. Las matrices liofilizadas se pueden rehidratar y lavar para eliminar cualquiera de tales aditivos que son perjudiciales para el crecimiento celular, proporcionando de esta manera matrices de proteína del plasma optimizadas con las propiedades mecánicas y biológicas deseadas para el uso previsto, esencialmente libre de los componentes perjudiciales para el crecimiento celular. Las matrices lavadas se pueden utilizar directamente o volver a liofilizar antes del uso.

Los sustituyentes esenciales de las matrices de la invención son fibrina, obtenidos por la interacción de fibrinógeno y trombina, en la presencia de iones de calcio y Factor XIII; agentes anti-fibrinolíticos, como se conocen bien en el oficio, seleccionados de inhibidores de la proteína serina, especialmente inhibidores de la plasmina, particularmente ácido tranexámico. Otros antifibrinolíticos se pueden utilizar, solos o en combinación, incluyendo aprotinina,  $\alpha$ -2-macroglobulina, inhibidor de  $\alpha$ -2-plasmina, inhibidor del activador del plasminogen y otros agentes naturales o sintéticos. Estos componentes esenciales, con o sin cualquier aditivo opcional, se liofilizan para obtener una matriz similar a la esponja elástica, sustancialmente en la ausencia de agentes quelantes orgánicos, sin el mínimo requisito del contenido de agua residual. Los componentes auxiliares incluyen varios polímeros que imparten las propiedades deseadas como se detalla anteriormente. Los polímeros preferidos se pueden seleccionar de: polisacáridos, actualmente ácido hialurónico más preferido; polisacáridos aniónicos, actualmente siendo más preferidos los polisacáridos sulfatados, actualmente siendo más preferido el dextrán sulfato; glicosaminoglicanos, u otros polímeros tales como polietileno glicoles o combinaciones de estos. Adicionalmente, el glicerol se puede adicionar en conjunción con uno o más de las componentes anteriores.

50 La presente invención proporciona una matriz económica, biodegradable, no-inmunogénica tri-dimensional de proteínas derivadas del plasma. En modalidades actualmente preferidas de la presente invención, la matriz comprende proteínas del plasma a partir de plasma alogénico, más preferiblemente de plasma autólogo. De acuerdo con una modalidad de la presente invención, al menos una de las proteínas del plasma utilizada de preparación la

matriz se deriva del plasma autólogo. De acuerdo con otra modalidad de la invención todas las proteínas del plasma se derivan de plasma autólogo. Sin embargo, las proteínas del plasma a partir de cualquier fuente inmunológicamente o de otra forma apropiada se pueden utilizar, así como péptidos o proteínas diseñadas que tienen la capacidad para formar, sobre la reacción con la trombina y el factor XIII, una coagulación de la proteína del plasma. De esta manera, en una modalidad de la invención, las proteínas del plasma utilizadas en la presente invención incluyen al menos fibrinógeno y factor XIII. Estos componentes se pueden purificar de una fuente de plasma o se puede utilizar de una fuente disponible comercialmente, incluyendo proteínas nativas o recombinantes.

En una modalidad de la presente invención la matriz de proteína del plasma es una esponja que tiene resistencia a la tracción de al menos 0.2 kPa y 2 mm de deformación, determinada como se describe en este documento a continuación. La esponja de la matriz de la invención puede tener poros irregulares o poros sustancialmente regulares. En la especificación y las reivindicaciones el término, poros sustancialmente regulares, significa que la mayoría de los poros o más preferiblemente sustancialmente todos los poros están en el mismo rango de tamaño. Las matrices más preferidas de acuerdo con la invención tienen poros de un diámetro en el rango de 50-300 micrones. En la actualidad, las modalidades más preferidas de acuerdo con la presente invención son matrices de esponja de proteína del plasma con tamaño de poros en el rango de 100-200  $\mu\text{m}$ .

La matriz de la proteína del plasma, que tiene las propiedades mecánicas y estructurales especificadas anteriormente se pueden obtener por cualquier método apropiado, el método que se prefiere actualmente es la liofilización de un coagulo de la proteína del plasma.

En una modalidad de la invención, la matriz de plasma se prepara por la mezcla de las proteínas del plasma con la trombina en la presencia de cloruro de calcio bajo condiciones apropiadas para lograr la coagulación; fundición o moldeo de la mezcla de proteínas del plasma y trombina en un soporte sólido antes de lograr la coagulación; la congelación de la mezcla coagulada; y la liofilización de la mezcla coagulada. Por otra parte, la solución de trombina se puede verter en un molde, la solución de fibrinógeno se adiciona y se mezcla para homogeneizar; la mezcla coagulada se congela y liofiliza.

El método de preparación de una matriz de proteínas del plasma útil como un armazón para el crecimiento de las células, como un armazón para la implantación *in vivo* o *in situ* comprende las siguientes etapas:

mezcla de las proteínas del plasma con la trombina en la presencia de iones de calcio y al menos un agente anti-fibrinolítico bajo condiciones apropiadas para lograr la coagulación, en la ausencia sustancial de agentes quelantes orgánicos, y opcionalmente la adición de al menos un componente auxiliar;

moldear la mezcla de proteínas del plasma y trombina en un soporte sólido antes de lograr la coagulación;

congelación de la mezcla coagulada; y

liofilización de la mezcla coagulada, para obtener una esponja que no tenga más de 3% de humedad residual.

En una modalidad particular ejemplar, las proteínas del plasma a una concentración de 30-50 mg/ml se mezclan con al menos 0.5 unidades, preferiblemente 1.5 unidades de trombina por mg total de proteína del plasma, y luego la mezcla se congela a  $-70^{\circ}\text{C}$ , por aproximadamente 16 horas y se liofiliza durante al menos 16 horas, preferiblemente 24 horas.

En su forma final antes del uso con células la esponja es sustancialmente seca y contiene menos del 10% de humedad residual, más preferiblemente menos del 5% de humedad residual y más preferiblemente menos del 3% de humedad residual.

En otra modalidad preferida, la esponja de la presente invención contiene componentes auxiliares que pueden modificar ciertas propiedades de la esponja incluyendo propiedades físicas, mecánicas y/o biológicas. La adición de los componentes auxiliares, imparte características superiores a la esponja. Los componentes auxiliares se adicionan a las proteínas del plasma antes de la formación de un coagulo. Una modalidad actualmente preferida, de acuerdo con la presente invención es una esponja que contiene dextrán sulfato. Una modalidad actualmente más preferida, de acuerdo con la presente invención es una esponja que contiene ácido hialurónico. Una modalidad actualmente más preferida, de acuerdo con la presente invención es una esponja que contiene ácido hialurónico y glicerol.

En incluso otra modalidad preferida, los aditivos que imparten propiedades benéficas a la esponja se retiran y la esponja se liofiliza para eliminar toda la humedad. Una vez la esponja se funde y se liofiliza, los aditivos no se necesitan más y pueden ser retirados de la esponja. Una modalidad actualmente preferida proporciona una esponja preparada que contiene al menos uno, como se describe anteriormente, en donde la esponja se lava después de la etapa de congelación-liofilización y la esponja se vuelve a liofilizar para eliminar la humedad residual.

- La presente invención también proporciona la introducción de polímeros sintéticos adicionales en la esponja, durante el procedimiento de preparación. Estos polímeros pueden cambiar las propiedades físicas, mecánicas y/o biológicas de la esponja. Los polímeros pueden ser no-biodegradables o biodegradables. Ejemplos de materiales no-degradables incluyen politetrafluoroetileno, polímeros perfluorinados tales como etileno propileno fluorinado, polipropileno, polietileno, polietileno teraftalato, silicona, goma de silicona, polisulfona, poliuretano, policarboxilato no-degradable, policarbonato no-degradable, poliéster no-degradable, poliacrílico, polihidroximetacrilato, polimetilmetacrilato, poliamida tal como poliesteramida, y copolímeros, copolímeros en bloque y mezcla de los materiales anteriores.
- Ejemplos de materiales degradables incluyen poliésteres hidrolizables tales como ácido poliláctico y ácido poliglicólico, poliortoésteres, policarboxilatos degradables, policarbonatos degradables, policaprolactonas degradables, polianhídrido, y copolímeros, copolímeros en bloque y mezcla de los materiales anteriores. Otros componentes incluyen agentes tensoactivos incluyendo la lecitina.
- La matriz de proteína del plasma de la invención es útil, *inter alia*, como un soporte ventajoso inesperadamente para el crecimiento celular. La matriz de la presente invención es una superficie biocompatible útil para el cultivo de tejidos, tal como para el crecimiento de células mesenquimales, condrocitos, osteocitos y osteoblastos, células epiteliales, células neuronales, hepáticas, renales, pancreáticas y cualquier otro tipo de células que se desee cultivar dentro de un soporte tri dimensional.
- Además se proporciona por la presente invención un implante portador de las células para el trasplante de células *in vivo*. De acuerdo con una modalidad actualmente preferida de la presente invención, la matriz es una esponja que comprende proteínas del plasma capaces de apoyar la proliferación de una variedad de tipos de células. Preferiblemente, la esponja se inocula con células y las células se dejan proliferar *in vitro* antes de la implantación *in vivo*. Por otra parte, la esponja se deja absorber de las células que han sido cultivadas o cosechadas y la esponja que contiene las células se implanta *in vivo*.
- Adicionalmente, también se incluye la introducción en la esponja de un componente auxiliar que es un agente bioactivo seleccionado de factores de crecimiento, citoquinas, enzimas, agentes anti-microbianos, anti-inflamatorios.
- Los agentes bioactivos, por ejemplo, factores de crecimiento, factores angiogénicos, y similares, son ventajosos para estimular un crecimiento de las células más rápido dentro del implante, o una más rápida vascularización del implante.
- El implante consiste de un armazón de proteína del plasma que lleva las células a una densidad que es al menos  $10^4$  (diez mil) células por  $\text{cm}^3$ , preferiblemente  $10^5$  células por  $\text{cm}^3$ , más preferiblemente  $10^6$  células por  $\text{cm}^3$ . En un ejemplo no limitante, un implante para el trasplante de condrocitos a un sitio de daño del cartílago consiste de un armazón de proteína del plasma 300 $\mu\text{l}$ , que tiene un volumen aproximado de 0.2  $\text{cm}^3$ , que tiene  $10^4$  condrocitos sembrados en este, antes de un periodo de incubación de 2 - 3 días. Preferiblemente, un armazón de proteína del plasma para el trasplante de condrocitos que comprende proteínas autólogas de plasma y condrocitos autólogos, se utiliza como un implante para el trasplante. En una modalidad particular de la invención un armazón de proteína del plasma para el trasplante de condrocitos comprende una esponja de fibrina que tiene un tamaño de poro sustancialmente regular de 50-300  $\mu\text{m}$  y a 0.2 kPa. La matriz de proteína del plasma de la invención se puede cortar en secciones de tamaño y forma deseados para ajustarlas a la zona afectada antes de la siembra con las células o antes de implantación.
- El armazón de proteína del plasma, también se puede utilizar como un implante per se, para proporcionar el soporte mecánico a un sitio lesionado o defectuoso *in situ* y/o para proporcionar una matriz dentro de la cual las células del sitio lesionado o defectuoso proliferan y se diferencian. Por ejemplo, para la reparación del cartílago, la matriz de proteína del plasma se puede utilizar en conjunción con otros procedimientos terapéuticos incluyendo afeitado condral, condroplastia por abrasión o laser, técnicas de microfractura o perforación.
- La matriz de proteína del plasma de la invención, que es un armazón efectivo que soporta el crecimiento celular, además se puede utilizar *in vivo* en cirugía reconstructiva, por ejemplo como una matriz para regenerar células y tejidos incluyendo células neuronales, tejido cardiovascular, células uroteliales y tejido mamario. Algunas aplicaciones ortopédicas típicas incluyen revestimiento de las articulaciones, reparación de meniscos, reconstrucción craneofacial o reparación de un disco intervertebral. Adicionalmente, la matriz de proteína del plasma se puede utilizar como un recubrimiento sobre implantes sintéticos o de otro tipo, tales como clavos y placas, por ejemplo, en procedimientos de reemplazo de cadera. De esta manera, la presente invención además proporciona implantes o dispositivos médicos recubiertos, que contienen la matriz de proteína del plasma de la invención.

## Breve descripción de las figuras

La presente invención se entenderá y apreciará más completamente a partir de la siguiente descripción detallada tomada en conjunción con las figuras en las cuales:

5 Figuras 1A - D muestran una esponja de fibrina preparada de acuerdo con una modalidad de la invención antes de que sea liofilizada, después de la liofilización, preparada utilizando baja concentración de fibrinógeno o alta concentración de fibrinógeno y se compara con una esponja de colágeno comercialmente;

Figura 2A y 2B representan propiedades mecánicas de las esponjas;

Figura 3A y 3B muestra la velocidad de disolución de esponjas de fibrina en urea;

10 Figuras 4A - D muestran condrocitos cultivados sobre la matriz de proteína del plasma de acuerdo con una modalidad de la invención;

Figura 5 es una gráfica que muestra el contenido de glicosaminoglicano (GAG) de células cultivadas en una esponja de proteína del plasma de acuerdo con una modalidad de la invención se compara con células cultivadas en un coágulo de fibrina y sobre una esponja de colágeno disponible comercialmente;

15 Figura 6 muestra la proliferación de condrocitos articulares en la presencia de la esponja de proteína del plasma y colagenasa;

Figura 7 muestra los resultados de la implantación de una esponja de proteína del plasma en cabras.

