



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 360 153**

② Número de solicitud: 200931025

⑤ Int. Cl.:  
**C12N 5/0797** (2010.01)  
**A61L 27/38** (2006.01)  
**A61K 35/14** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **20.11.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.06.2011**

⑦ Solicitante/s: **FINA BIOTECH, S.L.U.**  
**Gobelas, 21 - 1ª Planta - La Florida**  
**28023 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Zurita Castillo, Mercedes;**  
**Aguayo Ferrer, Concepción;**  
**Vaquero Crespo, Jesús y**  
**Otero Ortega, Laura**

⑦ Agente: **Carpintero López, Mario**

⑤ Título: **Composición de implante para la regeneración de tejido neural, procedimiento de preparación y usos de la misma.**

⑤ Resumen:

Composición de implante para la regeneración de tejido neural, procedimiento de preparación y usos de la misma. En la presente invención se contempla una composición de implante para la regeneración de tejido neural que comprende a) un soporte de gel formado a partir de un fluido aislado que contiene plaquetas y un agente de activación que comprende cloruro de calcio, con o sin trombina, b) un factor de crecimiento neural seleccionado de entre BDNF, NGF, ácido retinoico y combinaciones de los mismos, y c) un cultivo de al menos 50.000 células madre progenitoras. Asimismo se contempla el empleo de dicha composición como implante y el procedimiento para la preparación de la misma.

ES 2 360 153 A1

## DESCRIPCIÓN

Composición de implante para la regeneración de tejido neural, procedimiento de preparación y usos de la misma.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la regeneración de tejido neural en el sistema nervioso central (SNC). Particularmente, la presente invención se refiere a una composición de un implante biodegradable y biocompatible para la regeneración de tejido neural y a procedimientos para su fabricación y usos de la misma.

10

**Antecedentes de la invención**

La regeneración después de lesión al sistema nervioso central (SNC) está limitada por influencias inhibitorias del entorno extracelular que contrarresta la reparación de mielina y neuronas. Frecuentemente, después de lesión de tejido de la médula espinal o del cerebro se origina una cavidad debido a la pérdida de células nativas. Esta cavidad está vacía de matriz extracelular (ME) y normalmente está aislada del tejido por una cicatriz glial que inicialmente se pensaba que bloqueaba la regeneración dentro del SNC después de la lesión (*Windle y col. J Comp Neurol. 1950; 93:241-258*). Más recientemente, los investigadores han demostrado que en varios modelos experimentales diferentes, los axones del SNC pueden tener al menos pequeñas cantidades de regeneración, creciendo dentro del sitio de la lesión e incluso a corta distancia (*Liu, CN. El Al. Arch. Neurol. Psychiat. 1958;79:46-61; Guth y col. Exp Neurol. 1985;88:1-12; Freund y col. Nat Med. 2006;12:790-792; Goshgarian y col. J Appl Physiol. 2003;94:795-810; Li, Y. y col. J Neurosci. 1994;14:4050-4063; Taylor y col. J Neurosci. 2006;26:9713-9721*). Por tanto, en el propio sitio de la lesión pueden desarrollarse conos de crecimiento recientemente formados. Sin embargo, no abandonan el sitio inmediato de lesión y parecen incapaces de producir por sí mismos una regeneración a larga distancia, haciéndose rápidamente distróficos (*Li, Y. y col. Exp Neurol. 1995;134:102-111; Misgeld, T. y col. Nat Rev Neurosci. 2006;7:449-463; Misgeld, T. y col. Nat Protoc. 2007;2:263-268*).

25

Entonces se desarrollaron las estrategias de la neuroregeneración mediante terapia celular. Las células madre hematopoyéticas (células madre mesenquimales A.K.A), los macrófagos, las células dendríticas, las células olfativas de la glía, las células de Schwann, las células madre embrionarias, las células madre neurales (NSC) y las células progenitoras neuronales (CPN) se han propuesto como candidatas para la terapia de trasplante en enfermedades neurales humanas (*Kawasaki y col. Neuron. 2000. 28:31-40,1*). Sin embargo, estas células se enfrentan a problemas éticos e histopatológicos de su obtención y uso. A diferencia de éstas, las células estromales de la médula ósea (BMSC) tienen la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos, mioblastos, condrocitos o neuronas dependiendo de la composición específica de la ME y otros factores (*Engle AJ. y col. 2006. Cell 126(4): 677-689*). Las células del tejido cerebral pueden generarse específicamente a partir de BMSC después de inducción con factor trófico (TF) y factor neurotrófico derivado de líneas celulares de la glía (GDNF). Estas BMSC inducidas pueden permitir la neuroregeneración. Las BMSC autólogas pueden prevenir adicionalmente las complicaciones relacionadas con el rechazo (*Dezawa y col. J. Clin. Invest. 2004. 113(12): 1701-1710*). De hecho, se ha mostrado que células madre autólogas aisladas expandidas *ex vivo* se integran en tejidos de huésped tras la liberación intra-SNC, y se diferencian en la respuesta a impulsos locales. A pesar de esto, las células trasplantadas no pueden crear tejido *de novo* y entran en apoptosis en respuesta a una interacción inapropiada de células con la ME, conocida como anoikis, un tipo de muerte celular iniciada por señales que son diferentes de las que inician otro tipo de apoptosis, que da como resultado una disminución en el número de células, por debajo de la masa crítica, después de trasplante (*Modo y col. Stroke 2002;33(9):2270-8; Okada, S. y col. FASEB J 2005;19:1839-41*). En vista de esto, varios autores han mostrado que la adición de factores tróficos al medio de cultivo y a las matrices biológicas podría proteger las células de lesión apoptótica (*Koda M. y col. Neurosci Lett 2008;444:143-7, Jost, M. y col. Mol Biol Cell 2001;12:1519-27*) y ser útil para inducir diferenciación celular (*Silva GA. y col. Science 2004;303:1352-5*). Sin embargo, los factores tróficos no resolvieron la falta de orientación proporcionada por la ME.

50

Los soportes implantables aparecieron como una solución a la falta de soporte y orientación de ME para células trasplantadas. Así, se ha probado la utilidad de composiciones de soportes de células basadas en Matrigel, colágeno, hidrogel de alginato, fibrina y ácido poli- $\alpha$ -hidroxílico en neuroregeneración del SNC. Uno de los soportes más ampliamente usados es el colágeno, ya que es uno de los componentes principales de la ME y parece que puede inducir regeneración axonal en algunos modelos de lesión de la médula ósea (SCI) (*Liu y col. Neurosurgery 2001;49:143-50; Goldsmith y col. Neurol Res 2005;27:115-23*). Sin embargo, el colágeno induce una respuesta que conduce al cierre hermético y el aislamiento del implante, haciendo imposible que interconecte con el tejido de huésped. Otros soportes con capacidad para facilitar el alargamiento axonal son el hidrogel de alginato (*Kataoka y col. J Biomed Mater Res 2001;54:373-84; Suzuki y col. Neurosci Lett 2002;318:121-4*), el ácido poli- $\alpha$ -hidroxílico (*Blacher y col. Biomaterials 2003;24:1033-40, Patist y col. Biomaterials 2004;25:1569-82*), los hidrogeles sintéticos (*Bakshi y col. J Neurosurg Spine 2004;1:322-9*) o el polietilenglicol (*Shi R J Neurotrauma 1999;16:727-3823*). El Matrigel es un derivado de ME de sarcoma de *Engelbreth Holm Swarm* que contiene laminina, fibronectina y proteoglicanos. Diversos estudios mostraron su utilidad en la inducción de proliferación de células nerviosas *in vitro* y la regeneración axonal en diversos modelos de SCI (*Novikova LN. y col. J Biomed Mater Res A 2006;77:242-52; Xiao M. Exp Neurol 2005;194:12-30; Facchiano F y col. J Neurosurg 2002; 97:161-8*). La fibronectina, una glicoproteína de ME, también se ha usado satisfactoriamente como soporte celular en la regeneración del SNC (*Ahmed Z, Tissue Eng 2003;9:219-31*). Se mostró que los soportes basados en ácido poliglicólico (PGA) que contenían NSC potenciaban interacciones recíprocas entre donantes y células trasplantadas (*Park y col. Nature Biotechnology 2002; 20(11):1111-7*). Una etapa adicional en

65

esta aproximación, partículas de poli(ácido D,L-láctico- ácido co-glicólico) tratadas con alilamina polimerizadas por plasma (ppAAm) sembradas con NSC e inyectadas en la cavidad de la lesión de un cerebro dañado, dio origen al tejido primitivo “cerebral de novo” que se integró eficientemente con el tejido cerebral de huésped (*Bible y col. 2009 Biomaterials 30:2985-2994*). Sin embargo, los productos de degradación de partículas de PLGA, y la presencia prolongada de un material exógeno, pueden ejercer efectos perjudiciales impredecibles sobre la fisiología celular.

Los gels de fibrina (FG), preparados a partir de fibrinógeno y trombina, son un buen soporte biocompatible alternativo. A diferencia de los componentes de la matriz extracelular, el FG se ensambla rápidamente mediante una reacción de policondensación modificada del fibrinógeno (*Janmey y col. 1982. Biopolymers 21, 2253-2264*). Esto permite el control de los tiempos de gelificación y la morfología del gel bajo condiciones fisiológicas. Las propiedades bioquímicas y mecánicas de la fibrina se han explotado recientemente en numerosos estudios que sugieren su potencial para aplicaciones en medicina y bioingeniería. Diversos autores han demostrado la utilidad de la fibrina en la regeneración de tejido (*Falanga y col. Tissue Eng 2007;13:1299-1312*), usándose ocasionalmente junto con un factor de crecimiento (aFGF, NT-3) o en combinación con otras matrices (*Taylor SJ y col. J Control Release 2004;98:281-9431; Gille J y col. Tissue Cell 2005;37:339-4832*). El FG se usa en procedimientos quirúrgicos como un sellador biológico y se considera un soporte poroso que puede estimular la adhesión y el crecimiento celular (*Le Guéhenne L, Eur Cell Mater 2004,8:1-10*).

El plasma rico en plaquetas (PRP) es un material de implante más sofisticado y desarrollado que también contiene fibrina. Su ventaja principal es que los soportes de PRP se fabrican a partir de materiales autólogos, por tanto, sin toxicidad o respuesta inmunitaria. El PRP es el soporte autólogo más frecuentemente usado en cirugía ortopédica (*Wakitani S, y col. J Bone Joint Surg Br 1989;71:74-80*) y maxilofacial y ha mostrado efectos beneficiosos en la reparación de úlceras de piel y como injerto de piel en ratones (*Matras y col. Osterr Z Stomatol 1970;67:338-59*). Además, también se ha usado para inducir neovascularización para mejorar la perfusión de tejido en tejidos isquémicos o normales (documento US2009053208). Sin embargo, actualmente, no hay estudios sobre la aplicación de soportes de PRP en el campo de las enfermedades neurológicas.

Para que un soporte pueda ser útil en la regeneración de un tejido, las células que soporta deben poder adquirir el fenotipo del tejido en el que están previstas. De esta forma, muchos datos bibliográficos muestran que hBMSC cultivadas sobre soportes de FG y PRP pueden diferenciarse en hueso o cartílago (32, 63). Además, diversos estudios *in vitro* respaldan la posibilidad de transdiferenciación de BMSC neurales (64-66), incluso sobre soportes de FG (*Willerth y col. “Optimization of fibrin scaffolds for differentiation of murine embryonic stem cells into neural lineage cells. Biomaterials 2006; 27:5990-6003.*), pero actualmente no se sabe si este proceso puede tener lugar sobre soportes de PRP.

En resumen, los materiales y las estrategias actualmente usados para la terapia celular en reparación de lesiones de la médula espinal y del cerebro no se han completado satisfactoriamente. Todavía falta una composición que pueda promover completamente la multiplicación, migración y diferenciación celular en células neurales sanas. Este campo necesita el desarrollo de una herramienta eficiente para la regeneración del SNC.