## Descripción detallada de la invención

20 La presente invención se relaciona con una matriz de proteínas liofilizada, biocompatible, biodegradable derivadas del plasma. La matriz de acuerdo con una modalidad de la invención es útil en métodos para regenerar y/o reparar varios tejidos *in vivo*, por ejemplo en métodos de ingeniería de tejido, y para el crecimiento de las células *in vitro*.

25 La matriz de la presente invención se puede utilizar en métodos de cirugía reconstructiva para regenerar y/o reparar tejido que se ha dañado por ejemplo por trauma, procedimientos quirúrgicos o enfermedad. La presente invención proporciona una matriz para utilizar como un almacén implantable per se, para la regeneración del tejido. De acuerdo con una modalidad actualmente preferida de la invención, la matriz sirve tanto como un soporte físico como un sustrato adhesivo para células aisladas durante el cultivo *in vitro* y la posterior implantación. Como las poblaciones de las células trasplantadas crecen y las células funcionan normalmente, comienzan a secretar su propio soporte de matriz extracelular (ECM). El polímero del almacén se selecciona para que se degrade, según disminuye la necesidad de un soporte artificial.

30 Las aplicaciones del almacén, incluyen la regeneración de tejidos tales como neuronal, musculoesquelético, cartilaginoso, tendinoso, hepáticos, pancreático, renal, ocular, arteriovenoso, urinario o cualquier otro tejido que forma órganos sólidos o huecos. En una cierta modalidad de la presente invención, las células madre derivadas de cualquier tejido o inducidas para diferenciar en un tipo de tejido específico se pueden utilizar. Preferiblemente las células se derivan de tejido autólogo. Por ejemplo, para el cultivo de cartílago, condrocitos o células mesenquimales madre se pueden sembrar en la matriz. En modalidades específicas de la invención, los condrocitos o células progenitoras de condrocitos se pueden sembrar en la matriz antes de la implantación o en el sitio del implante *in vivo*. Adicionalmente, la célula de interés se puede diseñar para expresar un producto génico el cual podría ejercer un efecto terapéutico, por ejemplo péptidos o proteínas anti-inflamatorios, factores de crecimiento que tienen efectos angiogénicos, quimiotácticos, osteogénicos o proliferativos. Un ejemplo no-limitativo de células de ingeniería genética para incrementar la cicatrización se revela en US Patent No. 6,398,816.

40 No obstante, en otras modalidades de la invención, la matriz se puede utilizar como un recubrimiento de implantes sintéticos y de otro tipo o de dispositivos médicos. La matriz de la invención se puede aplicar a implantes tales como clavos o placas mediante métodos de recubrimiento o de adherencia conocidos por aquellos de habilidad en el oficio. El recubrimiento con la matriz, es capaz de soportar y facilitar el crecimiento celular, por lo tanto, puede ser útil para proporcionar un ambiente favorable para el implante.

45 Para la comodidad y claridad ciertos términos empleados en la especificación, los ejemplos y las reivindicaciones se describen a continuación.

"Plasma" como se utiliza en este documento se refiere al fluido, porción no-celular de la sangre de humanos o animales como se encuentra antes de la coagulación.

"Proteína del plasma" como se utiliza en este documento se refiere a la proteína soluble encontrada en el plasma de los humanos o animales normales. Estos incluyen pero no se limitan a proteínas de coagulación, albúmina, lipoproteínas y proteínas complementarias.

5 Una "matriz" como se utiliza en este documento, se refiere a una estructura porosa, sustancia biodegradable sólida o semi-sólida que tiene poros o espacios lo suficientemente grandes para permitir que las células pueblen, o invadan, la matriz. Los materiales que forman la matriz pueden necesitar la adición de un agente de polimerización para formar una matriz, tal como adición de trombina a una solución que contiene fibrinógeno para formar una matriz de fibrina. La matriz de proteína del plasma de la presente invención se puede indicar aquí como un armazón o como una esponja, para el cultivo de células, como un implante de reemplazo de tejido o como un implante de reemplazo de tejido portador de células.

El término "biocompatible", como se utiliza en este documento se refiere a materiales que tienen baja toxicidad, reacciones aceptables a un cuerpo extraño en el cuerpo vivo, y afinidad con tejidos vivos.

15 El término "portador de células" como se utiliza en este documento se refiere a la capacidad de la matriz para permitir que las células se mantengan dentro de la estructura que se hace referencia. Preferiblemente, las células son capaces de proliferar e invadir los poros de la matriz.

20 Este término "implantación" se refiere a la inserción de una esponja de la invención en un paciente, por lo cual el implante sirve para reemplazar, completa o parcialmente, el tejido que se ha dañado o retirado. Otro aspecto de implantación también se entiende que significa el uso de la esponja como un vehículo para transportar fármacos terapéuticos a un sitio determinado en un paciente. En este aspecto también se incluye la introducción en la esponja de un componente auxiliar que es un agente bioactivo seleccionado de factores de crecimiento, citoquinas, enzimas, agentes anti-microbianos, anti-inflamatorios.

25 Los agentes bioactivos, por ejemplo, factores de crecimiento, factores angiogénicos, y similares, son ventajosos para estimular un crecimiento de las células más rápido dentro del implante, o una vascularización más rápida del implante. Tales factores pueden ser muy pequeños para ser retenidos efectivamente dentro de la esponja y por lo tanto se introducen en la forma de microcápsulas de liberación lenta o de liberación controlada en la esponja para asegurar su efectividad.

30 El "tamaño de poro" de un poro dentro de una esponja de proteína del plasma se determina, utilizando la ecuación:  $P=(L \times H)^{1/2}$  en donde, L y H son la longitud y altura media de los poros, respectivamente, como se determina por el análisis microscópico de las diferentes esponjas. El "espesor de la pared del poro" es un parámetro que caracteriza la distancia entre los poros dentro de una esponja y es indicativo de la microestructura de las esponjas. Se determina por la medición a un nivel microscópico.

35 "Agente tensoactivo" se refiere a una sustancia que altera la relación energía en las interfaces, tales como, por ejemplo, compuestos orgánicos sintéticos que muestran actividad superficial, incluyendo, inter alia, agentes de humectación, detergentes, penetrantes, esparcidores, agentes dispersantes, y agentes espumantes. Ejemplos preferibles de agentes tensoactivos útiles en la presente invención son compuestos hidrofóbicos, e incluyen fosfolípidos, aceites, y fluorosurfactantes.

40 El término "seca" y variaciones del mismo, se refiere a un estado físico que se deshidrata o es anhidro, i.e., sustancialmente que carece de líquido. Las matrices de proteína del plasma de la invención, que preferiblemente tienen menos del 10% de humedad residual, más preferiblemente que tienen menos del 5% de humedad residual, más preferiblemente que tiene menos del 5% de humedad residual.

Los términos "lío-filizar" o "lío-filización" se refieren a la preparación de una composición en forma seca por congelación rápida y deshidratación en el estado congelado (algunas veces denominado como sublimación). Este proceso se puede llevar a cabo con vacío a presión de aire reducida, resultando en el secado a una temperatura inferior que la requerida a presión total.

45 Un "polisacárido aniónico" como se utiliza en este documento, es un polisacárido, incluyendo no-modificado así como derivados químicos de este, que contienen un grupo cargado negativamente (por ejemplo, grupos carboxilo a valores de pH por encima de 4.0) e incluye sales de este, tales como sales de sodio o potasio, sales de metal alcalino térreo tal como sales de calcio o magnesio. Ejemplos de polisacáridos aniónicos incluyen pectina, alginato, galactanos, galactomannanos, glucomannanos y ácidos poliurónicos.

50 Ejemplos de polisacáridos sulfatados incluyen heparina, sulfato de condroitina, dextrán sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato, keratan sulfato, hexuronil hexosaminoglican sulfato, inositol hexasulfato, sacarosa octasulfato. Los derivados y miméticos de los anteriores tienen la intención de ser incluidos en la invención.



El término "cartílago" como se utiliza en este documento, se refiere a un tipo especializado de tejido conectivo que contiene condrocitos incrustados en una matriz extracelular. La composición bioquímica del cartílago difiere de acuerdo con el tipo pero en general comprende colágeno, predominantemente colágeno tipo II, junto con otros tipos menores, por ejemplo, tipos IX y XI, proteoglicanos, otras proteínas, y agua. Varios tipos de cartílago se reconocen en el oficio, incluyendo, por ejemplo, cartílago hialino, cartílago articular, cartílago costal, cartílago fibroso, cartílago meniscal, cartílago elástico, cartílago auricular, y cartílago amarillo. La producción de cualquier tipo de cartílago tiene la intención de caer dentro del alcance de la invención.

El término "condrocitos" como se utiliza en este documento, se refiere a células que son capaces de producir los componentes de tejido cartilaginoso.

Una "ausencia sustancial de agentes quelantes orgánicos" se refiere a una concentración menor de 1 mm, por ejemplo menos de 1mm de EDTA.

En una modalidad actualmente preferida de la presente invención una matriz de proteína del plasma se proporciona. La matriz de este tipo se puede producir de acuerdo con la invención por la exposición de una solución de proteína del plasma que contiene un agente antifibrinolítico para una solución de trombina, sometiendo dicha mezcla a congelación y liofilización para producir una matriz similar a una esponja.

US Patent No. 6,310,267 revela un proceso de preparación específico de una red de fibrina flexible biodegradable para la cicatrización de una herida. El proceso requiere la dialización de una solución de fibrinógeno con una solución que contiene quelantes y que forma la red flexible por la adición de una solución de trombina, la liofilización y la liofilización de la red.

En contraste con las redes de fibrina del oficio anterior, los actuales inventores han descubierto inesperadamente que una matriz biocompatible, tri-dimensional (3D) similar a una esponja, se puede preparar de una solución cruda de proteína del plasma. Un armazón de proteína del plasma o esponja con propiedades ventajosas incluyendo la adherencia al tejido, tamaño de poro y biocompatibilidad se obtiene después de la dialización con cualquier agente complejante orgánico. De acuerdo con una modalidad actualmente preferida de la presente invención la solución de proteína del plasma deriva de plasma alogénico. De acuerdo con una modalidad actualmente más preferida de la presente invención, al menos uno de los componentes, preferiblemente las proteínas del plasma, utilizado para la preparación de la matriz se deriva del plasma autólogo. De acuerdo con otra modalidad de la presente invención, todos los componentes utilizados en la preparación de la matriz son autólogos. Las proteínas del plasma, se pueden aislar mediante una variedad de métodos, según se conoce en el oficio y se ejemplifica en este documento a continuación, resultando en una matriz de proteína del plasma que tiene sustancialmente similares propiedades, según se determina por tamaño de poro, elasticidad, compresión y capacidad de portar las células. Un componente de trombina estable se pueden aislar de plasma autólogo, de acuerdo con los métodos conocidos en el oficio por ejemplo aquellos revelados en US Patent No. 6,274,090 y Haisch et al (Med Biol Eng Comput 38:686-9, 2000).

La matriz de proteína del plasma resultante muestra propiedades ventajosas incluyendo biocompatibilidad, tamaño de poro compatible con la invasión y proliferación celular y capacidad a ser moldeada o fundida en formas definidas.

En una modalidad actualmente preferida de la presente invención, la sangre se extrae de un paciente con necesidad de reparación o regeneración del tejido, las proteínas del plasma se aíslan a partir del plasma autólogo y una matriz preparada de estos. La matriz de la presente invención puede servir como un soporte o armazón per se o como un armazón portador de las células para la implantación *in vivo*.

Aunque no desea ser limitada por ninguna teoría particular, la sustancial ausencia de agente complejante orgánico puede proporcionar la matriz de la presente invención con propiedades beneficiosas a la proliferación y metabolismo de ciertos tipos de células. Como se muestra en los ejemplos en este documento, la matriz de la presente invención apoya la proliferación de las células de cartílago en tanto sistemas *in vivo* como *in vitro*.

La presencia de ciertos agentes complejantes orgánicos en un rango de 1 a 20 mM, necesarios para la producción de una red de fibrina flexible revelada en US 6,310,267 para la cicatrización de una herida, puede en sí misma tener un efecto perjudicial en la proliferación de ciertos tipos de células. El uso de una red de fibrina para el crecimiento y la proliferación celular, *in vivo* o *in vitro*, no ha sido revelado. No obstante, puede ser posible cultivar ciertos tipos de tipos de células utilizando las redes de la patente mencionada anteriormente.

De acuerdo con una modalidad actualmente preferida de la presente invención una esponja de fibrina producida de una solución de fibrinógeno, en donde la solución de fibrinógeno se somete a diálisis con una solución, no necesita de un agente complejante, sirve como un armazón para el crecimiento de células *in vitro* y *in vivo*. En otro aspecto la esponja de fibrina se forma por la acción de una solución de trombina sobre la solución dializada de fibrinógeno y posteriormente se somete al liofilizado. Preferiblemente, la esponja de fibrina se siembra con las células deseadas, las células se dejan proliferar y la esponja que comprende las células implantadas en un sitio con necesidad de

reparación o regeneración del tejido. Más preferiblemente las células se siembran sobre la esponja en combinación con agentes bioactivos beneficiosas para la proliferación de dichas células.

5 En la reconstrucción de tejidos estructurales como cartílago y hueso, la forma del tejido es esencial para la función, que requiere el moldeo de la matriz en artículos de configuración tri dimensional de espesor y forma variables. En consecuencia, la matriz de plasma formada se puede producir para asumir una forma específica incluyendo una esfera, cubo, vara, tubo o una lámina. La forma se determina por la forma de un molde o soporte que se puede hacer de cualquier material inerte y puede estar en contacto con la matriz en todas las partes, como por una esfera o cubo, o en un número limitado de partes como por una lámina. La matriz se puede formar en la forma de órganos o partes corporales y constituyen prótesis. La eliminación de porciones de la matriz con tijeras, un bisturí, un rayo láser  
10 o cualquier otro instrumento de corte puede crear cualquier perfección necesaria en la estructura tri-dimensional.

15 La matriz de polímero se debe configurar para proporcionar tanto los sitios adecuados para la fijación y adecuar la difusión de nutrientes a partir del cultivo celular para mantener la viabilidad y el crecimiento celular hasta que la matriz se implante y la vascularización haya ocurrido. La invasión celular se necesita por las células que pueden establecer el tejido para reemplazar el implante y de esta manera reparar cualquier defecto, para el cual el implante se destina para la reparación. El fracaso al invadir la estructura del implante de una manera eficiente previene la vascularización, la que se necesita, para que el tejido nuevo sea capaz de mantener su vida.

20 La matriz de proteína del plasma de acuerdo con otras modalidades de la invención, se puede utilizar como una matriz para el crecimiento de las células o cultivo de tejido *in vitro*. Como se muestra en los ejemplos a continuación, la matriz de la invención es una esponja de proteína del plasma. En su forma húmeda, antes del secado, la matriz es un coagulo. En una forma seca, la matriz es una esponja. Las matrices de la invención proporcionan un área superficial relativamente grande para que las células crezcan y un armazón mejorado mecánicamente para la implantación.

De esta manera, las matrices de la invención son útiles como productos para aplicaciones *in vitro* e *in vivo*.

25 La matriz de proteína del plasma, en su forma seca, se adhiere excepcionalmente bien a las superficies del tejido. De acuerdo con una modalidad de la presente invención, una esponja seca de la invención se coloca en la zona donde la regeneración del tejido se desea. Una segunda esponja, en la que las células particulares fueron cultivadas, se coloca en la parte superior de la esponja seca. La esponja humedecida de la invención se adhiere bien a la esponja seca de la invención. Durante el proceso de cicatrización, las células a partir de la esponja en la que las células fueron originalmente cultivadas migran en la esponja que se adhiere directamente a la zona de  
30 regeneración del tejido. Este sistema obvia la necesidad de goma biológica en los casos donde la esponja humedecida no se adhiere bien.

35 De acuerdo con ciertas modalidades de la invención, la matriz de proteína del plasma se utiliza como un soporte para el crecimiento de condrocitos y como un armazón para la formación de neo cartilagos. Sin embargo, la matriz de plasma de la invención se puede utilizar como una superficie útil para el cultivo de tejido de cualquier célula apropiada, tal como células mesenquimales u otras células de formación de tejido en diferentes niveles de potencia. Por ejemplo, las células comúnmente denominadas como "células madre" o "células mesenquimales madre", son células pluripotentes, o linaje-no comprometido, que potencialmente son capaces de un número no limitado de divisiones mitóticas para renovar ya sea una línea o para producir la progenie de las células con la capacidad para diferenciar en cualquier tipo de célula se puede cultivar en la matriz de la invención. Además, las "células progenitoras" linaje-comprometido, se pueden cultivar en la matriz de la invención. Una célula progenitor linaje-comprometido generalmente se considera que es incapaz de un número no limitado de divisiones mitóticas y eventualmente se diferenciará solo en un tipo de célula específico.

45 Será apreciado que la matriz de la invención pueda soportar el crecimiento y/o la implantación de cualquier tipo de cartílago u otro tejido apropiado. Adicionalmente, aunque la invención se dirige predominantemente a los métodos para el crecimiento y/o la implantación de tejido en humanos, la invención también puede incluir métodos para el crecimiento y/o la implantación de tejidos en cualquier mamífero.

50 Los métodos para la siembra de células en la matriz son múltiples. En un ejemplo no limitante, las células se adsorben colocando las células en la superficie de la matriz o se absorben en la matriz colocando la esponja en una solución que contiene células. Preferiblemente la matriz se siembra con las células deseadas mediante la siembra de la superficie, a una densidad de  $10^4$  células por  $\text{cm}^3$ , más preferiblemente  $10^5$  células por  $\text{cm}^3$ .

#### Aditivos

La matriz de la invención, en ciertas modalidades además puede incluir uno o más antisépticos, tales como azul de metileno, y/o uno o más fármacos incluyendo antimicrobianos tales como antibióticos y agentes antivirales; agentes

quimioterapéuticos; agentes anti-rechazo; analgésicos y combinaciones de analgésicos; agentes anti-inflamatorios y hormonas tales como esteroides.

5 En otras modalidades de la presente invención, la matriz de proteína del plasma incluye componentes que modulan las propiedades mecánicas, físicas y biológicas incluyendo elasticidad, tamaño de poro, adhesión superficial y capacidad para mantener el crecimiento y la proliferación celular. Estos incluyen materiales que pertenecen a la familia de polisacáridos, polisacáridos aniónicos, glicosaminoglicanos, o polímeros sintéticos, incluyendo ácido hialurónico, pectina, alginato, galactanos, galactomannanos, glucomannanos, ácidos poliurónicos, heparina, sulfato de condroitina, dextrán sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato, queratina sulfato, hexuronil hexosaminoglicano sulfato, inositol hexasulfato, sacarosa octasulfato y PEG. Preferiblemente la esponja se prepara con tales componentes auxiliares tales como dextrán sulfato, PEG, glicerol y/o ácido hialurónico.

Además, los agentes anti-fibrinogénicos incluyendo ácido tranexámico se pueden incluir en la matriz de la invención. Estos compuestos previenen la fibrinólisis y de esta manera se pueden utilizar para controlar la velocidad de degradación de fibrina *in vivo*. El ácido tranexámico se puede adicionar a una concentración final que oscila entre 1% a 10%, preferiblemente 5%.

15 Agentes bioactivos, tales como citoquinas, factores de crecimiento y sus activadores etc., se pueden incluir en la matriz de la invención, o adicionar a las células que se siembran en la matriz por ejemplo, con el fin de incrementar un efecto terapéutico. La incorporación de tales agentes en la esponja de la presente invención proporciona un mecanismo de liberación lenta o de liberación controlada. Por ejemplo, factores de crecimiento, proteínas estructurales o citoquinas que potencian la secuencia temporal de reparación de heridas, alteran la velocidad de proliferación o incrementan la síntesis metabólica de proteínas de matriz extracelular, son útiles aditivos para la matriz de la presente invención. Las proteínas representativas incluyen factores de crecimiento de huesos (BMPs, IGF) y factores de crecimiento de fibroblastos, incluyendo FGF2, FGF9 y FGF18 para la cicatrización de hueso y de cartílago, genes del factor de crecimiento de cartílago (CGF, TGF- $\beta$ ) para la cicatrización de cartílagos, genes de factor de crecimiento nervioso (NGF) y ciertos FGFs para la cicatrización de nervios, y factores de crecimiento generales tal como factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), factor de crecimiento de queratinocito (KGF), suplemento de crecimiento derivado endotelial (EDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y otras proteínas que pueden potenciar la acción de los factores de crecimiento, incluyendo heparina sulfato proteoglicanos (HSPGs) sus miméticos tales como dextrán sulfato, sacarosa octasulfato o heparina, y fragmentos de estos. Otros factores que demostraron, que actúan en las células formadoras de hueso, cartílago u otro tejido conectivo incluyen retinoides, la hormona de crecimiento (GH), y transferrina. Las proteínas específicas para la reparación del cartílago incluyen factor de crecimiento de cartílago (CGF), FGFs y TGF- $\beta$ .

Las proteínas de la invención son polipéptidos o derivados o variantes de estos, obtenidos de fuentes naturales, sintéticas o recombinantes, que muestran la capacidad para estimular la síntesis de ADN y división celular *in vitro* de una variedad de células, incluyendo fibroblastos primarios, condrocitos, células endoteliales de la córnea y vasculares, osteoblastos, mioblastos, músculo liso y células neuronales.

Adicionalmente, las células genéticamente modificadas para expresar las proteínas mencionadas anteriormente se incluyen en la presente invención. Los ejemplos preferidos para la reparación del cartílago utilizan células del periostio, células mesenquimales madre o condrocitos per se o transfectados con genes del factor de crecimiento de cartílago seleccionado de un grupo incluyendo la transformación del factor de crecimiento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ciertos FGFs o CGF; en la reparación del hueso se utilizan células del periostio u otras células mesenquimales madre u osteocitos/osteoblastos per se o transfectados con genes del factor de crecimiento del hueso seleccionados de un grupo que incluye los genes de la familia de proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) o genes de la familia del factor de crecimiento de fibroblasto; para la reparación de nervios se utilizan las células neurales y células de soporte neural per se o transfectadas con genes seleccionados de un grupo que incluye el gen del factor de crecimiento nervioso (NGF) o FGFs específicos.

Adicionalmente, se pueden mezclar enzimas específicas con la esponja de la invención con el fin de promover la degradación de los proteoglicanos y/o las proteínas presentes en el cartílago. Sin ánimo de ser limitado por la teoría, los condrocitos del cartílago se incrustan en el espesor de la matriz extracelular (ECM) de la articulación. Las enzimas conocidas en el oficio incluyendo colagenasa, hialuronidasa, tripsina, quimotripsina, condroitinasa de los diferentes tipos, degrada la ECM de la superficie de la articulación, liberando así los condrocitos que son capaces de invadir la esponja de la invención para promover la regeneración del cartílago

La matriz de plasma de la invención se demuestra como un soporte de esponja de fibrina para el crecimiento de varios tipos de células para la implantación en un sitio de tejido enfermo o traumatizado. Sin embargo, la matriz es una esponja que comprende otras proteínas del plasma y se puede utilizar per se, como un armazón implantado en el que las células proximales *in vivo* pueden inundar y crecer, o como un armazón para el crecimiento celular que se utiliza para trasplante de células a un tejido lesionado, o a cualquier otro sitio apropiado *in vivo*. De esta manera,

alguien de habilidad en el oficio puede ajustar los procedimientos ejemplificados, a continuación, de conformidad con los requisitos de tejido específicos.

Los siguientes ejemplos tienen la intención de ser solamente ilustrativos en naturaleza y deben ser interpretados de una manera no limitativa.

## 5 EJEMPLOS

### **Ejemplo 1: Aislamiento de Proteínas del Plasma de Plasma Entero**

El plasma congelado fresco fue recibido del banco de sangre (Tel-Hashomer, Israel). El plasma (220 ml) fue descongelado en una incubadora a 4°C durante la noche, seguido por centrifugación a 4°C a aproximadamente 1900g durante 30 min. El pellet fue resuspendido en 2.5ml de PBS con rodamiento suave hasta que una solución homogeneizada se vio. El ácido tranexámico (anti-fibrinolítico; 10% final) y la arginina (2% final) se adicionaron opcionalmente a la fracción de proteína del plasma.

La concentración de proteína total fue aproximadamente 42-50 mg/ml según se estima por el ensayo de Bradford y SDS-PAGE (en comparación con un estándar).

Aunque los métodos detallados se dan para la preparación de la proteína del plasma, se debe entender que otros métodos de preparación de las proteínas del plasma se conocen en el oficio y son útiles en la preparación de la matriz de la presente invención. Un ejemplo de un protocolo para la preparación de una solución enriquecida con fibrinógeno se proporciona por Sims, et al. (Plastic & Recon. Surg. 101:1580-85, 1998).