En un intento por abordar esta necesidad, los inventores de la presente solicitud, después de largos trabajos experimentales, han desarrollado una nueva composición de un implante biocompatible y biodegradable que puede guiar y soportar la neuroregeneración, estimulando la integración del tejido neural recientemente formado dentro de las estructuras existentes.

Los inventores han mostrado que esta nueva composición es ventajosa cuando se usa para la reparación cerebral o de la médula espinal ya que es más fácil de moldear, asegurando su adaptación al tejido dañado y llenando las cavidades postraumáticas. Los inventores han demostrado por primera vez que las células madre pueden adquirir un fenotipo neural cuando se siembran sobre estos soportes de PRP y se estimulan con factor de crecimiento, tal como BDNF, NFG o ácido retinoico. Por tanto, las células madre pueden adherirse a estas matrices biológicas, adoptando una morfología mesenquimal y mostrando una alta tasa de supervivencia.

Los autores de la invención han podido mostrar que los soportes de PRP pueden considerarse como matrices ideales para el soporte de células madre cuando estas células se usan en protocolos clínicos aplicados a lesión de la médula espinal u otras lesiones traumáticas del sistema nervioso central.

### Objeto de la invención

En primer lugar, la invención se refiere a una composición de implante biodegradable y biocompatible para la regeneración de tejido neural que comprende a) un soporte de gel formado a partir de un fluido aislado que contiene plaquetas y un agente de activación que comprende cloruro de calcio, con o sin trombina, b) un factor de crecimiento nervioso seleccionado de BDNF, NGF, ácido retinoico y combinaciones de los mismos, y c) un cultivo de al menos 50.000 células madre progenitoras.

Además, es también objeto de la presente invención el uso de la composición de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de lesiones en el SNC.

Finalmente, es objeto de la invención un procedimiento de preparación de la composición de la invención que comprende i) el aislamiento de un fluido que contiene plaquetas, ii) el aislamiento y la expansión *ex vivo* de células madre progenitoras, iii) la combinación de las células madre progenitoras obtenidas en ii) con el fluido que contiene plaquetas obtenido en i) y al menos un factor de crecimiento seleccionado de entre BDNF, NGF, ácido retinoico y combinaciones de los mismos, iv) la adición de un agente de activación que comprende cloruro de calcio, con o sin trombina, a la combinación obtenida en iii), y v) la gelificación de la mezcla obtenida en iv).

### Breve descripción de las figuras

Figura 1. *Soportes de FG*. A: Preparación de los soportes usados en el presente estudio. B: Aspecto macroscópico del soporte de FG 100/50 (arriba) y soporte de FG 20/100 (abajo). Ambos soportes muestran una fuerte consistencia. C: Aspecto macroscópico de un soporte de FG 10/4. Los soportes de GF 10/4 y 5/2 muestran una consistencia similar moderada. D: Superficie de un soporte de FG 20/100 analizada mediante microscopía electrónica de barrido ambiental. Puede verse la estructura fibrilar de la fibrina y algunas hBMSC con morfología fibroblástica (flecha), unidas a la malla de proteína. E: Aspecto de hBMSC sembradas sobre un soporte de FG 10/4. Después de siete días de cultivo, las hBMSC muestran una morfología esférica. F: Aspecto de hBMSC sembradas sobre un soporte de FG 20/100. Pueden verse células con morfología redondeada (técnica de H & E). G: Imagen que muestra una hBMSC expandida, con aspecto fibroblástico típico, en un soporte de FG 20/100 (técnica de H & E). H: hBMSC sembradas sobre un soporte de FG 100/500. Pueden verse células redondeadas, atrapadas en la malla de fibrina (técnica de H & E). I y J: hBMSC apoptóticas sobre un soporte de FG 100/500. Puede verse la condensación típica de cromatina (I) y burbujas citoplásmicas (J) (técnica de H & E).

Figura 2.- *Soportes de PRP*. A: Soporte de PRP sin trombina. Consistencia moderada. B: Soporte de PRP con cloruro de calcio y 4 UI de trombina. Este soporte de PRP y las 2 UI de trombina del soporte de PRP mostraron una consistencia moderada. C: Soporte de PRP con cloruro de calcio y 100 UI de trombina. Consistencia del gel, que permite una fácil manipulación. D: Soporte de PRP con cloruro de calcio y 500 UI de trombina que muestra consistencia sólida, pero porosa. E a H: Superficie de soportes de PRP observada por el microscopio electrónico de barrido ambiental. E: Soporte de PRP con sólo cloruro de calcio (0 UI de trombina). Superficie áspera en la que hay una malla suelta y porosa de fibrina. Está completamente cubierta por hBMSC y plaquetas. F: Soporte de PRP con 2 UI de trombina. La superficie es más suave, pero las hBMSC están bien unidas. G: Soporte de PRP con 100 UI de trombina. H: Soporte de PRP con 500 UI de trombina. En ambos tipos de soportes de PRP hay una malla suelta de fibrina, pero la superficie es muy áspera debido al número de plaquetas y hBMSC adherentes. I a L: Aspecto de hBMSC sembradas sobre los soportes de PRP de los inventores, observadas mediante microscopio invertido. Las células mostraron morfología fibroblástica. I: Soporte de PRP con sólo cloruro de calcio. J: Soporte de PRP con 20 UI de trombina. K: Soporte de PRP con 100 UI de trombina. L: Soporte de PRP con 500 UI de trombina. M a P: hBMSC cultivadas sobre los diferentes soportes de PRP de los inventores que muestran morfología fibroblástica. M: Soporte de PRP con 20 UI de trombina. O: Soporte de PRP con 100 UI de trombina. P: Soporte de PRP con 500 UI de trombina.

Figura 3.- *Medición de la capacidad de proliferación de hBMSC sobre soportes de FG y PRP*. A: hBMSC que muestran positividad a Ki-67 sobre un soporte de FG 20/100. Aunque las células muestran una morfología esférica, puede verse actividad proliferativa. En el inserto (a), la inmunotinción doble muestra células positivas para CD73 (verde) y la expresión de Ki67 (roja). B: hBMSC positivas para Ki-67 soportadas sobre un soporte de PRP con 100 UI de trombina. Puede verse un gran número de células que muestran positividad para Ki-67. La flecha indica una célula en mitosis. *Medición de la tasa de muerte celular* C: hBMSC sobre un soporte de FG 20/100 que muestra positividad a TUNEL (verde). D: hBMSC sobre un soporte de PRP con 100 UI de trombina. Sólo las células aisladas (flecha) muestran positividad a TUNEL.

Figura 4.- *Análisis de RT-PCR de hBMSC cultivadas*. A: Expresión génica neuronal y astrogliar en hBMSC sembradas sobre soportes de FG. El soporte de FG 20/100 con NGF permite la expresión de nestina, pero no la expresión génica de  $\beta$ -III-tubulina (neuronal) o GFAP (astrogliar). El soporte 10/4 con BDNF permite la expresión de nestina y  $\beta$ -III-tubulina, pero no la expresión de GFAP. El soporte de FG 20/100 con BDNF permite la expresión de nestina,  $\beta$ -III-tubulina y GFAP. (a): hBMSC sembradas sobre un soporte 20/100 con BDNF (técnica de H & E). (b): hBMSC sembradas sobre un soporte 20/100 con BDNF. La inmunotinción muestra una fuerte positividad a nestina. B: Expresión génica neuronal y astrogliar en hBMSC sembradas sobre soportes de PRP. Estos soportes siempre permitieron la expresión de nestina,  $\beta$ -III-tubulina y GFAP. (c): hBMSC sembradas sobre un soporte de PRP con 100 UI de trombina, que muestra morfología neuronal (microscopio de contraste de fases), (d): hBMSC sobre un PRP.

Figura 5.- A: Colocación del injerto de gel en la zona de lesión cerebral (\*). B: Injerto de gel colocado en la lesión cerebral. C: Aspecto, una semana después, de las células implantadas (ensayos de mareaje con bisbenzamida) D: Células estromales marcadas con bisbenzamida (núcleo celular en verde) y con aspecto de células viables, siete días después del implante, encapsuladas en el soporte de gel, sobre la lesión cerebral. La inmunofluorescencia muestra diferenciación neural de estas células (flecha) que se aprecia por la formación de extensiones citoplásmicas y la expresión de nestina (roja).

### 65 Descripción de la invención

Existe la necesidad en el estado de la técnica de herramientas eficientes para la regeneración de tejido neural en lesiones del SNC.

## ES 2 360 153 A1

En la presente invención, los autores han desarrollado una composición de implante, capaz de promover completamente la multiplicación, migración y diferenciación de células madre en células neuronales sanas, para su empleo como una herramienta eficiente para la regeneración del SNC, en forma de un soporte implantable biocompatible y biodegradable que soporta y orienta la neuroregeneración, estimulando la integración del tejido recientemente formado dentro de las estructuras existentes.

En una realización principal, la presente invención se refiere a una composición de implante biodegradable y biocompatible para la regeneración de tejido neural que comprende los siguientes componentes: a) un soporte de gel formado a partir de un fluido aislado que contiene plaquetas y un agente de activación que comprende cloruro de calcio, con o sin trombina, b) un factor de crecimiento nervioso seleccionado de BDNF, NGF, ácido retinoico y combinaciones de los mismos, y c) un cultivo de al menos 50.000 células madre progenitoras (denominada en lo sucesivo “composición de la invención”).

En el contexto de la presente invención, los siguientes términos deben entenderse del siguiente modo:

Implante o injerto: elemento implantable en un individuo, entendiéndose por “implantable” la capacidad de unirse con el tejido corporal, para reemplazar, corregir o subsanar un defecto, que comprende un elemento de soporte y células aisladas, donde el soporte es una estructura que permite la adhesión y proliferación de las células.

Biocompatible: se refiere a un compuesto que muestra compatibilidad con un tejido vivo o un sistema vivo que no es tóxico, perjudicial, y que no produce rechazo inmunológico.

Biodegradable: se refiere a materiales que son capaces de descomponerse en productos inocuos y que son absorbidos y/o eliminados gradualmente por el cuerpo.

Bioactivo: se refiere a un compuesto que produce un efecto sobre un organismo vivo, sus partes, órganos, células o su metabolismo.

El cultivo de células madre progenitoras aisladas empleado en la composición de la invención puede obtenerse a partir de células madre progenitoras aisladas autólogas o heterólogas.

En el contexto de la presente invención, el término “fluido que contiene plaquetas” es una concentración de plaquetas suspendidas en un pequeño volumen de plasma que actúa de vehículo de factores de crecimiento de plaquetas, que son activamente secretados por las plaquetas, tales como factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico derivado de plaquetas (PDEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento transformante beta ( $TGF-\beta$ ), factor de crecimiento de angiogénesis derivado de plaquetas (PDAF), etc.

El fluido que contiene plaquetas puede ser autólogo o no autólogo. En una realización preferida, el fluido que contiene plaquetas es autólogo. Un gel de plaquetas autólogo se refiere a una composición preparada a partir de un fluido que contiene plaquetas autólogas y de un agente de activación autólogo o no autólogo. La ventaja principal de usar componentes autólogos en la composición es que se reduce el riesgo del receptor de una respuesta inflamatoria o exposición a agentes infecciosos y extraños.

En una realización preferida, el fluido que contiene plaquetas se selecciona entre plasma rico en plaquetas (PRP) o pobre en plaquetas (PPP). En el PRP, la concentración de plaquetas es del 95%, mientras que en el PPP este porcentaje es inferior al 5%.

En una realización particular, si se usa plasma pobre en plaquetas (PPP), la composición del implante comprende adicionalmente factores celulares de las plaquetas añadidos de forma exógena. Estos factores celulares de las plaquetas pueden ser autólogos o heterólogos.

La reacción entre el fluido que contiene plaquetas y el cloruro de calcio, con o sin trombina, produce el gel. Las células pueden mezclarse *ex vivo* con agentes de activación antes de la gelificación de los soportes. De esta forma, las células se atrapan dentro del gel antes de implantarlas en el tejido.

Sin embargo, en una realización particular, el agente de activación puede proporcionarse de forma separada con el objetivo de su aplicación *in situ* al fluido que contiene plaquetas, de manera que el gel se forma en el lugar de la lesión.