### **Ejemplo 2: Extracción de Fracciones de Proteína de Plasma de Sangre Alogénica o Autóloga**

#### Materiales:

- 1) Citrato de sodio, 3.8 % o cualquier otro anti-coagulante farmacéuticamente aceptable
- 2) Sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , saturado (500g/l)
- 3) Sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 25%
- 4) Solución reguladora EDTA-fosfato: fosfato 50 mM, EDTA 10 mM, pH 6.6
- 5) Solución reguladora Tris-NaCl: Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4
- 6) Etanol, absoluto 4°C
- 7) Sangre total (Banco de Sangre Israel, Hospital Tel Hashomer o del paciente)

#### Métodos:

Una bolsa de sangre del banco de sangre que contenía 450 ml y que contenía citrato de sodio. A los 450 ml de sangre autóloga, se le adicionaron 50 ml de una solución de citrato de sodio al 3.8% y la solución se mezcló suavemente.

La sangre-citrato de sodio fue distribuida en tubos de 50 ml (40 ml/tubo) y se centrifugó a 2,100g durante 20 min. El plasma sobrenadante se recolectó en tubos de 50 ml y se volvió a centrifugar a 5000g durante 15 min. a 4°C. El plasma sobrenadante se recolectó en un matraz, se colocó en hielo, y se le adicionó solución saturada de sulfato de amonio a una relación de un volumen de sulfato de amonio a 3 volúmenes de sobrenadante (relación de volumen 1:3). Una cantidad típica fue 75 ml de sulfato de amonio a 225 ml de plasma. La solución se conservó a 4°C durante 1.5 hrs con oscilación moderada ocasional (la agitación magnética no se permite).

El plasma sobrenadante se dividió en tubos de 50 ml (40 ml/tubo) y se centrifugó a 5000g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y cada pellet se lavó con 10 ml de solución de sulfato de amonio al 25% (el pellet no se disuelve).

Cada pellet se disolvió en 6-7 ml de la solución reguladora fosfato-EDTA. Una muestra, generalmente 100 µl de la solución, se conservó para los análisis de SDS-PAGE y de coagulación.

Los pellets disueltos fueron mezclados y la precipitación del sulfato de amonio se repitió por la adición saturada de sulfato de amonio a la muestra de plasma para lograr una relación de volumen 1:3 (Generalmente, 25 ml de sulfato de amonio con 75 ml de plasma). La solución se conservó a 4°C durante 1.5 hrs con oscilación moderada ocasional, se dividió en tubos de 50 ml y se centrifugó a 5000g durante 15 min.

- 5 El sobrenadante se descartó y los pellets se disolvieron en un volumen de solución reguladora Tris-NaCl, que fue igual a o menos del volumen de solución reguladora de fosfato-EDTA utilizada anteriormente. Una cantidad total típica fue aproximadamente 45 ml.

- 10 La muestra fue dializada (tubos de diálisis SnakeSkin™, valor de corte 3.5 kD, Pierce) por 3-4 horas o durante la noche a 4°C en 1.5 litros de solución reguladora Tris-NaCl. La muestra dializada fue centrifugada en tubos resistentes a alta velocidad a 21,000g durante 15 min a 4°C, para eliminar cualquier material insoluble. El sobrenadante fue recolectado y se conservó en hielo.

El plasma sobrenadante se dividió en tubos de 50 ml. Se le adicionó (EtOH) frío a una concentración final de 7%. (por ejemplo: 3.7 ml de EtOH a 49 ml de sobrenadante) y se conservó en hielo durante 30 min. Es esencial que las soluciones se enfríen para que el precipitado se forme.

- 15 La solución se centrifugó a 5000g durante 15 min, el sobrenadante se descartó y el pellet se disolvió en el mismo volumen de solución reguladora Tris-NaCl (generalmente una cantidad de 45 ml). La solución fue dializada durante la noche a 4°C en 1.5 litros de Solución reguladora de Tris- NaCl. La solución dializada se centrifugó a 21,000, a 4°C durante 15 min, para eliminar cualquier material no-disuelto.

- 20 Las concentraciones de proteínas, fueron determinadas utilizando el método Bradford (Bradford (1976) Anal. Biochem. 72: 248-254). Las producciones de proteína oscilan de 0.2 a 0.6 mg por ml de sangre entera, con resultados típicos de 0.4 a 0.5 mg/ml.

- 25 La capacidad de formación de coágulo se determinó por la adición de 30 µl de trombina (100 U/ml; Omrix) a 70 µl de producto de plasma (10 mg/ml), la coagulación debería ocurrir dentro de 30 seg. La pureza de la proteína se determinó por análisis electroforético de 50 µg de la muestra en un gel de SDS-poliacrilamida al 5% y la tinción utilizando azul de Coomassie.

El resto del sobrenadante fue recolectado, congelado y liofilizado hasta que seque, 48 horas.

**Ejemplo 3: Método de Preparación de la Matriz de Proteína del Plasma**

Materiales:

Ácido tranexámico (final 5%)

- 30 Cloruro de Calcio 5 mM

Trombina (1000 unidades/ml, Omrix)

Método 1:

- 35 El método para la preparación de la matriz de proteína del plasma fue optimizado para la concentración de proteína y de trombina como se muestra en la Tabla 1, a continuación. Las muestras con el prefijo "1" se probaron para la optimización de la concentración de proteína coagulable. Las muestras con el prefijo "2" se probaron para la optimización de la concentración de trombina en la esponja. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

**Tabla 1**

# de muestra	Concentración de Proteína del Plasma	Conc. de Trombina/mg de proteína
1-5	5 mg/ml	1.5 IU
1-10	10 mg/ml	1.5 IU

1-20	20 mg/ml	1.5 IU
1-30	30 mg/ml	1.5 IU
2-0.5	20 mg/ml	0.5 IU
2-4.5	20 mg/ml	4.5 IU

**Resultados-1**

Las esponjas se analizaron mediante la comparación de las propiedades físicas en seco y húmedas.

5 La esponja hecha con 5 mg/ml de proteína (muestra 1-5) se redujo significativamente después de la liofilización. Las esponjas hechas con 10 o 20 mg/ml de proteína, conservaron su estructura después de 24 horas en medio de cultivo de tejido, mientras que las otras se deformaron ligeramente. Esto no interfiere con su uso.

10 La concentración de trombina determina el tiempo de reacción para la polimerización de los monómeros de fibrina. La concentración de 0.5 U de trombina/mg de proteínas del plasma, produjo una esponja con buenas propiedades biológicas y físicas. La concentración de 1.5 U de trombina/mg de proteínas del plasma, fue elegida porque dio una reacción rápida pero permitió que las dos soluciones suficiente tiempo para mezclar a fondo antes de que la reacción se complete, pero otras concentraciones son aceptables para obtener una matriz con propiedades sustancialmente similares.

Método-2:

15 Las esponjas fueron hechas por la mezcla de una solución de proteína del plasma con una solución de trombina, moldeo, congelación y liofilización. Las proteínas del plasma humano, de diferentes fuentes: alogénica o autóloga, con varios niveles de proteínas del plasma, se utilizaron que tienen una concentración de proteína entre 20-50 mg/ml. El fibrinógeno comercial (Omrix) fue probado, también, a una concentración de 20mg/ml.

La trombina (1000 U/ml) se diluyó 1:10 en una solución de cloruro de calcio 5mM. La formulación de la esponja final incluyó ácido tranexámico a una concentración de 5% o 10% dependiendo de la fuente de proteína del plasma.

20 Las anteriores dos soluciones (proteína del plasma y trombina) se mezclaron juntas en una proporción de 21:9 respectivamente (por ejemplo 210 µl de proteína del plasma y 90 µl de solución de trombina en el siguiente orden: Una placa de ELISA de 48 pozos, se cubrió con 90 µl de solución de trombina, y la solución de proteína del plasma se le adicionó. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente (~25°C) durante 10 minutos o hasta que el coagulo se forma, seguido por congelación a -70 °C durante la noche (~ 16 h), y la liofilización bajo condiciones estériles, ~85°C hasta que se seque, durante al menos 16 horas y hasta 24h. Tener en cuenta que la concentración final de trombina fue 1.5 U/mg de proteínas del plasma. La cantidad de trombina se puede variar dependiendo de la deseada velocidad de polimerización de la matriz.

Resultados-2:

30 Las esponjas que tienen características biomecánicas sustancialmente similares y biocompatibilidad fueron obtenidas de las soluciones de proteína del plasma aisladas de las diferentes fuentes, sangre alogénica o autóloga, plasma total o fibrinógeno comercial. Estas características incluyen tamaño de poro, adherencia a la superficie, capacidad para mantener el crecimiento y la proliferación celular y biocompatibilidad. Estos resultados muestran que para la preparación de una esponja de proteína del plasma de la presente invención, un rango de métodos de preparación de la proteína del plasma y un rango de concentraciones de proteína se pueden utilizar.

**35 Ejemplo 4: Morfología del Armazón y Propiedades Mecánicas**

Las matrices para la ingeniería de tejidos en general, se caracterizan, de acuerdo con varios criterios, incluyendo naturaleza química, porosidad, adhesión, biocompatibilidad y elasticidad, entre otras (Hunziker, Osteoart. Cart., 10:432-465, 2002). La Tabla II de la referencia mencionada anteriormente enumera varias de las propiedades y las bases biológicas de estas propiedades.

40 En el laboratorio de los inventores, varias de las propiedades se han determinado. La porosidad, importante para la migración celular fue investigada por mediciones geométricas utilizando el microscopio de luz mediante la división en

secciones del armazón en muestras de espesor. Las muestras se montaron en los portaobjetos y se tiñeron con hematoxilina/eosina. Un micrómetro óptico midió el tamaño de poro y la distancia entre los poros adyacentes.

La Figura 1A muestra la coagulación de la proteína del plasma (10 mg proteína del plasma/ml) antes del secado. El tamaño de poro se encuentra en el rango de tamaño de  $\mu\text{m}$  (micron). En la esponja de proteína del plasma (Fig. 1B) (10 mg proteína del plasma/ml, después del secado) los poros se encuentran en el rango de tamaño de 100  $\mu\text{m}$ . La diferencia entre el tamaño de poro de una esponja de proteína del plasma de 20 mg proteína/ml (Fig. 1D) y una esponja de proteína del plasma de 10 mg de fibrinógeno/ml (Fig. 1B) no es notable y no se encontró ninguna diferencia en el crecimiento celular en los dos armazones. Se puede observar que la esponja de proteínas del plasma de la invención tienen una red de poros sustancialmente regulares en comparación con un gel de colágeno (Fig. 1C).

En su forma final antes del uso con las células de la esponja es sustancialmente seca y contiene menos del 10% de humedad residual, más preferiblemente menos del 5% de humedad residual y más preferiblemente menos del 3% de humedad residual. Esta característica se midió por métodos conocidos en el oficio.

Las mediciones de propiedad mecánica se llevaron a cabo utilizando una máquina Chatillon TCD200 con un dinamómetro digital DF12. La distancia entre las abrazaderas se ajustó a 1.2 cm, y velocidad de tracción se ajustó a 12.7 mm/min. Cada esponja de proteína del plasma fue de 2.5 cm de largo, 0.5 cm de ancho; y se liofilizó completamente.

La deformación representa la elasticidad de la esponja, i.e. la cantidad de tracción se midió en milímetros (mm) que puede ser ejercido hasta que la esponja se rasgue. La fuerza se calcula en kPa y representa la cantidad de energía necesaria para arrancar las tiras de esponja. El espesor se incorpora en el cálculo.

La Figura 2A representa la resistencia a la tracción se midió en kPa en esponjas que comprende los componentes auxiliares diferentes. La Figura 2B representa la deformación del mismo tipo de esponjas. Se muestra el valor medio de prueba de tres esponjas. La esponja colágeno (Col) es disponible comercialmente (Ortec); el esponja de plasma crudo (crudo) fue preparada a partir de plasma crudo de acuerdo con el protocolo en el ejemplo 1 (10 mg/ml de fibrinógeno). Todas las esponjas mostradas en este documento que contienen componentes auxiliares fueron preparadas a partir del fibrinógeno disponible comercialmente (aproximadamente 20 mg/ml de fibrinógeno). HA= ácido hialurónico (0.0024% de concentración final), Dex= dextrán sulfato (MW ~10,000, 1% de concentración final); PEG =PEG 300 (1.5% de concentración final); G=glicerol (0.25% de concentración final).

Las esponjas preparadas a partir de fibrinógeno purificado (Fbr) y aquellas preparadas a partir de proteínas del plasma crudo (crudo) mostraron propiedades mecánicas sustancialmente idénticas. Las esponjas que contienen tanto HA como PEG, mostraron una mayor resistencia a la tracción y a la elasticidad. Las esponjas que contienen dextrán sulfato solo muestran un incremento en la resistencia a la tracción, sin incremento en la elasticidad. Cada agente auxiliar parece que imparte determinadas propiedades a la esponja. El análisis microscópico se realiza para determinar el tamaño de poro y la uniformidad de poro de las esponjas que contienen los diferentes componentes. El procedimiento de preparación de las esponjas con aditivos, se presenta en este documento a continuación.

#### **Ejemplo 5: Procedimiento para la Preparación de las Esponjas que contienen Componentes auxiliares**

En una modalidad preferida de la presente invención, la matriz de la presente invención se puede preparar con ciertos aditivos, o componentes auxiliares. Los aditivos, incluyendo el dextrán sulfato, glicerol y hialuronato (ácido hialurónico), se adicionaron a las esponjas para alterar ciertas propiedades biológicas y mecánicas. Se demostró que los parámetros físicos y mecánicos eran controlados mediante la incorporación de los componentes auxiliares o aditivos. Los aditivos se pueden retirar después de que la matriz se forma, con el fin de mejorar las propiedades biológicas de la matriz.

Todos los aditivos se filtraron (0.2  $\mu\text{m}$ ) y se adicionaron a la solución de proteína del plasma. Una lista de los aditivos y concentraciones probadas se muestran en la siguiente Tabla 2:

45

**Tabla 2**

Aditivo	Concentración (% Final)
Glicerol	0.005; 0.01; 0.05; 0.1; 0.25; 0.5; 1
PEG*	0.005; 0.05; 0.5; 1; 1.5

Ácido hialurónico	0.00024; 0.0024; 0.012; 0.024
Dextrán sulfato	0.1; 1; 5; 10
Glicerol + Ácido hialurónico	1 0.0024
Glicerol + Ácido hialurónico	0.5 0.0024
Glicerol + Ácido hialurónico	0.25 0.0024
PEG + Ácido hialurónico	1.5 0.0024
PEG + Ácido hialurónico + Glicerol	1.5 0.0024 0.25
Dextrán sulfato + Ácido hialurónico	1 0.0024
* PEG = polietileno glicol 300	

5 Los experimentos de optimización se llevaron a cabo, para determinar la concentración óptima de los aditivos en términos de flexibilidad, elasticidad, tamaño de poro y capacidad de crecimiento celular de la matriz. Las concentraciones de los componentes auxiliares, que producen buenas propiedades físicas en términos de tamaño de poro, resistencia a la tracción y elasticidad fueron 0.25% de glicerol, 1.5% de PEG, 0.0024% de ácido hialurónico o 1% de dextrán sulfato. Una combinación preferida de dos o más componentes se enumera en la tabla 2.

Los aditivos imparten beneficiosas propiedades, incluyendo propiedades de superficie, mecánicas y/o biológicas, a la esponja durante su preparación. Una modalidad actualmente más preferida de acuerdo con la presente invención es una esponja que comprende dextrán sulfato.

10 Algunos aditivos pueden ser perjudiciales para el crecimiento celular y por lo tanto pueden ser eliminados después de la etapa de liofilización. La esponja se rehidrata por el lavado en agua estéril, destilada o PBS y se utiliza por se o se puede volver a liofilizar para eliminar toda la humedad. Una modalidad actualmente preferida proporciona una esponja preparada que contiene uno o más aditivos, según se describe anteriormente, en donde la esponja se lava después de la etapa de congelación-liofilización y la esponja se vuelve a liofilizar para eliminar toda la humedad residual.

15

#### **Ejemplo 6: Velocidad de disolución**

La velocidad de disolución de la esponja, determina el nivel de entrecruzamiento que la proteína del plasma ha experimentado.

20 Dos experimentos se llevaron a cabo: 1-Recién preparadas frente a esponjas de un mes almacenadas a temperatura ambiente y 2: esponjas de dos meses almacenadas bajo diferentes condiciones.

1. Recién preparadas y esponjas de un mes se colocaron en 0.75ml de Urea 10M, y se agitaron suavemente. Una muestra de urea se tomó cada 5, 15, 20, 30, 40 minutos. La cantidad de proteína en la urea, i.e. la velocidad de disolución de esponjas de fibrina se determinó, mediante el método de Bradford. La Figura 3A muestra que una



esponja recién preparada se disolvió en la urea a una velocidad de 0.085 mg/min mientras que las esponjas envejecidas se disolvieron a una velocidad de 0.025 mg/min. Esto sugiere que la esponja envejecida tiene más entrecruzamiento que la esponja recién preparada.

2. Las esponjas fueron almacenadas por dos meses bajo dos diferentes condiciones:

5 a. Atmósfera inerte N<sub>2</sub> (g)

b. Al aire libre (Atmósfera estándar).

Después de dos meses, las esponjas fueron probadas como en la prueba anterior.

La Figura 3B, muestra que las esponjas expuestas al aire experimentaron un entrecruzamiento a velocidades mayores que aquellas almacenadas bajo condiciones inertes.

### 10 **Ejemplo 7: Siembra de Células**

Diferentes métodos de siembra de células en la esponja, se pueden utilizar. Para la siembra es importante, la adherencia de la célula, la capacidad migratoria y la proliferación de las células dentro de la matriz. Las células se pueden suspender en medio, PBS, o cualquier solución reguladora biocompatible sola o en la presencia de agentes bioactivos. Las células se pueden sembrar colocando una gota del líquido que contiene las células en la esponja y dejando que las células se absorban en la esponja. Por otra parte, las células en el líquido se pueden absorber en la esponja, colocando la esponja en un recipiente que contiene una suspensión de las células.

#### Materiales y Métodos:

Las células cultivadas se preparan en el medio de crecimiento (MEM), y se colocan en la parte superior de una esponja a una densidad de entre 10<sup>2</sup>-10<sup>6</sup> células por 300ul estándar de esponja de proteína del plasma (aproximadamente 0.2 cm<sup>3</sup>) en una placa de microtitulación que tiene 48 pozos. Diferentes volúmenes del medio de crecimiento se adicionan y las células se dejan crecer durante varios periodos de tiempo. Se debe entender que la esponja puede tener diferentes tamaños, formas y espesores.

Después de tres-días, 1 semana y tres semanas de incubación para las esponjas sembradas, las esponjas se dividieron en secciones y se observó la invasión y la proliferación celular. La proliferación celular se determina según se describe en el Ejemplo 9.

### **Ejemplo 8: Aislamiento y Cultivo Celular**

#### Reactivos:

Colagenasa Tipo 2; Worthington Biochemical Corp. (Cat. #: 4147)

Solución Stock: 1700 unidades/ml en medio (in MEM)

30 Medio Esencial Mínimo (MEM) Gibco BRL (cat: 21090-022)

Suero Fetal Bovino (FBS); Gibco BRL (cat: 16000-044)

Solución de L-Glutamina; Gibco BRL (cat: 25030-024)

Medio completo: Medio Esencial Mínimo (MEM ) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS), L-Glutamina 2mM y 100U/ml de penicilina, y 100µg/ml de estreptomina

#### 35 **Preparación de Implantes para Cartílago Articular**

La esponja de la presente invención, se puede utilizar como un almacén portador de células, para la reparación y regeneración del tejido. En un aspecto, las células se cultivan en la esponja *in vitro* antes de la implantación. En un aspecto preferido, la esponja se siembra con células inmediatamente antes de la implantación y las células se dejan crecer y proliferar *in vivo*.

40 Biopsias del cartílago a partir de cartílago de cerdo fresco, se dividieron en secciones de pequeñas piezas, de aproximadamente 3-4 mm de espesor, se lavaron asépticamente con PBS y se colocaron en un tubo nuevo que

contiene 3 ml de medio MEM. El cartílago se puede obtener de cualquiera de las especies de vertebrados, y preferiblemente es alogénico o autólogo.

5 La colagenasa tipo IT se diluyó 1:5 y se le adicionó 1 ml a las piezas del cartílago y la mezcla se agita suavemente en una incubadora a 37°C, durante la noche. Cuando la mayoría de la muestra fue digerida, la suspensión se vertió a través de gasa estéril para eliminar los residuos de la matriz y el material no digerido. El filtrado fue centrifugado y se lavó dos veces para eliminar la enzima residual.

10 El número de células se determinó con un hemocitómetro y la viabilidad se determinó mediante la exclusión del azul de tripán. Las células se inocularon en matraces de cultivo de tejidos de 150 cm<sup>2</sup> en 30 ml de medio de cultivo a una concentración de 5x10<sup>6</sup> células/ml. Los matraces se colocaron en una incubadora a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. El medio de cultivo se cambió cada tres a cuatro días. Las células se adhieren y confluyen después de una semana de incubación.

15 En la confluencia, el medio de la célula se retiró y se adicionaron 3ml de solución de tripsina-EDTA. Treinta ml de MEM+ FBS se le adicionaron, la solución se centrifugó a 800g, durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró, el pellet se dispersó y las células fueron contadas. Para crear una matriz portadora de células, 10<sup>2</sup> -10<sup>6</sup> células se sembraron en un armazón de proteína del plasma de 9mm en diámetro y un espesor de 2mm (aproximadamente 0.2 cm<sup>3</sup>). Las matrices se colocaron en una incubadora a 37°C, durante 1 hora y 1ml de medio recién preparado se le adicionó a cada una. El medio fue reemplazado con medio recién preparado y todos los días las matrices se tomaron para el análisis de diferenciación y proliferación celular.

#### Resultados:

20 Las Figuras 4A –D, muestran que la matriz de plasma es capaz de apoyar la proliferación de condrocito de bovino. Un incremento de 3 a 5 veces en número de células se observó de un estado inicial (Fig. 4A) hasta la confluencia de las células (Figs. 4B a 4D). Un corte histológico de un implante de colágeno de un mes para hematoxilina y eosina, mostró que las células en la superficie de la esponja de colágeno son más pequeñas y conservan su forma esférica (ver Figs. 4C y 4D). En la parte interior de la esponja de colágeno, las células se re-organizaron en el tejido que se asemeja a fibro-cartílago, mientras que en la esponja de proteína del plasma (Fig. 4A - D), las células se distribuyen bien y se separan unas de las otras, incrustadas en una matriz extracelular similar a la hialina gruesa y conservan su morfología de célula redonda típica de los condrocitos articulares maduros. Pequeños islotes de fibrina retenida demostraron la capacidad de las células para descomponer completamente la matriz y se reemplaza con matriz cartilaginosa. Estos resultados sugieren que el éxito de formación similar al tejido, *in vitro*, depende en gran medida del material de matriz-célula específico. La esponja de fibrina de acuerdo con una modalidad de la invención se demuestra que es una matriz superior para la formación de tejido cartilaginosa que la esponja de colágeno.

35 Además, parte de la población de las células cultivadas en las anteriores matrices, expresó varios de los marcadores de diferenciación de los condrocitos. Uno de los varios fenotipos expresados durante la diferenciación de los condrocitos es la producción de glicosaminoglicano (GAG). La producción de GAGs fue identificada en la tinción histológica utilizando Azul alcian y se cuantificó utilizando el método de coloración DMB (3,3'-dimetoxobencidina dihidrocloruro). La Fig. 5 muestra los resultados del contenido GAG en condrocitos de bovino cultivadas en tres diferentes matrices; esponja de colágenos, coagulo de fibrina (10 mg/ml) y esponja de proteínas del plasma (20 mg/ml). Se desprende de las gráficas presentadas en la Fig. 5, que las células cultivadas en la esponja de proteína del plasma y/o coagulo de fibrina muestran un contenido de GAG significativamente superior que las células cultivadas en la esponja de la matriz de colágeno. Este experimento demuestra la capacidad de las células a experimentar la diferenciación en la esponja de proteína del plasma.

#### **Ejemplo 9: Ensayo de Proliferación Celular**

45 La proliferación de las células de cartílago en la matriz de la invención, se cuantifico por uno de dos métodos, Cy-QUANT® (Molecular Probes) o reactivo XTT (Biological Industries, Co.). La matriz de proteína del plasma se disolvió en colagenasa u otras enzimas y las células se recolectaron por centrifugación y se sometieron al análisis de acuerdo con los protocolos del fabricante.

50 En un experimento, los condrocitos articulares humanos (10<sup>6</sup> células/100 ul) se cultivaron en la presencia de la matriz de la invención y colagenasa en placas de micropozos. Las células se cultivaron durante la noche en MEM, se adicionaron 34 U de colagenasa y las células o células+esponja, se incubaron durante cuatro horas. El reactivo XTT se adicionó por 3-4 horas y las placas se leyeron en un lector ELISA a A490 nm. Los resultados se muestran en la Figura 6. Como se puede ver, la velocidad de proliferación de las células no se vio afectada por la presencia de la esponja ni por la adición de la colagenasa.

**Ejemplo 10: Modelo de Reparación del Cartílago Articular de Cabra**

Un estudio comparativo para evaluar el uso de esponjas implantadas en lesiones de rodilla en cabras, se desarrolló.

5 Los objetivos del estudio fueron comparar las esponjas preparadas recientemente con esponjas envejecidas y una matriz de colágeno comercial en términos de respuesta inflamatoria, la capacidad de adherencia a la superficie lesionada, para probar la capacidad de las esponjas para inducir el crecimiento de cartílago hialino.

Materiales y Métodos:

6 cabras se seleccionaron para la prueba y se asignaron aleatoriamente a uno de los grupos de tratamiento.

Las diferentes esponjas (matrices) probadas incluyen:

1: esponjas de proteínas del plasma, preparadas recientemente

10 2: la esponja se incubó a 60°C (se incubó a 60 °C por 24 horas después del moldeado)

3: esponjas envejecidas (4-6 meses, almacenamiento a temperatura ambiente).