En una realización preferida, el soporte de gel se forma a partir de un fluido de plasma rico en plaquetas y cloruro de calcio en una cantidad comprendida entre 25-50  $\mu\text{mol/l}$ . Opcionalmente, la composición puede incluir adicionalmente trombina en una cantidad comprendida entre 0,01-5 UI/ml.

Más preferiblemente, los factores de crecimiento usados en la composición son una combinación de BDNF, NGF y ácido retinoico. En una realización más preferida, la composición del implante biodegradable y biocompatible comprende BDF en una cantidad comprendida entre 50-200 ng/ml, NGF en una cantidad comprendida entre 50-200 ng/ml y ácido retinoico en una cantidad comprendida entre 0,5-2  $\mu\text{g/ml}$ .

## ES 2 360 153 A1

En otra realización principal, la presente invención contempla un método de tratamiento de lesiones en el sistema nervioso central que comprende implantar la composición de la invención en el sitio de la lesión del SNC en un sujeto en necesidad de dicho tratamiento.

5 En una realización particular, el (o los) agentes de activación (componente A) puede aplicarse de forma separada a la composición que comprende el fluido que contiene plaquetas, los factores de crecimiento nerviosos y las células (componente B) en el lugar de la lesión, para formar así el soporte de gel “*in situ*”. Con el fin de poder formar el gel en el sitio de la lesión, los agentes de activación (componente B) deben colocarse al mismo tiempo que el fluido que contiene plaquetas, que comprende las células y los factores de crecimiento neurales (componente A). Con el  
10 fin de poder mezclar homogéneamente estos dos componentes, en la presente invención se usa preferentemente una inyección de doble jeringuilla.

En otra realización principal de la presente invención, se contempla el empleo de la composición de implante de la invención en la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de lesiones del sistema nervioso  
15 central.

Los diferentes componentes de la composición farmacéutica pueden administrarse juntos o bien administrar los agentes de activación de forma separada al resto de componentes.

20 En otra realización particular, la composición farmacéutica puede incluir al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. La expresión “farmacéuticamente aceptable” se refiere a excipientes no tóxicos que no interfieren en la efectividad de la actividad biológica de las células y los demás agentes comprendidos en la composición.

En otra realización principal, la presente invención se refiere al uso de la composición de la invención como  
25 implante para la regeneración neural en lesiones del SNC.

En otra realización principal de la presente invención, se contempla un procedimiento de preparación de la composición de la invención que comprende:

- 30 i) El aislamiento de un fluido que contiene plaquetas,
- ii) El aislamiento y expansión *ex vivo* de células madre progenitoras,
- 35 iii) La combinación de las células madre progenitoras obtenidas en ii) con el fluido que contiene plaquetas obtenido en a) y al menos un factor de crecimiento seleccionado de entre BDNF, NGF, ácido retinoico y combinaciones de los mismos,
- 40 iv) La adición de un agente de activación que comprende cloruro de calcio, con o sin trombina, a la combinación obtenida en iii), y
- v) la gelificación de la mezcla obtenida en iv).

La gelificación del fluido que contiene plaquetas puede colocarse *ex situ* o *in situ*. En el último caso, las etapas iv)  
45 y v) se llevan a cabo “*in situ*”, en el sitio de la lesión.

### Ejemplos

#### 50 *Material y procedimientos*

##### *Aislamiento y caracterización de BMSC*

Se recogieron muestras de médula ósea de hueso trabecular de pacientes adultos hematológicamente normales (de  
55 52 a 60 años) que estaban sometidos a cirugía de sustitución total de cadera rutinaria. El consentimiento se obtuvo en todos los casos. Se tomó un único aspirado de médula ósea (35-50 ml) de cada cresta ilíaca del paciente. Para prevenir la coagulación, la aguja de aspiración se sensibilizó con sulfato de heparina estéril (1000 U/ml). El aspirado de médula ósea se tomó en alícuotas inmediatamente después de la recogida. Cada 4 ml del aspirado se colocaron en capas sobre 3 ml de Ficoll-Hypaque TM Plus estéril (Stem Cell Technologies Inc. Vancouver, BC, Canadá) en tubos cónicos de 15 ml. La suspensión resultante se centrifugó a 1500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó la capa mononuclear en la superficie de separación entre el Ficoll-Hypaque y el plasma y se resuspendió en 10 ml de medio  $\alpha$ -MEM/2,5FBS y se efectuaron pases a través de filtros celulares de 70  $\mu$ m. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en medio  $\alpha$ -MEM/2,5FBS. El número y la viabilidad celular se determinaron usando la prueba con azul de tripano y las células se sembraron a una densidad 5000 células/cm<sup>2</sup> en  
65 matraces T-75 con  $\alpha$ -MEM complementado con suero bovino fetal al 10%, 1000 unidades/ml de penicilina, 1000  $\mu$ g/ml de sulfato de estreptomina, 0,25  $\mu$ g/ml. Los cultivos se llevaron a cabo en un incubador desgasificado a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. La primera sustitución del medio de cultivo celular se llevó a cabo en el día 3 para eliminar las células no adherentes. El posterior cambio del cultivo celular se realizó cada 2-3 días. Posteriormente se usaron las BMSC

## ES 2 360 153 A1

del pase 1-2. El análisis de citometría de flujo se usó para determinar marcadores específicos en las células cultivadas. Las células en suspensión se mezclaron con anticuerpos conjugados con fluorocromo contra CD29, CD31, CD44, CD45, CD105 y CD166 (R&D Systems SL, Inc. Minn. EE.UU.). Los anticuerpos de isotipo apropiado se usaron para controlar la tinción no específica. La tinción se realizó según las recomendaciones del fabricante. Las células inmunoteñidas se adquirieron y se analizaron en un citómetro de flujo (Cytomic FC 500-MPL, Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA, EE.UU.).

### Preparación de soportes de FG

Los soportes de FG se prepararon usando 5 ml de un kit Tissucol® Duo (Baxter SL, Valencia, España) según las instrucciones del fabricante. Se formó un gel de fibrina mezclando dos disoluciones separadas. La disolución A estuvo constituida por fibrinógeno (100 mg/ml), 10 UI de factor XIII, 9 mg de fibronectina y 120 mg/ml de plasminógeno humano, disuelta en una disolución de 3000 IUK de aprotinina bovina, albúmina humana, glicina, cloruro sódico, citrato de sodio, polisorbato 80, creatina y agua. La disolución B estuvo constituida por 500 UI de trombina humana y 40  $\mu$ moles de cloruro de calcio, disuelta en una disolución de cloruro sódico. La disolución A y B se mezclaron en una relación 1:1. Las disoluciones se prepararon disolviendo fibrinógeno en agua destilada estéril. En el presente estudio de los inventores se probaron cuatro concentraciones diferentes de fibrinógeno: 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml y 100 mg/ml, y también se probaron cuatro concentraciones diferentes de trombina (2 UI/ml, 4 UI/ml, 100 UI/ml y 500 UI/ml) en cloruro de calcio (40  $\mu$ moles/ml).

Para los experimentos, los soportes de FG se prepararon usando diversas diluciones de la disolución A y B, y se identificaron por sus concentraciones respectivas de fibrinógeno y trombina (Tabla I). Todos los soportes de FG se polimerizaron usando 100  $\mu$ l de disolución A y 100  $\mu$ l de disolución B en placas P<sub>35</sub>, y se realizaron pequeños explantes de 200  $\mu$ l (aproximadamente 10 explantes por placa). Los soportes se polimerizaron primero y luego se incubaron durante 1 hora a 37°C, 95% de humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub>. La reacción entre A y B produjo un gel. Los inventores usaron un total de seis placas P<sub>35</sub> para cada tipo de soporte. Las hBMSC se mezclaron con componente de trombina antes de la polimerización de los soportes con una total de 50.000 células por explante. Posteriormente, a cada placa se añadieron 3 ml de medio de cultivo completo de  $\alpha$ -MEM/SBF al 10%. Las observaciones morfológicas de células atrapadas dentro del gel se hicieron diariamente durante siete días con un microscopio invertido.

TABLA I

Concentración final de disoluciones de fibrinógeno y trombina para preparar los soportes de FG

Disolución de fibrinógeno (mg/ml)	Disolución de trombina (UI/ml)	Soporte (fibrina/trombina)	Número de P <sub>35</sub>
5	2	5/2	6
10	4	10/4	6
20	100	20/100	6
100	500	100/500	6

### Preparación de soportes de PRP

Para la preparación de soportes de PRP, se obtuvo la sangre periférica de pacientes donantes sanos y se recogió en tubos con citrato de sodio al 3,8% (0,5 cc de sangre completa, citrato/4,5 cc). Las muestras de sangre anticoaguladas se centrifugaron a 2000 g durante 15 minutos para eliminar los eritrocitos. El sobrenadante se recogió y se realizó una segunda centrifugación a 2400 g durante 6 minutos. Cada 4,5 cc, la sangre se recogió en tubos que contenían 500  $\mu$ l de citrato de sodio al 3,8% como anticoagulante. La sangre se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos y se separó el plasma amarillo que contenía la fracción de PRP. Para la formación del gel sólo se añadieron 100  $\mu$ l de cloruro de calcio al 10% (34  $\mu$ moles/ml) o 50  $\mu$ l de cloruro de calcio al 10% con 50  $\mu$ l de trombina (2, 4, 100 y 500 UI) por cada 100  $\mu$ l de PRP. Todos los soportes de plasma se polimerizaron en placas P<sub>35</sub> preparadas a partir de pequeños explantes de 200  $\mu$ l (aproximadamente 10 explantes por placa). Los soportes se polimerizaron primero y luego se incubaron durante 1 hora a 37°C, humedad relativa del 95% y 5% de CO<sub>2</sub>. La reacción entre PRP y cloruro de calcio, con o sin trombina, produjo un gel. En cada grupo se estudiaron seis placas P<sub>35</sub>. Para los experimentos, los soportes de plasma se prepararon usando diversas disoluciones (Tabla II). Los soportes preparados con PRP se identificaron por la concentración de trombina. Las células se mezclaron con el componente de la trombina o cloruro de calcio antes de la polimerización de los soportes, con un total de 50.000 células por explante. Posteriormente, a cada placa se añadieron 3 ml de medio de cultivo completo de  $\alpha$ -MEM/SBF al 10%. Las observaciones morfológicas de células atrapadas dentro del gel se hicieron diariamente durante siete días con un microscopio invertido.

TABLA II

*Cantidades finales de disoluciones de plasma y trombina para preparar los diferentes soportes de PRP*

Disolución de plasma (µl)	Disolución de trombina (UI/ml)	Cl <sub>2</sub> Ca 34 µmoles/ml (µl)	Número de P <sub>35</sub>
100	0	50	6
100	2	50	6
100	4	50	6
100	100	50	6
100	500	50	6

#### *Estudios citológicos*

La viabilidad celular se determinó observando la morfología celular con microscopio invertido y usando una escala basada en el estudio de Willerth y col. "Optimization of fibrin scaffolds for differentiation of murine embryonic stem cells into neural lineage cells. *Biomaterials* 2006; 27:5990-6003. En esta escala, (-): Las células muertas pueden verse flotando en el medio de cultivo (todas las células). (+): Unas pocas células están vivas y su morfología es redondeada. (++) : Muchas células están vivas, pero sólo unas pocas expansiones son citoplásmicas, el resto permanecen redondas. (+++) : Parece que la mayoría de las células están vivas y muchas muestran una morfología fibroblástica. (++++): Parece que todas las células están vivas y todas muestran una clara morfología fibroblástica.

Para determinar el grado de infiltración de células en la matriz y el grado de diferenciación celular basándose en extensiones citoplásmicas, los inventores usaron la siguiente escala (Willerth y col.): (-): Las células permanecen indiferenciadas y la mayoría tiene una morfología redondeada. (+): Las células permanecen indiferenciadas y sólo unas pocas mostraron una morfología fibroblástica. (++) : Las células permanecen indiferenciadas, pero la mayoría muestra una morfología fibroblástica. (+++) : Unas pocas células empiezan a mostrar cambios en el tamaño del citoplasma, y algún grado de protuberancias similares a neuritas. (++++): La mayoría de las células muestran cambios significativos en su citoplasma y tienen mucho grado de protuberancias similares a neuritas. (+++++) : Todas las células muestran cambios significativos en su citoplasma y tienen mucho grado de protuberancias similares a neuritas.

#### *Ensayo TUNEL y tinción con bromuro de etidio*

Para el ensayo de marcado de extremos cortados por dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL), los cultivos se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces en tampón de solución salina tamponada con Tris (TBS). Entonces, las células se permeabilizaron en Tritón X-100 al 1% con citrato de sodio al 0,1% durante 15 minutos y se lavaron 3 veces en tampón TBS. Entonces, la presencia de células apoptóticas se ensayó con la mezcla de marcado TUNEL (TACS XL DAB, R&D Systems, Inc. Minneapolis, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de una serie de aclarados, los nucleótidos marcados con digoxigenina se añadieron enzimáticamente al ADN mediante la enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT). La incubación se llevó a cabo durante 60 min. El ADN marcado se detectó usando anti-digoxigenina peroxidasa o anti-digoxigenina-FIT conjugada durante 30 min. El cromógeno tetraclorhidrato de diaminobencidina (DAB) produjo un producto de reacción marrón que se evaluó por microscopía óptica o microscopía de fluorescencia. Los controles positivos y negativos se llevaron a cabo en portaobjetos del mismo bloque. La incubación sin TdT sirvió de control negativo. Para realizar el recuento de células se estudiaron al menos 10 campos microscópicos a 40 x, se registró el porcentaje de células inmunoteñidas y se promedió. Los inventores describieron su hallazgo como los resultados promedio (media ± DE). Después de 7 días en cultivo, la viabilidad celular se midió usando 50 µg/ml de bromuro de etidio (P4170, Sigma, Madrid, España) para identificar células muertas mediante su fluorescencia roja.

#### *Diferenciación celular*

Para los estudios de diferenciación neural, se cultivaron hBMSC sobre soportes de FG y PRP. Los soportes de FG con fibrinógeno/trombina 5/2, 10/4, 20/100 y 100/500 se prepararon añadiendo el factor de crecimiento correspondiente: factor neurotrófico derivado de cerebro humano recombinante (BDNF) a 100 ng/ml (Chemicon International Inc, Temecula, CA, EE.UU.), factor de crecimiento nervioso (NGF)-7S, a 100 ng/ml (Sigma-Aldrich SL, Madrid, España) y ácido retinoico (AR) a 1 µg/ml (Sigma-Aldrich SL, Madrid, España) al componente de fibrinógeno. Los

## ES 2 360 153 A1

soportes de PRP (2 UI, 4 UI, 100 UI y 500 UI) se prepararon añadiendo el factor de crecimiento correspondiente (NGF a 100 ng/ml, BDNF a 100 ng/ml y AR a 1  $\mu$ g/ml) al componente de plasma. Todos los soportes se polimerizaron en placas P<sub>35</sub> realizándose pequeños explantes de 200  $\mu$ l (aproximadamente 3 explantes por placa) usando un total de 36 placas, tres para el estudio de cada factor de crecimiento, para cada tipo de soporte. Los soportes se polimerizaron primero y luego se incubaron durante 1 hora a 37°C, humedad relativa del 95% y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se mezclaron con el componente de trombina o con cloruro de calcio antes de la polimerización, con un total de 50.000 células por explante. Posteriormente, a cada placa se añadieron 3 ml de medio de cultivo completo de  $\alpha$ -MEM/SBF al 10%. El medio de cultivo se renovó diariamente durante siete días añadiendo factores de crecimiento a las concentraciones iniciales. Después de siete días de cultivo se realizaron los estudios morfológicos, inmunocitoquímicos y de RT-PCR.

### *Análisis inmunocitoquímico*

Para confirmar la diferenciación de hBMSC, se realizó inmunocitoquímica durante 7 días de cultivo dentro de los soportes de fibrina y PRP. El medio se eliminó de cada soporte y cada pocillo se aclaró con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4). Las células se fijaron dentro del soporte con disolución de paraformaldehído al 4% durante 1 hora a temperatura ambiente. Entonces, las muestras se sumergieron en tapón de sacarosa al 30% durante 1 hora y se incluyeron en OCT para cortarse a 20  $\mu$ m bajo congelación. Se tiñeron dos secciones histológicas de cada soporte usando la técnica convencional de hematoxilina-eosina. Las células se permeabilizaron mediante la adición de Triton-X al 0,1% diluido en PBS durante 45 minutos. Las células se bloquearon usando suero de cabra al 5% diluido en PBS durante 1 hora y el anticuerpo primario se aplicó durante la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios usados se dirigieron contra anticuerpo monoclonal anti-proteína  $\beta$ -III-tubulina de ratón (2  $\mu$ g/ml, Chemicon International Inc. Temecula, CA, EE.UU.), anticuerpo monoclonal anti-*nestina* de ratón (1  $\mu$ g/ml, International Inc. Temecula, CA, EE.UU.), anticuerpo monoclonal anti-MAB1580 de ratón (1:200, Chemicon International Inc. Temecula, CA, EE.UU.), anticuerpo monoclonal anti-proteína ácida fibrilar glial de ratón (GFAP) (1  $\mu$ g/ml, Chemicon International Inc. Temecula, CA, EE.UU.) y anticuerpo monoclonal anti-proteína Ki-67 de conejo (1:200, LabVision Westinghouse, Dr. Fremont, CA, EE.UU.). Posteriormente, las secciones se lavaron en PBS y se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa de rábano picante (Vector Inc. CA, EE.UU.). Se usó 3',3'-diaminobencidina (DAB) como cromógeno. Los trozos de control, que carecían de anticuerpos primarios o secundarios, se analizaron con cada serie. Las secciones se estudiaron usando microscopía óptica. Algunos cortes incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón 2-conjugada a Cy<sup>TM</sup> (1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. Baltimore Pike, EE.UU.) anti-IgG de conejo conjugada a rodamina (TRICT) (1:200, Jackson) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS, las secciones se tiñeron con diclorhidrato de 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Merck KgaA, Darmstadt, Alemania) y se montaron con glicerina. Las secciones se estudiaron usando microscopía de fluorescencia. La tinción de control sin anticuerpo primario se usó como control negativo. Para cada marcador celular se estudiaron al menos 10 campos microscópicos a 40 x; se promedió el porcentaje de células inmunoteñidas y se registró. Los inventores describieron su hallazgo como los resultados promedio (media  $\pm$  DE) de 6 experimentos sucesivos usando la metodología descrita.

### *Estudios ultraestructurales*

Para la microscopía electrónica de transmisión, los especímenes se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en un tampón de cacodilato de sodio 0,06 M (pH 7,35) durante 48-72h a 4°C, se aclararon en tampón de cacodilato de sodio 0,2 M y se fijaron posteriormente con tetróxido de osmio al 1% a temperatura ambiente. Entonces, las muestras se aclararon en disolución de cloruro sódico al 2,4%, se lavaron en tampón de acetato sódico 0,2 M (pH: 5,0) y el bloque se tiñó con acetato de uranilo al 1% en tampón de acetato sódico 0,2 M (pH: 5,0) en la oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. Se siguieron procedimientos rutinarios para la deshidratación en alcohol y la incorporación en araldita. Las secciones ultradelgadas (50-70 nm) se contrastaron con citrato de plomo y acetato de uranilo, y se visualizaron usando un microscopio electrónico Philips EM-200. Además, la superficie de los soportes de FG y PRP se estudió por medio de microscopía electrónica de barrido ambiental.

### *Estudios de RT-PCR*

Para el análisis de RT-PCR, las muestras de ARN total se purificaron a partir de hBMSC cultivadas usando un kit de extracción de ARN (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) según las instrucciones del fabricante y luego se trataron para eliminar la contaminación de ADN genómico usando ADNsa I (Bionova, Madrid, España). Las concentraciones de ARN se determinaron midiendo la absorbancia a 260 nm. El ADN de cadena complementaria se sintetizó usando el kit RT-PCR (Eppendorf AG) según las instrucciones del fabricante. Como desnaturalización inicial se realizó durante 5 min a 94°C seguida por treinta ciclos constituidos por 45 segundos de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de hibridación del cebador a 58°C y 45 segundos de alargamiento a 72°C. La ejecución se completó con una etapa de extensión final durante 5 min a 72°C. Los productos de PCR se resolvieron en gel de agarosa al 1,2% y se visualizaron usando bromuro de etidio (0,5  $\mu$ g/ml, Bio-Rad, Madrid, España). Las secuencias de cebadores usadas para las expresiones de genes específicos neuronales y gliales fueron: *nestina* aguas arriba 5'-CAGGCTTCTCTGGCTTTCTGG-3' (SEQ ID N° 1), *nestina* aguas abajo 5'-TGGTGAGGTTGAGGTTTGT-3' (SEQ ID N° 2), tamaño de producto de PCR: 431 pb;  $\beta$ -III-tubulina aguas arriba 5'-TGCGTGTGTACAGGTGAATGC-3' (SEQ ID N° 3),  $\beta$ -III-tubulina aguas abajo 5'-GGCTGCATAGTCATTTCCAAG-3' (SEQ ID N° 4), tamaño de producto de PCR 240 pb; GFAP aguas arriba

## ES 2 360 153 A1

5'-GTGGGCAGGTGGGAGCTTGATTCT-3' (SEQ ID N° 5), GFAP aguas abajo 5'-CTGGGGCGGCCTGGTATGACA-3' (SEQ ID N° 6), tamaño de producto 141 pb; GADPH aguas arriba 5'-CCCACGGCAAGTTCAACGGCA-3' (SEQ ID N° 7), GADPH aguas abajo 5'-TGGCAGGTTTCTCCAGGCGGC-3' (SEQ ID N° 8), tamaño de producto 430 pb. Los experimentos de control se llevaron a cabo con gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GADPH).

### Ejemplo 1

*Estudio comparativo entre implantes de gel de fibrina e implantes de gel de PRP en el favorecimiento de la multiplicación, migración y diferenciación celular*

#### *Morfología celular después de siete días en cultivo*

En el presente estudio, las hBMSC mostraron el siguiente perfil después de los estudios fenotípicos de citometría de flujo: CD29+, CD44+, CD105+, CD166+, CD34-, CD45-.

Los soportes de FG fueron coherentes y bastante manejables, pero las hBMSC no se adhirieron adecuadamente a la malla de fibrina y a las pocas horas del cultivo pareció que se formaban conjuntos de células con una morfología redondeada y sólo ocasionalmente pudieron mostrar células con una morfología mesenquimal típica (Tabla III).