4: colágeno (Ortec).

Antibióticos:

15 2ml de amoxicilina se inyectaron IM, inmediatamente antes del procedimiento y una vez al día por 4 días después del procedimiento.

Anestesia:

Pre-medicación: 0.2ml de xilacina 2% por 25 kg de peso corporal, se administraron IM.

Inducción: Una vez las cabras fueron aturdidas un se insertó venflon I.V..

20 La formulación de 1ml de valium (1mg) + 2ml de quetamina (100mg/ml) 1ml/25 kg de bolo BW, se administró a través del venflon. Otros 0.5ml se pueden adicionar, según sea necesario. Para procedimientos más largos de 30 minutos, intubación y se administró anestesia con gas (Haloten, o isofloran).

Procedimientos para realizar la herida:

Los animales se afeitaron en ambas rodillas y se lavaron con desinfectante.

Las rodillas fueron expuestas en la parte lateral y la rótula fue dislocada lateralmente y se expone el cartílago.

25 Cuatro defectos de espesores parciales (6mm), fueron creados en la superficie de la articulación de los cóndilos femorales de la rodilla utilizando un bisturí sin penetrar el hueso sub-condral. La zona del defecto se lavó utilizando solución salina.

Procedimiento para el trasplante de la esponja:

30 Las matrices liofilizadas fueron implantadas y se adhirieron al defecto. Opcionalmente una goma biológica basada en fibrina se puede utilizar. La rótula se recolocó y el sinovia y la piel se cerraron utilizando suturas Vicryll. La piel se limpió con un ungüento de yodo.

Analgesia: 0.05 mg/kg de buprenorfina se inyectó SC (subcutánea), justo antes del procedimiento y en el final del mismo día Seguimiento y evaluación histológica:

35 Al final del periodo de seguimiento (6 o 10 semanas), las cabras se sacrificaron y el tejido se tomó para la evaluación histológica: las rodillas fueron evaluadas para movilidad, y apariencia. Las secciones histológicas fueron preparadas a partir de la zona lesionada y de las márgenes de 2-3mm. El tejido fue des-calcificado y los portaobjetos se prepararon en un procedimiento estándar.

Los portaobjetos se tiñeron con tinción hematoxilina-eosina y azul alcán. Los análisis inmunohistológicos se realizaron, incluyendo inmunohistoquímica utilizando anticuerpos para marcadores del tipo de célula o hibridación de ARN in situ, utilizando sondas de ARN o ADN.

5 La evaluación histológica se desarrolló para medir los siguientes parámetros: Características del tejido neo-formado, regularidad de la superficie de la articulación del tejido regenerado, integridad estructural y espesores del tejido regenerado, osificación endocondral y estado de las células en el cartílago remanente.

Resultados:

La Tabla 3 presenta una descripción del experimento y los resultados del análisis histológico.

**Tabla 3**

Cabra	Tratamiento	Tiempo	Resultados
2	Esponjas frescas	6 semanas	Inflamación mínima, tejido fibroso mínimo
943	Esponjas 60°C	6 semanas	Inflamación como se ve por la presencia de histiocitos; tejido fibroso
143	Esponjas envejecidas	6 semanas	Inflamación mínima, tejido fibroso mínimo. Proliferación de células mesenquimales en y alrededor de la herida.
945	Esponjas frescas	10 semanas	Sin inflamación; proliferación de células mesenquimales
183	Esponjas de colágeno	10 semanas	Inflamación masiva
930	Esponjas 60°C	10 semanas	Inflamación mínima; Proliferación de células mesenquimales.

10

La Figura 7, muestra las articulaciones de la rodilla de las cabras después del experimento.

**Ejemplo 11: Procedimiento de una etapa para Tratar el Cartílago Dañado: Apropiado Para Artroscopía o Hemi-Artrotomía**

15 La implantación de condrocitos autólogos se ha demostrado clínicamente efectiva en la reparación del cartílago similar a la hialina para defectos condrales aislados de la rodilla. Las actuales terapias incluyen tres etapas principales:

1. Artroscopía en el Diagnóstico y biopsia del cartílago sano.

2. Cultivo de células.

20 3. Inyección de condrocitos cultivados en la lesión en un colgajo del periostio, que se toma de la tibia y se sutura en la lesión.

Una variación de esta técnica proporciona la incorporación de células en un material biodegradable, incluyendo la matriz de la presente invención. Un método menos traumático se presenta en este documento, en donde el paciente se somete a un único procedimiento quirúrgico para la reparación del cartílago.

Procedimiento

25 Un paciente con un defecto del cartílago se llama al consultorio del médico para una consulta, varios días antes de la artroscopía o hemi-artrotomía. La sangre se extrae (aproximadamente 100-250 ml) y las proteínas del plasma se aíslan. Una matriz de proteína del plasma, o varias matrices, se preparan, etiquetan y almacenan asépticamente hasta el día de la cirugía.

En el día de la cirugía, una pequeña pieza de cartílago sano de la articulación del paciente se retira, se corta en pequeñas piezas y se colocan en un tubo de prueba que contiene colagenasa, hialuronidasa u otras enzimas degradantes del cartílago, o combinaciones de estos.

5 Mientras tanto, el cirujano tratará la región defectuosa de la articulación eliminando el tejido dañado, limpiando y preparando la zona para un implante. La matriz preparada se retira de su recipiente y se corta a la medida del dominio defectuoso. Después de aproximadamente 20-30 minutos de tratamiento enzimático, las células y las pequeñas piezas de cartílago se centrifugan en una centrífuga de mesa, se aclaran en PBS y se resuspenden en una pequeña cantidad (50ul-1000ul) de PBS. El cirujano siembra las células en la esponja, in situ. Por otra parte las células se absorben en la esponja y la esponja portadora de las células, se implanta en la región de la articulación defectuosa. Opcionalmente, las enzimas que degradan la matriz extracelular y/u otros agentes bioactivos incluyendo factores de crecimiento y/o compuestos anti-inflamatorios se adicionan a la esponja. En algunos casos el cirujano colocará una esponja seca directamente en la zona lesionada, opcionalmente adiciona solución de enzima a dicha esponja y coloca una segunda, esponja portadora de las células en la parte superior de la primera esponja. La articulación se cierra y se trata como de costumbre en un procedimiento artroscópico o de hemi-artrotopía y el paciente se deja recuperar.

#### Kit

Un kit que comprende los componentes útiles para practicar el método de la invención, permitirá la práctica conveniente del método de la invención en un ambiente quirúrgico. En una modalidad preferida, un kit de la invención proporcionará componentes estériles apropiados para el uso fácil en el ambiente quirúrgico incluyendo, soluciones estériles (solución salina, enzimas), un material de matriz libre de células, estéril apropiado para soportar los condrocitos autólogos que son para ser implantados en una superficie articular del defecto de articulación y las instrucciones para su uso. Aunque la matriz puede ser de cualquier material que sea biocompatible, no-inmunogénico y tenga la capacidad de mantener el crecimiento y la proliferación celular, la matriz preferiblemente se prepara del plasma alogénico, más preferiblemente del plasma autólogo.

#### 25 **Ejemplo 12: Liberación de los Agentes bioactivos**

Un factor que puede facilitar el desarrollo de tejidos en las matrices, es la entrega de factores de crecimiento u otros agentes biológicos en el ambiente local. La incorporación y liberación de factores de crecimiento a partir de estas matrices se evalúa *in vitro* o *in vivo* utilizando factores de crecimiento radiomarcados o etiquetados, por ejemplo factor de crecimiento fluorescente-marcado, fosfatasa alcalina-marcado o peroxidasa de rábano picante-marcado. La fracción y velocidad del agente liberado se midió, siguiendo la radioactividad, fluorescencia, actividad enzimática u otra peculiaridad de la etiqueta. De manera similar, la liberación de enzimas de la matriz se determina, mediante el análisis de la actividad enzimática en el microambiente en un ensayo *in vitro* o *in vivo*.

A pesar de que la presente invención se ha descrito particularmente, los expertos en el oficio apreciarán que muchas variaciones y modificaciones se pueden hacer. Por lo tanto, la invención no se debe interpretar como limitante a las modalidades descritas particularmente, más bien el alcance, espíritu y concepto de la invención se entenderá más fácilmente en función de las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una matriz porosa biocompatible liofilizada que comprende proteínas del plasma, las proteínas del plasma que comprenden fibrina, y al menos un agente anti fibrinolítico, que además comprende ácido hialurónico y polietileno glicol como componentes auxiliares, con poros uniformes en un rango de tamaño de 50-300 micrones, carente de agentes quelantes orgánicos y que tiene una humedad residual por debajo del 3%, útil como un armazón para el crecimiento de células.
- 2.** La matriz de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las proteínas del plasma se mezclan con al menos 0.5 unidades de trombina por mg de proteína.
- 3.** La matriz de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos una de las proteínas del plasma es autóloga.
- 10 **4.** La matriz de acuerdo con la reivindicación 1, en donde todas las proteínas del plasma son autólogas.
- 5.** La matriz de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente anti-fibrinolítico es el ácido tranexámico.
- 6.** La matriz de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende al menos 5% de ácido tranexámico.
- 7.** La matriz de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células son células madre o células progenitoras.
- 15 **8.** La matriz de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células se seleccionan de tipos de células como condrocitos, osteocitos, hepatocitos, mesenquimales, epiteliales, uroteliales, neuronales, pancreáticas, renales u oculares.
- 9.** La matriz de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células son condrocitos.
- 10.** La matriz de acuerdo con las reivindicaciones 8, 9 o 1, en donde las células logran una densidad de al menos  $10^4$  células por  $\text{cm}^3$ .
- 20 **11.** La matriz de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende al menos un agente bioactivo, seleccionado de factores de crecimiento, citoquinas, enzimas, agentes anti microbianos, anti inflamatorios.
- 12.** La matriz de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tamaño de poro preferiblemente oscila entre 100-200 micrones.
- 25 **13.** Un método de preparación de una matriz porosa de proteínas del plasma, útil como un armazón para el crecimiento de las células *in vitro*, el método que comprende las etapas de:
- mezcla de las proteínas del plasma con la trombina en la presencia de iones de calcio y al menos un agente anti-fibrinolítico bajo condiciones apropiadas para la coagulación, en la ausencia de agentes quelantes orgánicos, y además la adición del ácido hialurónico y del polietileno glicol como componentes auxiliares;
- moldear la mezcla de proteínas del plasma y de trombina en un soporte sólido antes del moldeado;
- 30 congelación de la mezcla coagulada; y
- liofilización de la mezcla coagulada, para obtener una esponja de acuerdo con la reivindicación 1.
- 14.** El método de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende después de la etapa de liofilización de la mezcla coagulada las etapas adicionales de:
- corte de la esponja en secciones de la forma deseada;
- 35 siembra de las secciones con las células; y
- cultivo de las células en dichas secciones hasta que las células alcancen una densidad de al menos  $10^4$  células por  $\text{cm}^3$ ;
- en donde mediante la liofilización de la mezcla coagulada, se obtiene una esponja.
- 15.** El método de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende las etapas adicionales de:

opcionalmente el lavado de la esponja, eliminando así, los componentes auxiliares solubles; opcionalmente volver a liofilizar la matriz, obteniendo así una esponja que no tenga más de 3% de humedad residual; y

corte de la esponja en la forma deseada.

- 5 **16.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en donde las proteínas del plasma comprenden al menos fibrinógeno y factor XIII.
- 17.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en donde al menos una de las proteínas del plasma es autóloga.
- 18.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en donde todas las proteínas del plasma son autólogas.
- 10 **19.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en donde las proteínas del plasma se mezclan con al menos 0.5 unidades de trombina por mg de proteína.
- 20.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en donde el agente anti-fibrinolítico es el ácido tranexámico.
- 21.** El método de acuerdo con la reivindicación 20, que comprende al menos 5% del ácido tranexámico.
- 15 **22.** El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde las células se seleccionan de tipos de células como condrocitos, hepatocitos, osteocitos, mesenquimales, epiteliales, uroteliales, neuronal, pancreáticas, renales u oculares.
- 23.** El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde las células son condrocitos.
- 20 **24.** El método de acuerdo con la reivindicación 15, que además comprende la siembra de las secciones con las células y el cultivo de las células en dichas secciones, hasta que las células alcancen una densidad de al menos  $10^4$  células por  $\text{cm}^3$ .
- 25.** Un implante o una cubierta porosa para un implante preparado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15.
- 25 **26.** Uso de una matriz porosa biocompatible liofilizada de acuerdo con las reivindicaciones 1-12, para la preparación de un implante para tratar un tejido lesionado.
- 27.** Uso de un implante de acuerdo con la reivindicación 26, en donde el tejido es tejido esquelético, preferiblemente cartílago.
- 28.** Un kit que comprende la matriz porosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12 o una matriz preparada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 y las instrucciones para su uso.

FIGURA 1

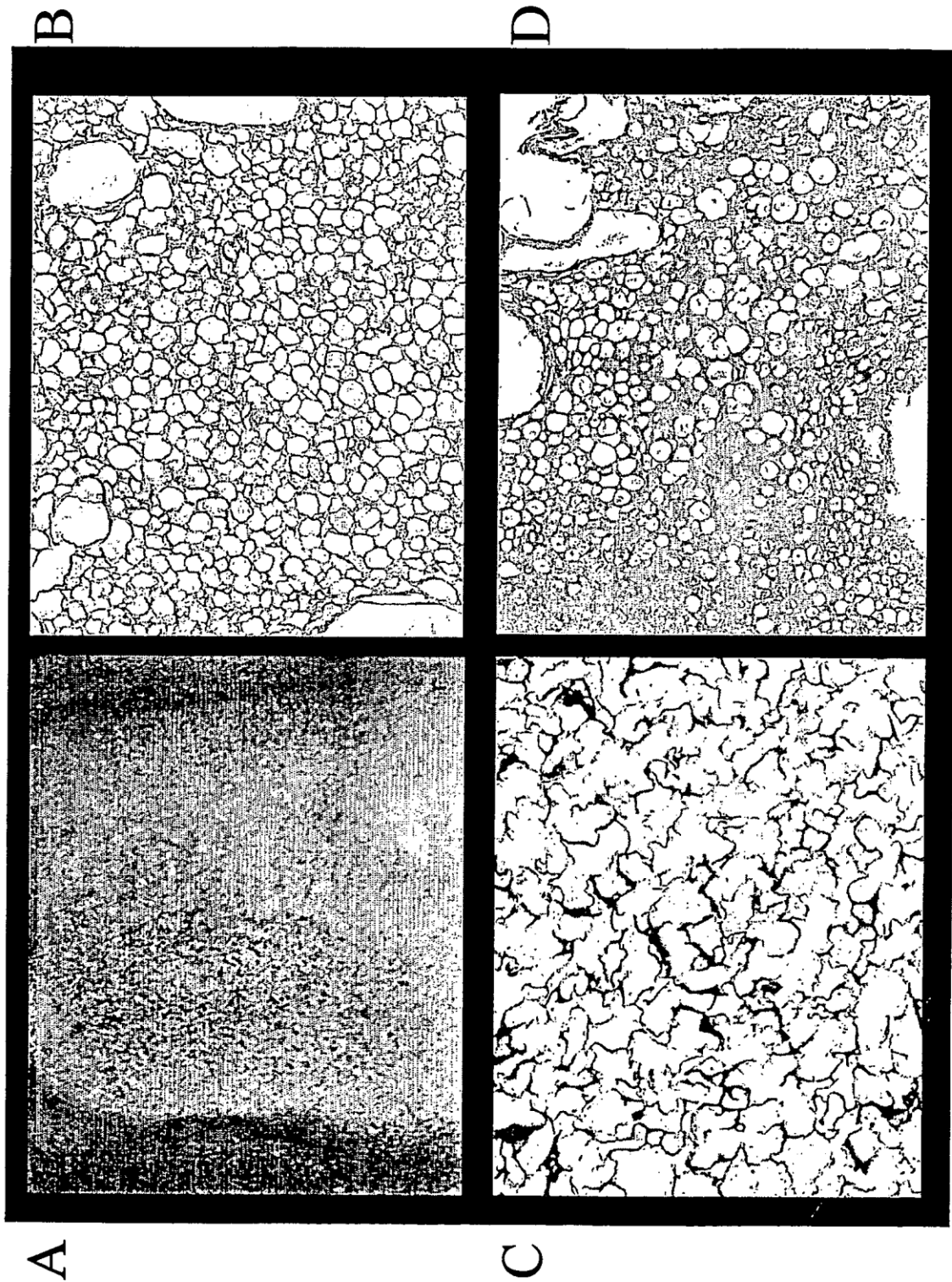




FIGURA 2

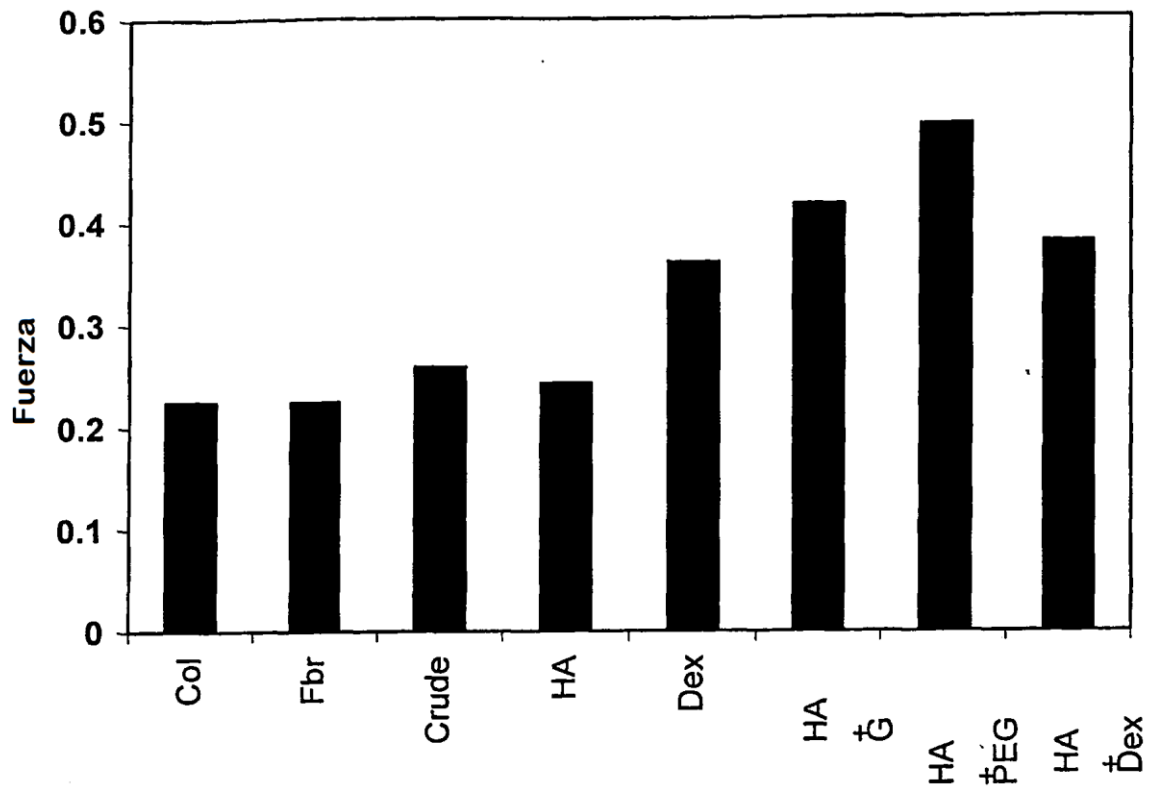


FIGURA 2B

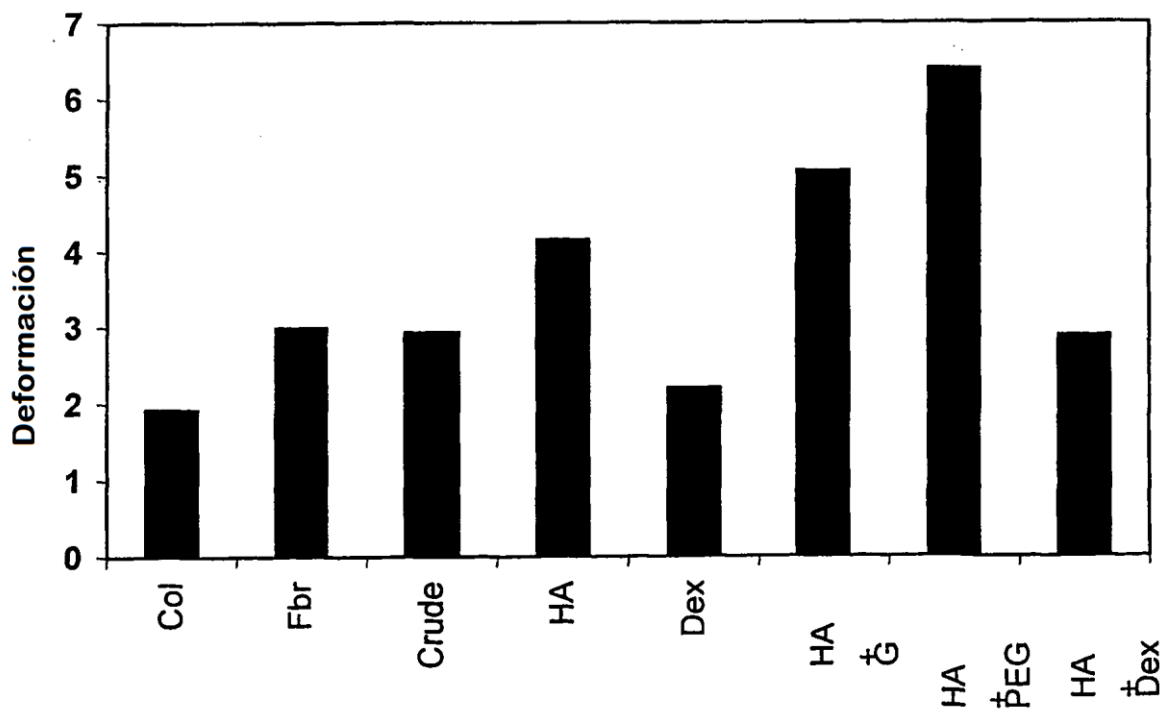


Figura 3A

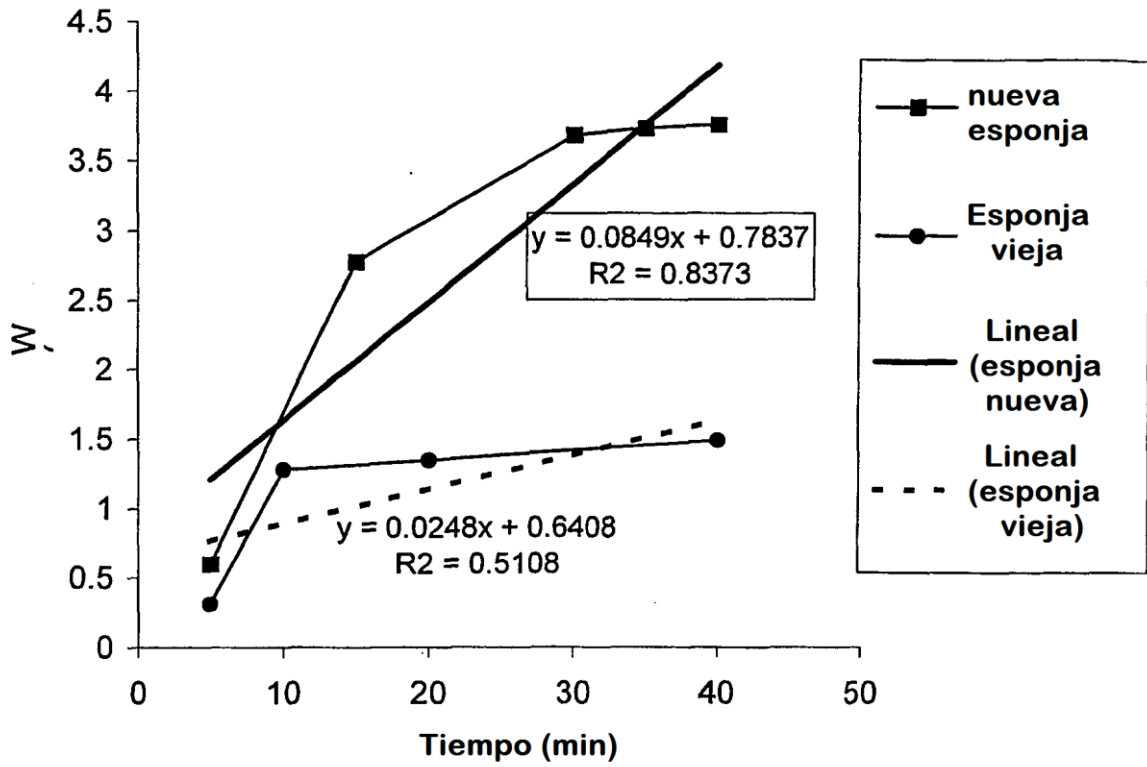


Figura 3B

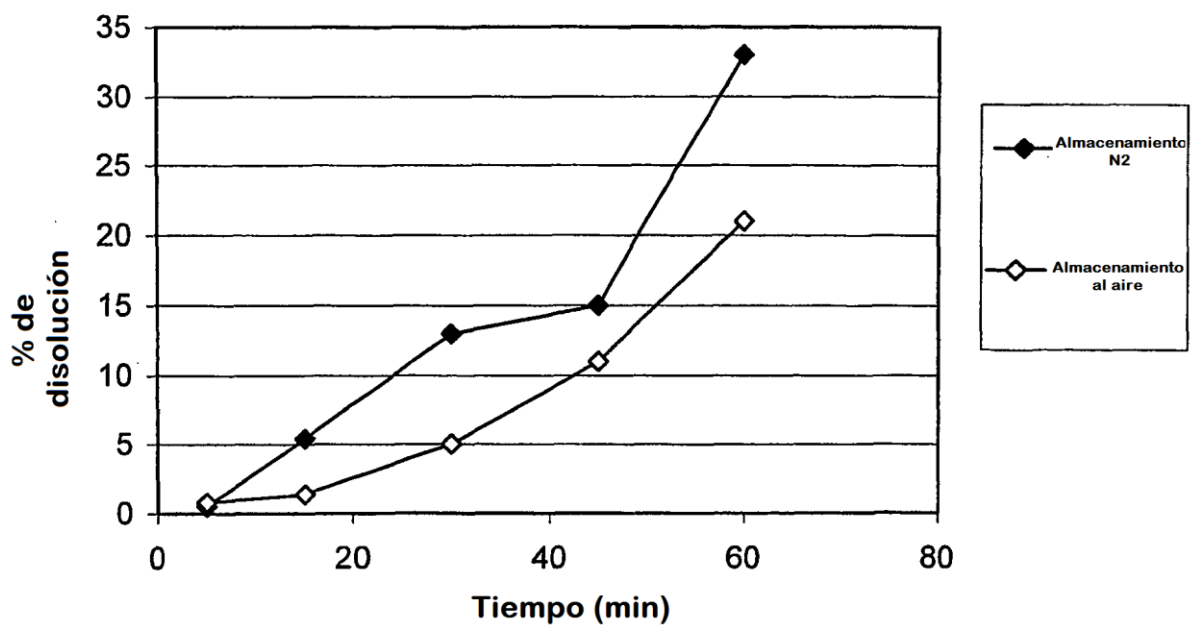


FIGURA 4

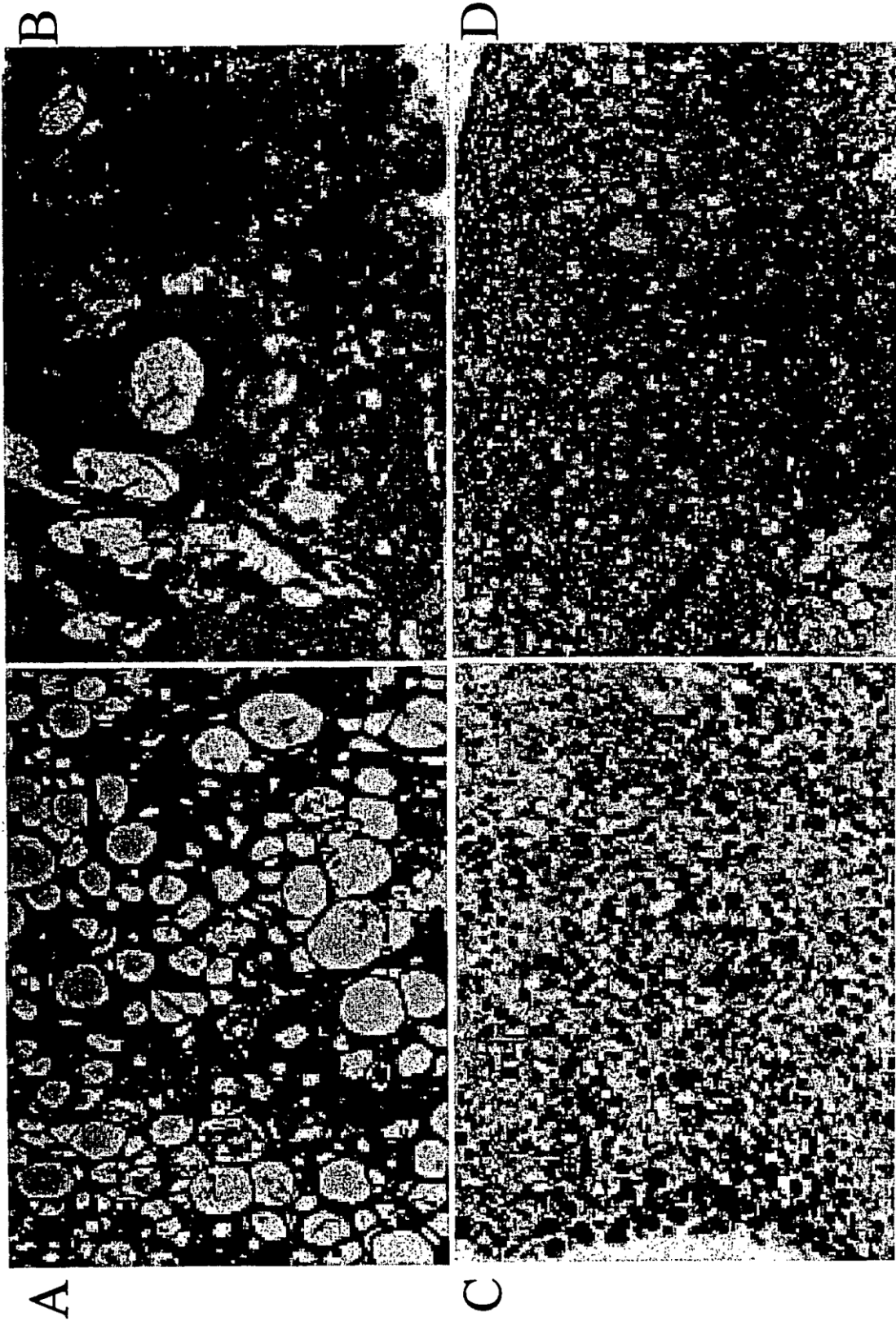


FIGURA 5

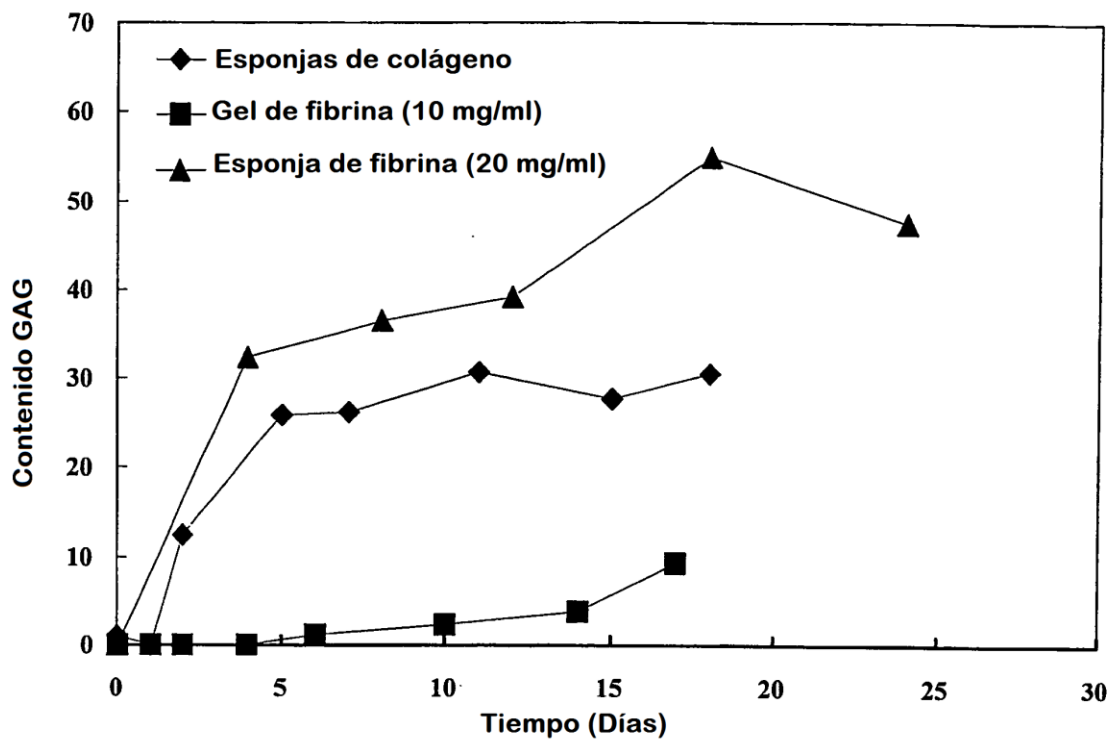
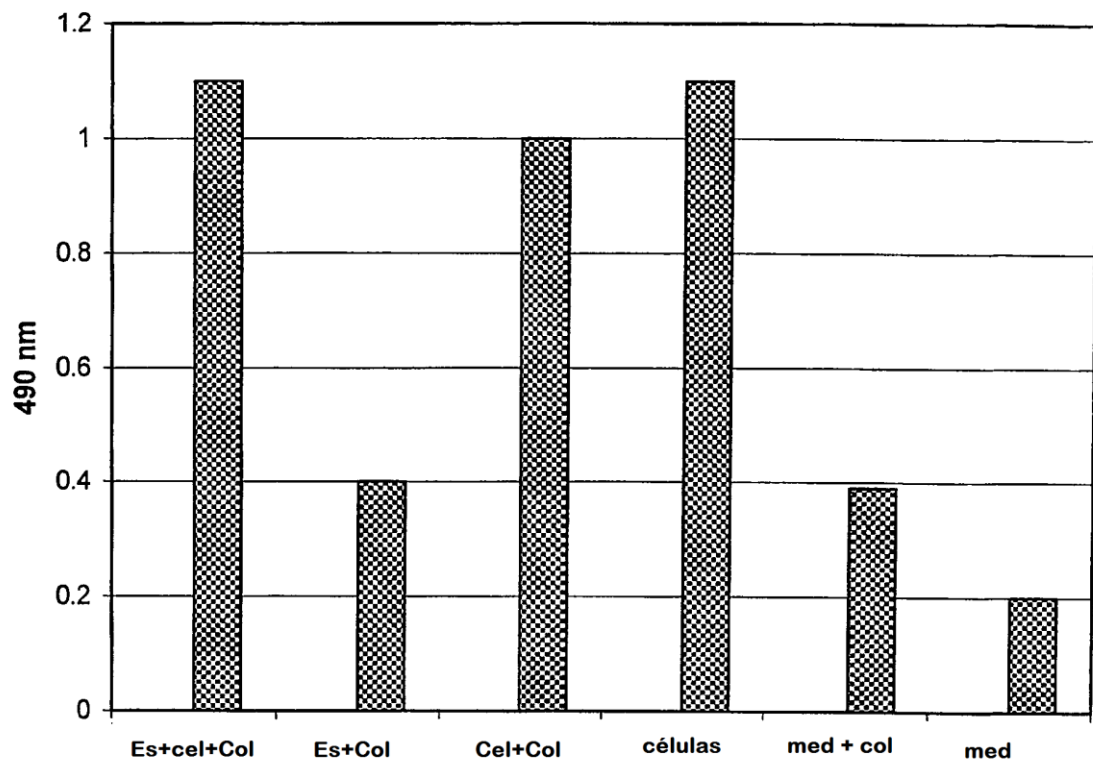


FIGURA 6



**FIGURA 7**

**A Cabra 2**



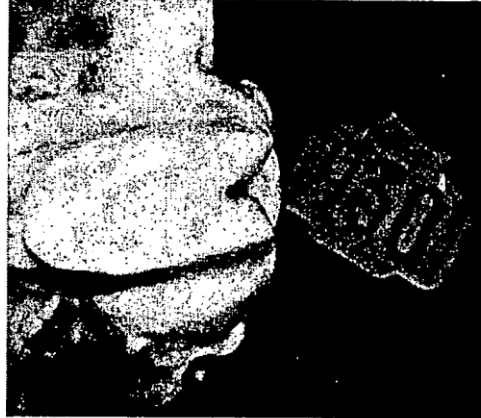
**D Cabra 183**



**B Cabra 143**



**E Cabra 930**



**C Cabra 943**



**F Cabra 945**



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCION**

*Esta lista de referencias citada por el aspirante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de la patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad a este respecto.*

**5 Documentos de patentes citadas en la descripción**

- US 5411885 A [0010]

- US 4642120 A [0010]

- US 5260420 A [0010]

- US 6074663 A [0010]

10 • US 6310267 B [0011] [0013] [0067] [0072]

- US 5972385 A [0012]

- WO 9915209 A [0014]

- US 5955438 A [0016]

- US 4971954 A [0016]

15 • US 5700476 A [0016]

- US 5736372 A [0017]

- US 5948429 A [0018]

- US 5443950 A [0019]

- US 5842477 A [0019]

20 • US 6398816 B [0047]

- US 6274090 B [0068]

**Literatura no-patente citada en la descripción**

- **Haisch et al.** Med Biol Eng Comput, 2000, vol. 38, 686-9 [0068]

- **Sims et al.** Plastic & Recon. Surg., 1998, vol. 101, 1580-85 [0093]

25 • **Bradford.** Anal. Biochem., 1976, vol. 72, 248-254 [0104]

- **Hunziker.** Osteoart. Cart., 2002, vol. 10, 432-465 [0116]