TABLA III

*Aspectos morfológicos de las hBMSC sembradas en el transcurso de los siete días de cultivo, según la escala descrita en la metodología (Whillert y col.)*

<b>Soporte de FG:</b>	<b>Soporte 5/2</b>	<b>Soporte 10/4</b>	<b>Soporte 20/100</b>	<b>Soporte 100/500</b>
día 1	+	+	++	+
día 2	+	+	++	+
día 3	+	+	++	+
día 4	+	++	++	+
día 5	++	++	++	+
día 6	++	++	++	+
día 7	++	++	++	++

La Figura 1 muestra diferentes aspectos morfológicos de soportes de FG y hBMSC sembradas sobre ellos. Los soportes de FG 5/2 y 10/4 mostraron una consistencia de líquido moderada similar (fig. 1.C). Fueron relativamente más difíciles de manipular y no pudieron manipularse fácilmente después de 7 días en cultivo. Las hBMSC sembradas sobre un soporte de FG 10/4 muestran morfología esférica después de 7 días de cultivo (fig. 1.E). No pudieron unirse las células sembradas sobre estos soportes y, por tanto, se expandieron y proliferaron, si no la viabilidad no hubiera superado el 50% ± 9,3% después de la tinción con bromuro de etidio. Los soportes de FG 20/100 tenían una consistencia más manipulable (fig. 1.D) y la viabilidad celular aumentó hasta el 69,5% ± 12,5%. Sin embargo, la mayoría de las células permanecieron con morfología redondeada (fig. 1.F) (técnica de H & E), y muy pocas hBMSC que se expandieron mostraron extensiones citoplásmicas típicas (fig. 1.G) (técnica de H & E). Los soportes de FG 100/500, cuya consistencia fue muy compacta (fig. 1.B), mostraron un aumento significativo en la muerte celular, aproximadamente el 90% ± 7,8% (10% ± 2,5% de viabilidad después de la tinción con bromuro de etidio), mostrando, por tanto, escasa proliferación o ninguna. Las células no se estiraron y en la mayoría de los casos mantuvieron una morfología esférica atrapada entre las redes de la malla de fibrina (fig. 1.H) (técnica de H & E). Morfológicamente, las hBMSC tenían un aspecto apoptótico con núcleos normalmente condensados y formación de cuerpos apoptóticos (fig. 1.I.J) (técnica de H & E). Estos hallazgos se confirmaron con microscopía electrónica, mostrando cromatina nuclear condensada alrededor de la membrana nuclear y un citoplasma retraído en el que había numerosos orgánulos y vesículas pequeños. Además de estas células, los cuerpos apoptóticos estaban rodeados por membrana y cromatina condensada dentro. La microscopía electrónica de barrido ambiental mostró una malla de fibrina muy gruesa que formaba una estructura compacta e impedía el paso del medio de cultivo.

Los soportes de PRP que contenían trombina eran coherentes, estables y manipulables sin dificultad. En todos los geles observados, las hBMSC se adhirieron adecuadamente a las proteínas de matriz desde el primer día del cultivo, de manera que tras unas pocas horas de cultivo podían encontrarse células dispersadas uniformemente entre la malla de proteína (Tabla IV).

TABLA IV

Aspecto morfológico de las hBMSC sembradas en el transcurso de los siete días de cultivo, según la escala descrita en la metodología (Willerth y col.)

Soporte de PRP:	0 UI de trombina	2 UI de trombina	4 UI de trombina	100 UI de trombina	500 UI de trombina
día 1	+++	++	++	+++	+++
día 2	+++	++	++	+++	+++
día 3	+++	++	++	++++	+++
día 4	++++	+++	+++	++++	++++
día 5	++++	++++	++++	++++	++++
día 6	++++	++++	++++	++++	++++
día 7	++++	++++	++++	++++	++++

La Figura 2 muestra diferentes aspectos morfológicos de soportes de PRP y hBMSC sembradas sobre ellos.

Estas células mostraron una morfología mesenquimal típica, con un citoplasma expandido, expansiones citoplásmicas y una gran capacidad de proliferación, un hallazgo para el que el número aumentó exponencialmente a lo largo de los siete días del estudio. En ningún momento se observaron imágenes coherentes con células apoptóticas. La viabilidad medida mediante tinción con bromuro de etidio mostró una supervivencia del 99,5%. En estudios ultraestructurales, las hBMSC cultivadas sobre soportes de PRP mostraron una morfología típica con núcleos redondeados u ovoides, amplio retículo endoplásmico, mitocondrias y numerosas vesículas citoplásmicas. La eficacia de este agente como coagulante se observó en los soportes de PRP que contenían cloruro de calcio (34  $\mu$ moles/ml), obteniéndose geles con buena consistencia y fáciles de manipular. Además, el comportamiento de las células fue muy similar al observado en los soportes en los que se usó trombina y hBMSC adheridas al soporte, mostrando un citoplasma expandido con numerosas extensiones y frecuentes figuras mitóticas. La viabilidad de las células después de la tinción con bromuro de etidio fue del  $99,5\% \pm 7,5\%$  y no se observaron imágenes coherentes con apoptosis. Los soportes formados con 2 UI y 4 UI mostraron una consistencia moderada, demasiado líquidos para ser manipulados satisfactoriamente después de la polimerización (fig. 2B). Sin embargo, los soportes polimerizados con 100 UI y 500 UI se manipularon fácilmente. Específicamente, con 100 UI, la consistencia del gel permite una fácil manipulación (fig. 2C) y con 500 UI, el soporte de PRP muestra una consistencia sólida, pero porosa (fig. 2D). Además, la consistencia del gel no pareció afectar significativamente el comportamiento celular, en todos los casos la viabilidad celular permaneció aproximadamente del  $99\% \pm 6,4\%$ , siendo algo inferior en los soportes de 2 UI y 4 UI, en los que los cuatro primeros días de cultivo la viabilidad celular disminuyó al  $68\% \pm 8,7\%$ , pero posteriormente se recuperó para alcanzar una viabilidad del  $99\% \pm 12,6\%$  al final de la primera semana de cultivo. En estos soportes, la microscopía electrónica de barrido ambiental mostró una superficie suelta y áspera constituida por muchos filamentos de proteínas de menor diámetro que en los soportes de FG, y formando una estructura relativamente suelta, permitiendo la entrada de medio de cultivo (fig. 2.E-H). Las superficies de soportes de PRP se cubrieron por hBMSC con morfología fibroblástica, y pudieron verse redes de proteínas adherentes y numerosas plaquetas atrapadas en esta red (fig. 2.I-P).

#### Viabilidad y proliferación celular

La capacidad de proliferación de hBMSC sobre soportes de FG y PRP se midió basándose en la expresión de Ki67 (fig. 3.A-B), y la tasa de muerte celular se evaluó mediante tinción TUNEL, después de siete días de cultivo (Fig. 3.C-D). Además del estudio de hBMSC mediante la técnica TUNEL, la presencia de células que experimentaban muerte celular mediante apoptosis en los diferentes soportes siempre se confirmó mediante microscopía electrónica. Los resultados mostraron que en el caso de soportes de FG, el porcentaje de células positivas para TUNEL era mucho mayor que el porcentaje de proliferación celular, independientemente del tipo de soporte de FG analizado. Esta diferencia en el equilibrio muerte/proliferación celular era mucha más pronunciada en el caso de soportes de FG 5/2 y 100/500 (Tabla V).

## ES 2 360 153 A1

TABLA V

*Porcentaje de hBMSC que muestran positividad para TUNEL y Ki-67 en los diferentes soportes de FG*

<b>Soporte de FG:</b>	<b>Soporte 5/2</b>	<b>Soporte 10/4</b>	<b>Soporte 20/100</b>	<b>Soporte 100/500</b>
TUNEL (%)	71 ± 6,4	68 ± 3,2	63 ± 9,5	80 ± 7,8
Ki-67 (%)	1,9% ± 0,2	2,3% ± 0,9	5% ± 4,1	0,8 ± 0,2

Por otra parte, el equilibrio proliferación/apoptosis para hBMSC sembradas sobre soportes de PRP se inclinó hacia el lado de la proliferación, siendo mucho más pequeño el número de células positivas para TUNEL. Las hBMSC cultivadas sobre soportes de PRP mostraron una alta tasa de proliferación (87,9% ± 16,7% al 99% ± 13,7%) siendo ligeramente superior en los casos de soportes de 0 UI, 100 UI y 500 UI (aproximadamente el 99%) en comparación con los soportes de 2 UI y 4 UI de PRP (aproximadamente el 87%). Similarmente, el número de células positivas para TUNEL fue muy pequeño (2,1% ± 4,9 %) (Tabla VI).

TABLA VI

*Porcentaje de hBMSC que muestran positividad para TUNEL y Ki-67 sobre los diferentes soportes de PRP*

<b>Soporte de PRP:</b>	<b>0 UI de trombina</b>	<b>2 UI de trombina</b>	<b>4 UI de trombina</b>	<b>100 UI de trombina</b>	<b>500 UI de trombina</b>
TUNEL (%)	0,89 ± 0,13	2,1% ± 4,9	1,7% ± 0,3	0,3% ± 0,01	0,8% ± 0,02
Ki-67 (%)	95% ± 13,2	89% ± 15,1	87,9% ± 16,7	99% ± 8,95	99% ± 13,7

### *Diferenciación celular*

El estado de diferenciación de hBMSC en soportes de FG durante 7 días se evaluó usando morfología e inmunocitoquímica. Para confirmar que las hBMSC se diferenciaban en fenotipos neurales, estas células se tiñeron para nestina, β-III-tubulina y GFAP.

Después de siete días de cultivo en presencia de diferentes factores de crecimiento, las hBMSC sembradas sobre soportes de FG mostraron escasos signos de diferenciación debido a una pobre supervivencia de estas células (Tabla VII).

TABLA VII

*Cambios morfológico en las hBMSC sembradas sobre los soportes de FG, después de inducción de diferenciación por los diferentes factores de crecimiento. Siete días de cultivo. La morfología se registró según la escala descrita en la metodología (Willerth y col.)*

<b>Soporte de FG:</b>	<b>Soporte 5/2</b>	<b>Soporte 10/4</b>	<b>Soporte 20/100</b>	<b>Soporte 100/500</b>
NGF	-	++	+++	-
BDNF	-	+++	++++	-
AR	-	+	+	-

Cuando los soportes de FG se trataron con NGF, generalmente no se observaron cambios morfológicos coherentes con la diferenciación neural de las h-BMSC sembradas. En los soportes de GF 10/4, las hBMSC no eran tan redondeadas como en cultivos convencionales, a pesar de la ausencia de cambios morfológicos de diferenciación neural, y pareció que se adherían más al soporte, expandiéndose y adquiriendo una morfología fibroblástica. En los soportes de

FG 20/100 tratados con NGF, algunas células (10% de las células vivas) mostraron ligeros cambios en su citoplasma y algunas expansiones citoplásmicas que se interpretaron como expansiones similares a neuritas. El resto de las células permanecieron con una morfología fibroblástica típica. En los soportes de FG 5/2 y 100/500, no hubo signos de diferenciación neural en ese momento, y las hBMSC mantuvieron una morfología redondeada. Sin embargo, el tratamiento con BDNF mostró mejores resultados. En soportes de FG 10/4, un pequeño porcentaje de células (11,2% ± 3,4% de células vivas) empezó a mostrar cambios en el tamaño de su citoplasma y a presentar algunas protuberancias similares a neuritas. En los soportes de FG 20/100, la mayoría de las células (70,6% ± 15,6% de células vivas) mostraron signos de diferenciación neural tales como encogimiento citoplásmico y una presencia significativa de numerosas protuberancias similares a neuritas. En los soportes de FG5/2 y 100/500 no hubo signos de diferenciación neural, y las hBMSC mantuvieron una morfología redondeada.

Cuando los soportes de FG se trataron con AR, las hBMSC mostraron algunos signos de diferenciación neural, después del mismo tiempo de cultivo. En los soportes de FG 10/4 y 20/100, un pequeño porcentaje de células (5,6% ± 2,4% de células vivas) mostró una morfología fibroblástica, pero el resto permaneció indiferenciado con morfología redondeada. En los soportes de FG 5/2 y 100/500, las hBMSC permanecieron como células indiferenciadas, mostrando la mayoría de ellas una morfología redondeada. Los estudios inmunohistoquímicos confirmaron los hallazgos morfológicos de diferenciación neural. La Tabla VIII muestra el porcentaje de células que expresan nestina, β-III-tubulina y GFAP.

TABLA VIII

*Diferenciación neural de hBMSC en los diferentes soportes de FG de los inventores, en presencia de NGF, BDNF y AR. Siete días de cultivo*

Soporte de FG	Soporte 5/2	Soporte 10/4	Soporte 20/100	Soporte 100/5
<b><u>FG + NGF</u></b>				
Nestina	-	-	93,8 ± 2,3	-
β-III-tubulina	-	-	6,2 ± 1,7	-
GFAP	-	-	0	-
<b><u>FG + BDNF</u></b>				
Nestina	-	13,2 ± 5,6	75 ± 5,2	-
β-III-tubulina	-	-	20 ± 9,4	-
GFAP	-	-	5 ± 3,4	-
<b><u>FG + AR</u></b>				
Nestina	-	-	-	-
β-III-tubulina	-	-	-	-
GFAP	-	-	-	-

Estuvo ausente la expresión inmunocitoquímica de MAB 1580, sugiriendo la ausencia de diferenciación oligodendroglial. Después de siete días de cultivo, los soportes de PRP tratados con NGF mostraron un alto porcentaje global de células con signos de diferenciación neural, con algún encogimiento del citoplasma y protuberancias similares a neuritas. Estos resultados fueron más relevantes en los soportes de PRP con 0 UI, 100 UI y 500 UI de trombina, en los que el 78,2% ± 6,9% de las células mostraron signos significativos de diferenciación neural. En los soportes de PRP con 2 UI y 4 UI de trombina, la mayoría de las células permanecieron indiferenciadas y, después de siete días de cultivo, sólo un porcentaje muy pequeño de ellas (4,91% ± 1,5%) empezó algunos signos de diferenciación neural en los soportes de PRP con 4 UI de trombina. En este momento, todas las hBMSC mostraron signos morfológicos de diferenciación neural en los soportes de PRP con 100 y 500 UI de trombina y se trataron con BDNF, mientras que el 70,6% ± 4,9% de hBMSC mostraron diferenciación neural en los soportes de PRP con 0 UI y 4 UI de trombina, y el 6,21% ± 4,6% de hBMSC mostraron diferenciación neural en los soportes de PRP con 2 UI de trombina. Los resultados en el grupo de soportes de PRP tratados con ácido retinoico fueron diferentes. En los soportes con 100 y 500 UI de trombina se encontró una tasa del 68,9% ± 7,85% de células con cambios morfológicos significativos de diferenciación neural. En los soportes de PRP con 0 UI y 4 UI de trombina, los cambios coherentes con la diferenciación neural se observaron en el 5,3% ± 2,3% de las células. En los soportes de PRP con 2 UI de trombina se encontraron pocos signos de diferenciación neural, permaneciendo la mayoría de las hBMSC cultivadas con una morfología fibroblástica (Tabla IX).

TABLA IX

*Cambios morfológicos en las hBMSC sembradas sobre los soportes de PRP de los inventores, después de la inducción de diferenciación por el crecimiento diferente. Siete días de cultivo. La morfología se registró según la escala descrita en la metodología (Willerth y col.)*

<b>Soporte de PRP:</b>	<b>0 UI de trombina</b>	<b>2 UI de trombina</b>	<b>4 UI de trombina</b>	<b>100 UI de trombina</b>	<b>500 UI de trombina</b>
NGF	++++	++	+++	++++	++++
BDNF	++++	+++	++++	+++++	+++++
AR	+++	++	+++	++++	++++

Los cambios morfológicos coherentes con la adquisición de un fenotipo neural estaban acompañados de la expresión de marcadores inmunohistoquímicos, tales como nestina,  $\beta$ -III-tubulina y GFAP. Estuvo ausente la expresión inmunocitoquímica de MAB 1580, sugiriendo la ausencia de diferenciación oligodendroglial. La Tabla X muestra el porcentaje de hBMSC inmunoteñidas dependiendo del factor de crecimiento usado.

TABLA X

*Diferenciación neural de hBMSC sobre los diferentes soportes de PRP de los inventores, en presencia de NGF, BDNF y AR. Siete días de cultivo*

<b>Soporte de PRP:</b>	<b>0 UI de trombina</b>	<b>2 UI de trombina</b>	<b>4 UI de trombina</b>	<b>100 UI de trombina</b>	<b>500 UI de trombina</b>
<b><u>PRP + NGF</u></b>					
Nestina	10,2 $\pm$ 5	2,7 $\pm$ 0,5	2,7 $\pm$ 0,14	9 $\pm$ 6,4	7,2 $\pm$ 1,8
$\beta$ -III-tubulina	17,1 $\pm$ 6,2	8,61 $\pm$ 3,1	12,2 $\pm$ 5,7	25,6 $\pm$ 5,9	39,6 $\pm$ 5,6
GFAP	14,2 $\pm$ 3,2	3,1 $\pm$ 0,65	6,81 $\pm$ 3,6	18,9 $\pm$ 6,7	24,7 $\pm$ 6,5
<b><u>PRP+BDNF</u></b>					
Nestina	9,45 $\pm$ 3	4 $\pm$ 2,1	6,1 $\pm$ 2,4	1 $\pm$ 2,7	12,1 $\pm$ 2,8
$\beta$ -III-tubulina	19,2 $\pm$ 3,5	9 $\pm$ 5,3	12,6 $\pm$ 4	27,2 $\pm$ 5,9	40,8 $\pm$ 3,27
GFAP	14,7 $\pm$ 2,1	6 $\pm$ 2,5	4,3 $\pm$ 0,1	20,2 $\pm$ 6	29,6 $\pm$ 8,6
<b><u>PRP+AR</u></b>					
Nestina	5,1 $\pm$ 0,1	3 $\pm$ 2,4	6,4 $\pm$ 2,1	9,1 $\pm$ 6,2	8,5 $\pm$ 0,4
$\beta$ -III-tubulina	12,3 $\pm$ 7,5	9,2 $\pm$ 3,5	10,9 $\pm$ 3,7	31,2 $\pm$ 7,8	29 $\pm$ 8,6
GFAP	4,2 $\pm$ 3,4	1,9 $\pm$ 0,8	3,41 $\pm$ 2,6	8,6 $\pm$ 3,5	11,2 $\pm$ 2,9

Para confirmar estos resultados se realizaron análisis de RT-PCR de hBMSC cultivadas, y los resultados mostraron una fuerte correlación con hallazgos morfológicos e inmunocitoquímicos. Una semana después del tratamiento se encontró la presencia de ARNm de nestina, y una fuerte expresión de ARNm neuronal ( $\beta$ -III-tubulina) y astroglial (GFAP), (Figura 4).

#### Ejemplo 2

Se usó un total de 10 ratas Wistar. Todas ellas se sometieron a lesión cortical mediante resección de la corteza cerebral al nivel parietal después de craneotomía. Inmediatamente después de la lesión, la sangre se extrajo de los animales y el gel se preparó según el protocolo:

## ES 2 360 153 A1

Componente A: Plasma rico en plaquetas (PRP) + células (500.000) + BDNF (100 ng/ml)

Componente B: Trombina 5 UI + cloruro de calcio (34 micromoles/ml).

5

Ambos componentes se mezclaron y el gel resultante se colocó sobre la lesión cerebral en 6 animales (fig. 5A y B). El mismo protocolo se llevó a cabo en 4 animales, pero sin células.

10 Después de una semana se llevaron a cabo estudios histológicos. En la figura 5C se muestra el aspecto de células injertadas (estudio desarrollado mediante análisis de marcas de bisbencimida). Se observó que las células injertadas mostraban un aspecto normal y su viabilidad era superior al 60%. En los animales en los que se implantaron las células encapsuladas en el gel se observó viabilidad de células injertadas con signos de diferenciación neural (positividad a nestina). En la figura 5D, la inmunofluorescencia muestra diferenciación neural de estas células (flecha) que se aprecia mediante la formación de extensiones citoplásmicas y expresión de nestina. La bisbenzamida es un marcador nuclear que permite identificar células madre marcadas con el fin de ver su viabilidad. La nestina es un marcador citoplásmico que muestra una diferenciación neural temprana.

15

En los animales en los que se injertó el gel sin células, el resultado histológico mostró la imagen típica de una zona de contusión cerebral, con macrófagos y gliosis.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de implante biodegradable y biocompatible para la regeneración de tejido neural que comprende los siguientes componentes:
- 10 a. un soporte de gel formado a partir de un fluido aislado que contiene plaquetas y un agente de activación que comprende cloruro de calcio, con o sin trombina,
  - 15 b. un factor de crecimiento neural seleccionado de entre BDNF, NGF, ácido retinoico y combinaciones de los mismos, y
  - 20 c. un cultivo de al menos 50.000 células madre progenitoras donde si las células madre proceden de embriones humanos dichas células se han obtenido sin destruir ni afectar la viabilidad de los embriones.
2. Una composición, según la reivindicación 1, en la que el agente de activación puede proporcionarse de forma separada al fluido que contiene plaquetas para la formación *in situ* del soporte de gel.
- 25 3. Una composición, según la reivindicación 1, en la que el fluido que contiene plaquetas se selecciona de entre plasma rico en plaquetas (PRP) y plasma pobre en plaquetas (PPP).
4. Una composición, según la reivindicación 3, en la que el fluido que contiene plaquetas es plasma PPP.
5. Una composición, según la reivindicación 4, que incluye adicionalmente factores celulares de las plaquetas añadidos de forma exógena.
6. Una composición, según la reivindicación 3 en la que a) es un soporte de gel formado a partir de PRP y cloruro de calcio en una cantidad comprendida entre 25-50  $\mu\text{mol/l}$ .
- 30 7. Una composición, según la reivindicación 6, en la que a) incluye adicionalmente trombina en una cantidad comprendida entre 0,01 y 5 UI/ml.
8. Una composición, según cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7, en la que b) es una combinación de BDNF, NGF y ácido retinoico.
- 35 9. Una composición, según la reivindicación 8, en la que BDNF está en una cantidad comprendida entre 50-200 ng/ml, NGF está en una cantidad comprendida entre 50-200 ng/ml y el ácido retinoico está en una cantidad comprendida 0,5-2  $\mu\text{g/ml}$ .
- 40 10. Uso de una composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, como implante.
11. Uso de una composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de lesiones del SNC.
- 45 12. Un procedimiento de preparación de una composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende:
- 50 i. el aislamiento de un fluido que contiene plaquetas,
  - ii. el aislamiento y la expansión *ex vivo* de células madre progenitoras,
  - 55 iii. la combinación de las células madre progenitoras obtenidas en ii) con el fluido que contiene plaquetas obtenido en i) y al menos un factor de crecimiento seleccionado de entre BDNF, NGF, ácido retinoico y combinaciones de los mismos,
  - 60 iv. la adición de un agente de activación que comprende cloruro de calcio, con o sin trombina, a la combinación obtenida en iii), y
  - v. la gelificación de la mezcla obtenida en iv).
- 65

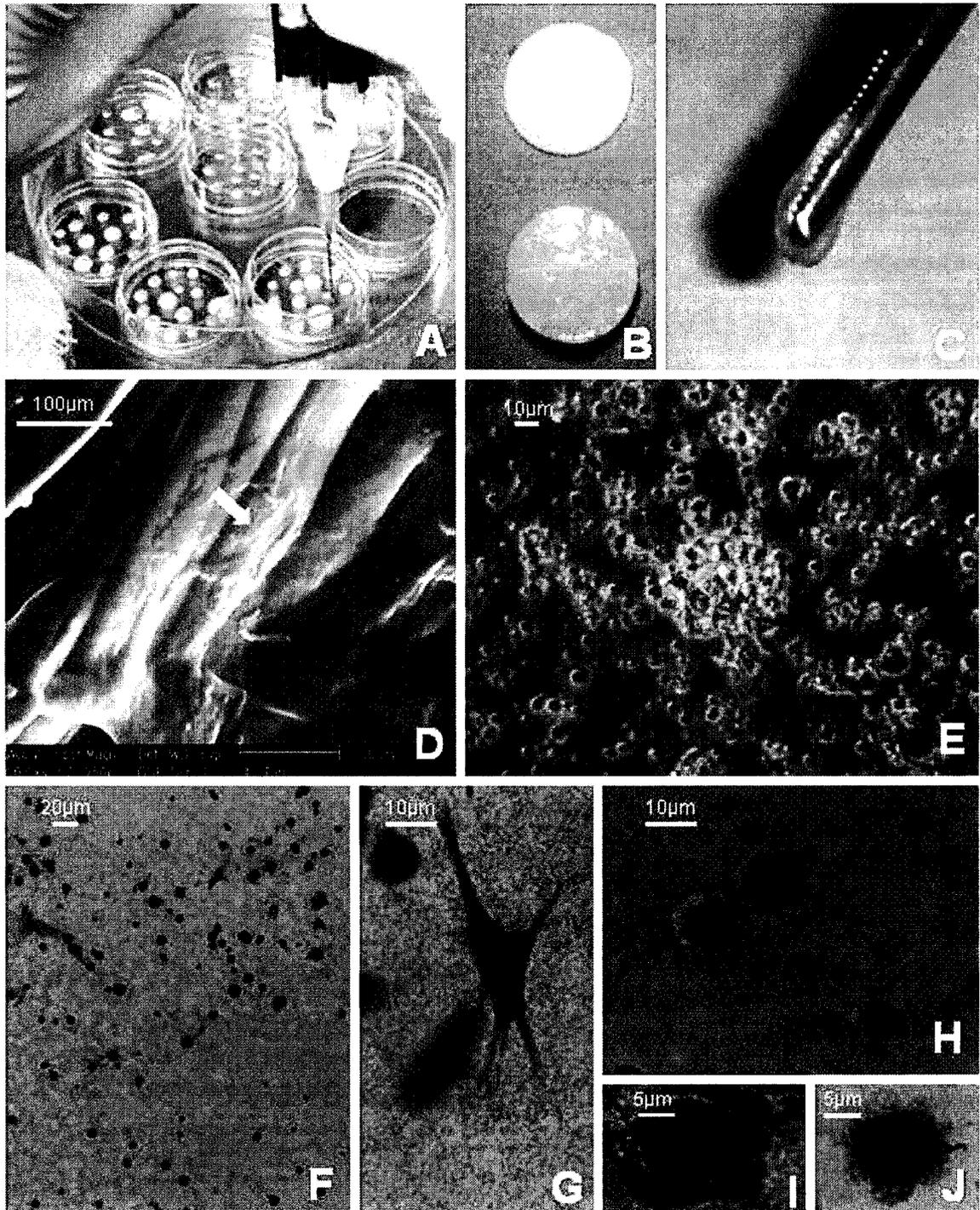


FIG.1

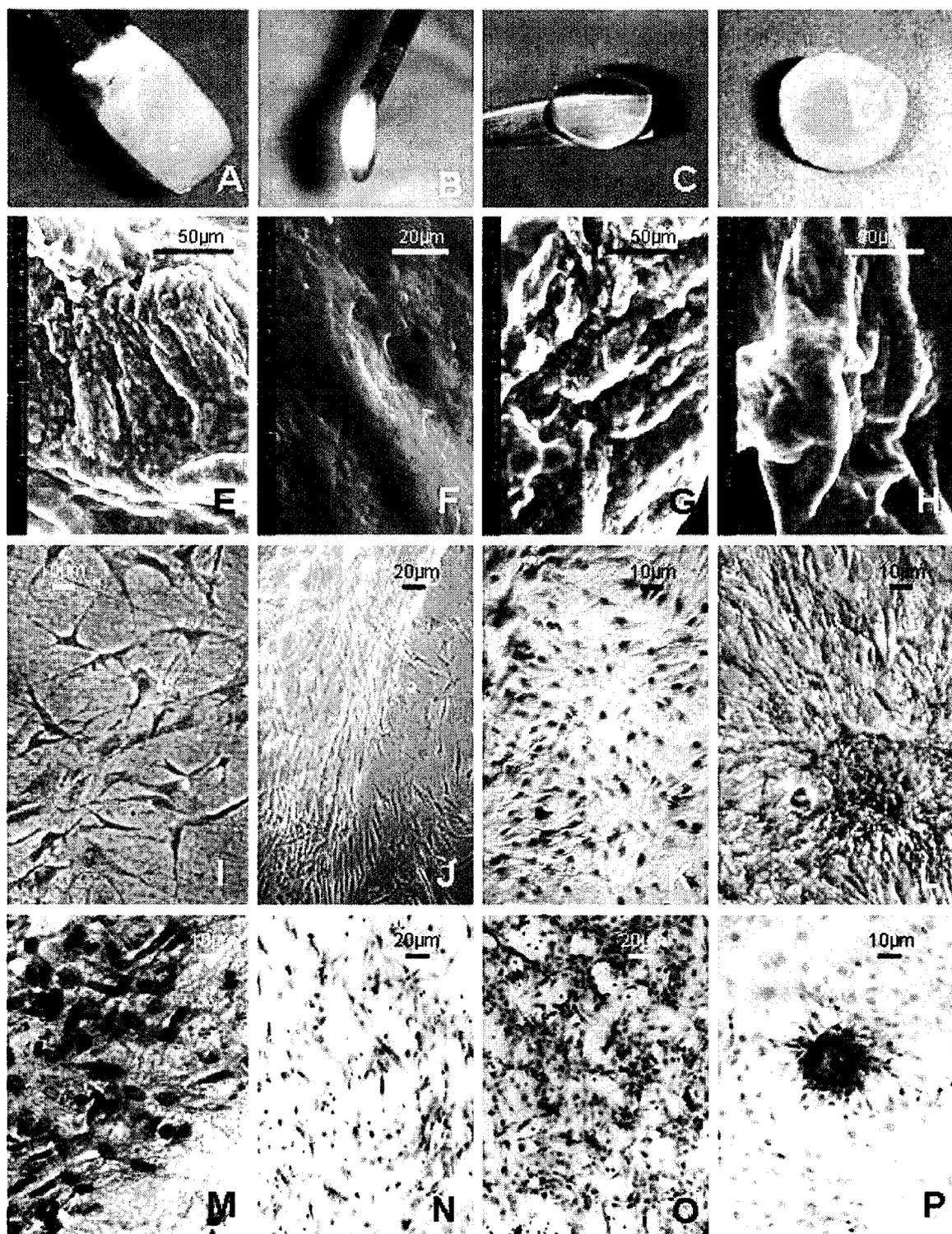


FIG. 2

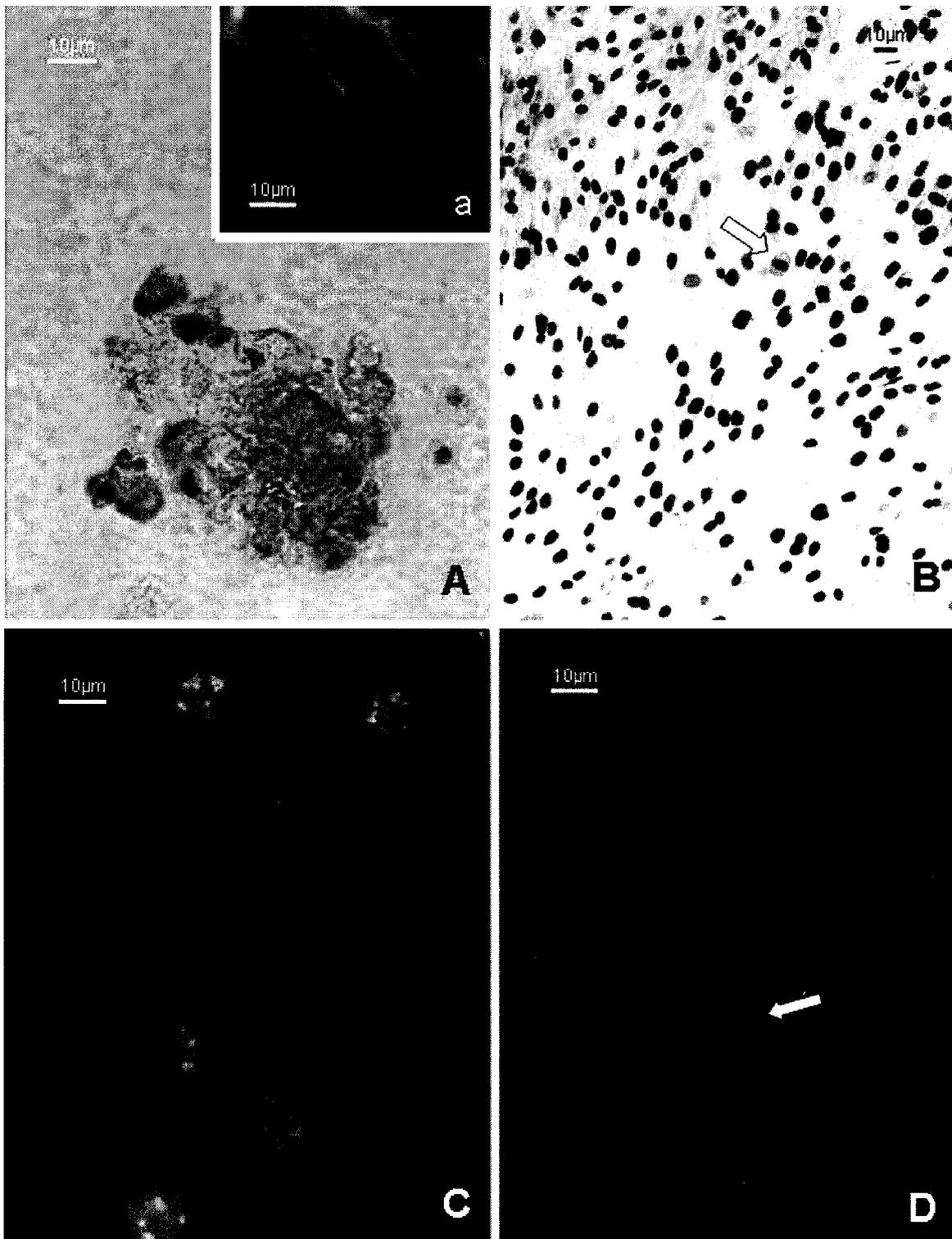


FIG. 3

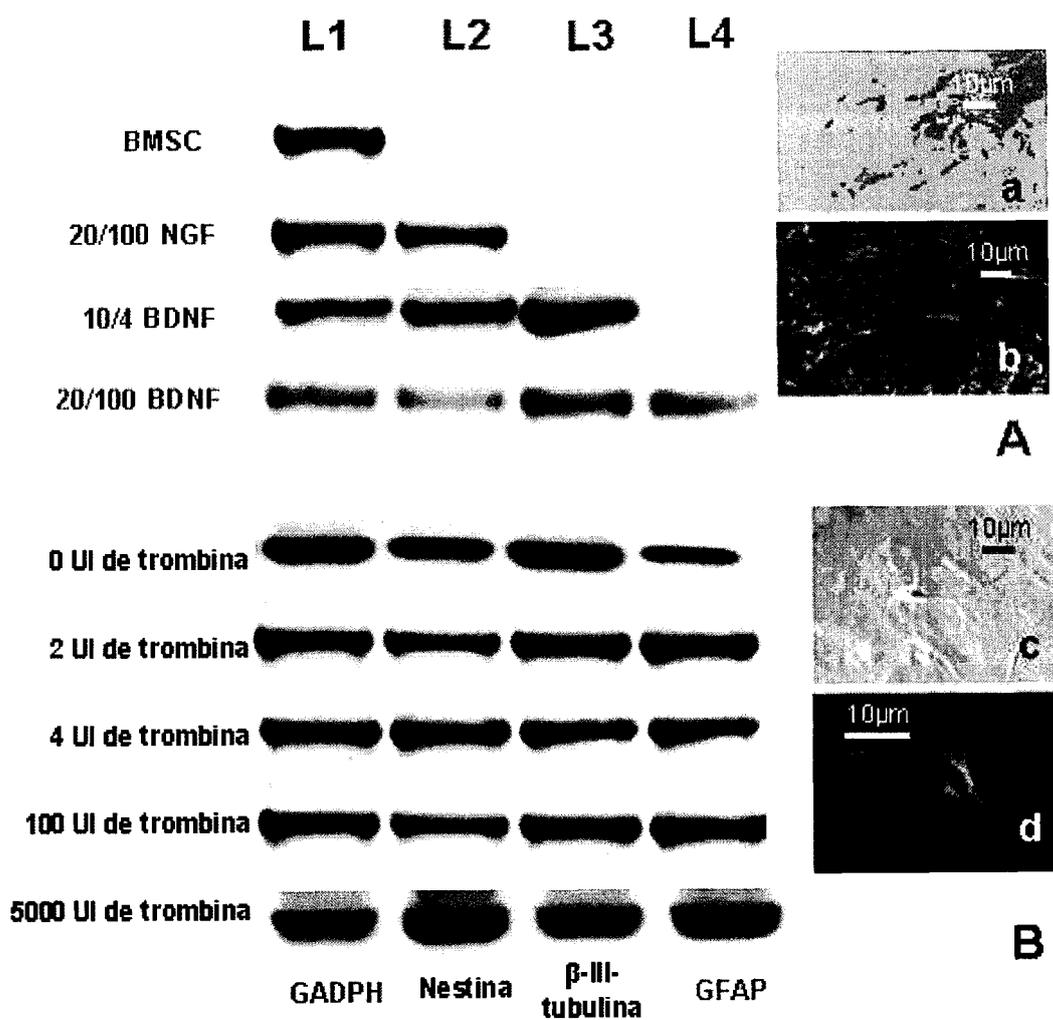


FIG. 4

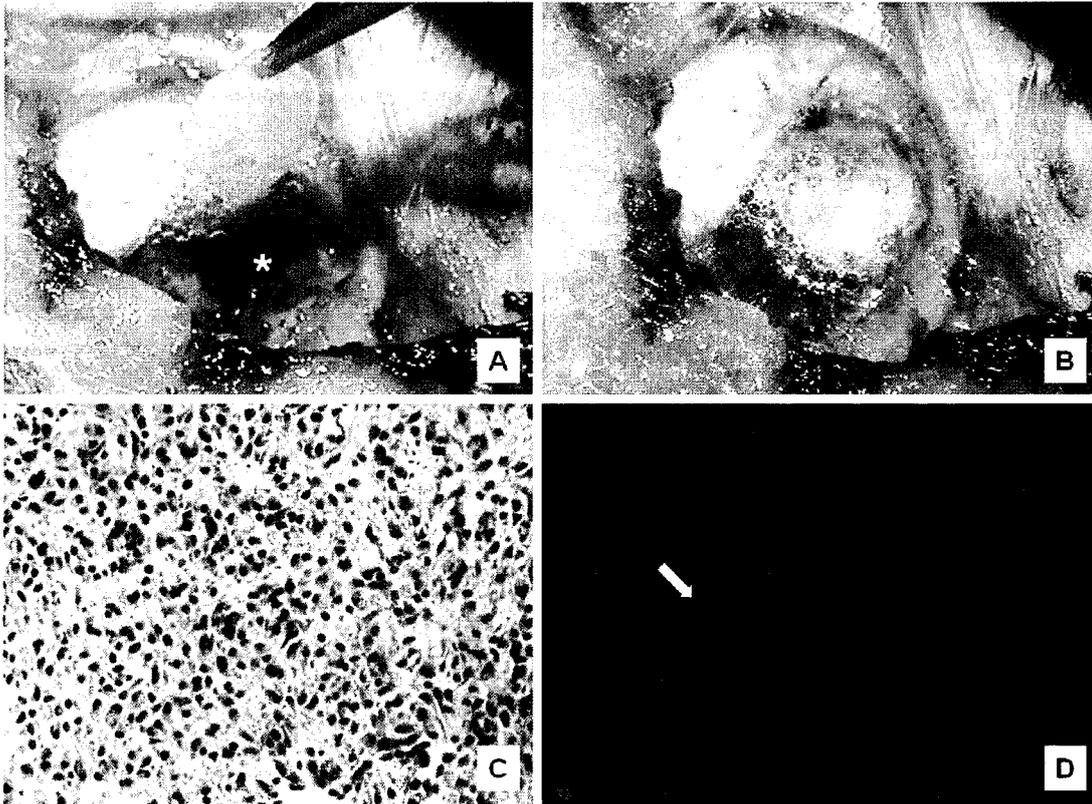


FIG. 5

# ES 2 360 153 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> FINA BIOTECH S.L.U
- 5 <120> COMPOSICIÓN DE IMPLANTE PARA LA REGENERACIÓN DE TEJIDO NEURAL, PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN Y USOS DEL MISMO
- 10 <130> 246/09
- <160> 8
- 15 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 22
- 20 <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- 25 <223> oligonucleótido
- <400> 1
- 30 caggcttctc ttggctttct gg  
22
- <210> 2
- 35 <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial
- 40 <220>
- <223> oligonucleótido
- <400> 2
- 45 tggtgaggtt gaggtttgt  
19
- 50 <210> 3
- <211> 21
- <212> DNA
- 55 <213> Artificial
- <220>
- 60 <223> oligonucleótido
- <400> 3
- 65 tgcgtgtgta caggatgaatg c  
21

ES 2 360 153 A1

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido

10

<400> 4

ggctgcatag tcatttccaa g  
21

15

<210> 5

20 <211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

25 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 5

30

gtgggcaggt gggagcttga ttct  
24

35

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

40 <213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido

45

<400> 6

ctggggcggc ctggtatgac a  
21

50

<210> 7

55 <211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

60 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 7

65

cccacggcaa gttcaacggc a  
21

# ES 2 360 153 A1

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido

10

<400> 8

15

tggcagg<sup>21</sup>ttt ctccaggcgg c

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200931029

②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.11.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **E04G21/32** (2006.01)  
**E04G5/06** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 8501042 A1 (VERDU MIRA V ) 01/02/1985, páginas 4 - 5; figuras 1 - 3.	1,3,5,6
Y		4,10
X	ES 8502754 A1 (VERDU MIRA V ) 16/04/1985, páginas 4 - 6; figuras 1 - 4.	1,3,5-7
X	US 3949834 A (NUSBAUM ARTHUR) 13/04/1976, figuras 1 - 3.	1,3,5
X	US 3552522 A (WILSON H. BOBO) 05/01/1971, figuras 1 - 4.	1-3,5,7,8
X	ES 2311310 A1 (GUINART PALLARES JOSE RAMON ) 01/02/2009, página 5, líneas 1 - 26; figuras 10 b y 11b.	1-3,5,6
Y		9
Y	DE 2802220 A1 (BAUMANN WOLFGANG) 26/07/1979, figuras.	9
Y	FR 2520034 A1 (GOUY HIPPOLYTE ) 22/07/1983, figuras 1 - 8.	4,10
A	US 1445558 A (LARSON) 13/02/1923, página 2, líneas 9 - 20; página 3, líneas 59 - 71; líneas 119 - 126; figuras.	10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
28.03.2011

Examinador  
M. Sánchez Robles

Página  
1/6



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②<sup>1</sup> N.º solicitud: 200931029

②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 20.11.2009

③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **E04G21/32** (2006.01)  
**E04G5/06** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FR 2536450 A1 (LERAY ANDRE ) 25/05/1984, figuras 1, 8,12.	1-3,6-8,10
A	ES 2290831 T3 (MACC ) 16/02/2008, figuras 8 y 9.	1-3,8

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
28.03.2011

Examinador  
M. Sánchez Robles

Página  
2/6

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

E04G

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.03.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 4,9,10	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-3, 5-8	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-10	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 8501042 A1 (VERDU MIRA V )	01.02.1985
D02	ES 8502754 A1 (VERDU MIRA V )	16.04.1985
D03	US 3949834 A (NUSBAUM ARTHUR)	13.04.1976
D04	US 3552522 A (WILSON H. BOBO)	05.01.1971
D05	ES 2311310 A1 (GUINART PALLARES JOSE RAMON )	01.02.2009
D06	DE 2802220 A1 (BAUMANN WOLFGANG)	26.07.1979
D07	FR 2520034 A1 (GOUY HIPPOLYTE )	22.07.1983
D08	US 1445558 A (LARSON)	13.02.1923
D09	FR 2536450 A1 (LERAY ANDRE )	25.05.1984
D10	ES 2290831 T3 (MACC )	16.02.2008

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El documento D01 contiene (ver figuras 1 a 3; páginas 4 y 5) como en la reivindicación 1 de la solicitud, una marquesina de protección que consta de

- unos primeros anclajes (3) fijados a la fachada del edificio,
- una pluralidad de ménsulas (2) dispuestas en serie y fijadas cada una a un primer anclaje (3) (ver línea 15 de página 4)
- unos segundos anclajes (4) fijados al edificio
- unos tensores (5) fijados por un extremos a los segundos anclajes (4) y por el otro a las citadas ménsulas (2)
- una o varias redes (1) soportadas por las ménsulas (2).

Como en la reivindicación 3 de la solicitud, las ménsulas (2) van todas a la misma altura permitiendo el paso por debajo de ellas.

Como en la quinta reivindicación las redes (1) determinan una superficie continua de protección sin interferir ni restringir los movimientos bajo ella.

Como en la reivindicación 6, los segundos anclajes (4) van fijados a la parte alta de la fachada.

El documento D02 divulga (ver figuras 1 a 4;páginas 4 a 6) como la solicitud en sus reivindicaciones 1,3,5, 6 y 7, una marquesina (2) de protección con unos primeros anclajes (7) , una pluralidad de ménsulas(2) dispuestas en serie todas a la misma altura, unos segundos anclajes (12) en una parte superior de la fachada (ver figura 1) , o en la cubierta del edificio(ver figura 3), unos tensores (17), y unas redes (16) soportadas por las ménsulas (2).

El documento D03, contiene en las figuras 1 a 3, unas ménsulas (20) dispuestas en serie y fijadas cada una a un primer anclaje (24) en la fachada, unos segundo anclajes (56) fijados al edificio, unos tensores (66) fijados a los segundos anclajes y a las ménsulas, y unas redes (10) soportadas en las ménsulas determinando una superficie continua de protección, como en las reivindicaciones 1,3 y 5 de la solicitud.

El documento D04, muestra en las figuras1 a 4, una marquesina de protección (21), con unos primeros anclajes (12) fijados a la fachada (10), una pluralidad de ménsulas (21) dispuestas en serie , perpendicularmente a la fachada del edificio (10) y fijadas a un primer anclaje (21), unos segundos anclajes (31) fijados al edificio, en concreto a la cubierta, , unos tensores (27) fijados (26) a las ménsulas (21) y a los segundos anclajes (29,31), y aunque no tiene red , tiene los tablonos (22) como superficie de protección continua, como en las reivindicaciones 1 a 3, 5, 7, 8.

El documento D05 divulga en las figuras 10b y 11b,(ver página 5, líneas 1-26) unos primeros anclajes (3c ,3b) en la fachada del edificio a los que van fijados una pluralidad de ménsulas (7,8 en fig.10b perpendicularmente a la fachada, y 7,91 en fig.11b) que tienen unos tensores (84, 95) que las fijan a unos segundos anclajes (3 a, 3b) en la parte alta de la fachada, y unas redes (9) soportadas por las ménsulas como en las reivindicaciones 1,2,3,5,6 de la solicitud. En la figura 10b, la ménsula tiene el extremo acodado (8) y aunque no aparece una articulación, como en la reivindicación 9 de la solicitud, ésta si aparece en las figuras del documento D06.

El documento D07, contiene en la figura 8 una marquesina de protección en la fachada de un edificio, con redes (17) soportadas por una serie de ménsulas (4) rigidizadas entre sí mediante unos elementos de unión (11), como en la reivindicación 4 de la solicitud. Las ménsulas (4) van fijadas al edificio por unos primeros anclajes (3) (ver figuras 1 a 7) que se estructuran en una pluralidad de brazos.

El documento D08 divulga (ver figuras 1 a 6 y pág. 2, líneas 9-20; pág.3, líneas 59-71, 119-126) un soporte (15) para andamio de protección en voladizo en una pared vertical(20) en el que los anclajes se estructuran en una pluralidad de brazos(16, 24) que parten de un núcleo central, cada brazo anclándose (17,25) espacialmente a las fachada del edificio y definiendo un alojamiento (23) para montar por simple encaje el larguero que lleva la protección.

A la vista de los anteriores documentos podemos considerar que el objeto de las reivindicaciones 1 a 3 y 5 a 8 está contenido en el estado de la técnica anterior y por tanto no es nueva (Art.6.1 LP 11/1986)

y que las características de las reivindicaciones 4, 9 y 10 serían obvias para el experto en la materia por lo que carecerían de actividad inventiva (Art.8.1 LP 11/1986)