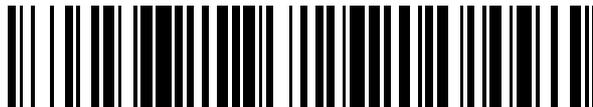


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 012**

51 Int. Cl.:
C12N 15/07 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 38/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02716089 .4**
96 Fecha de presentación: **09.01.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1464697**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.10.2004**

54 Título: **COMPOSICIÓN PARA LA CREACIÓN, REGENERACIÓN Y REPARACIÓN TISULAR MEDIANTE UN IMPLANTE BIOLÓGICO QUE PORTA CÉLULAS ENRIQUECIDO CON CONCENTRADO DE PLAQUETAS Y COMPLEMENTOS.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.12.2011

73 Titular/es:
**GORROCHATEGUI BARRUETA, ALBERTO
GENERAL EGUÍA, 1, 1
48010 BILBAO VIZCAYA, ES**

72 Inventor/es:
**Gorrochategui Barrueta, Alberto y
Simon Elizundia, Josu**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 370 012 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición para la creación, regeneración y reparación tisular mediante un implante biológico que porta células enriquecido con concentrado de plaquetas y complementos.

Objeto de la invención

5 La presente invención se refiere a una composición y procedimiento para la creación, regeneración y reparación tisular mediante un implante biológico que porta células enriquecido con concentrado de plaquetas y complementos, de entre las composiciones usadas para regeneración tisular que se derivan de diferentes cultivos celulares convencionales originados a partir de células tanto heterólogas como autólogas.

10 El medio de cultivo que nutre las diferentes líneas celulares incluye altas dosis de diversos complementos con el fin de aumentar el número de células obtenidas en el periodo más corto posible. Estos complementos son principalmente nucleósidos, hormonas, citosinas, aminoácidos y vitaminas, aunque también se incluyen sales minerales, lípidos y otros.

15 Las plaquetas añadidas al medio de cultivo en el que se añaden estas altas dosis de complementos proporcionan los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF) requeridos para optimizar el establecimiento, mantenimiento y extensión de la proliferación, de modo que el sobrenadante que resulta de su activación puede usarse tras añadir glucobionato de calcio al mismo. Adicionalmente, estas plaquetas junto con el fibrinógeno contenido en las mismas puede usarse como soporte para células derivadas de cultivos celulares anteriormente establecidos, o como constituyentes para el implante biológico, pegamento biológico y/o material de relleno.

20 En el presente documento de solicitud, la expresión "implante biológico" se refiere al concentrado de plaquetas coagulado mediante la presencia de: fibrinógeno, fibronectina, calcio del cultivo celular y calcio ionizado de las plaquetas, ATP y ADP como activadores de su actividad, enriquecido con otros diversos complementos biológicos y que sustentarán los cultivos celulares.

25 La expresión "pegamento biológico" se refiere a los primeros minutos del implante biológico y puede portar o no las líneas celulares establecidas. Una propiedad de este pegamento biológico es que favorece el proceso de cicatrización debido a los factores de crecimiento incluidos en el mismo y que pueden actuar sobre las células de la herida, induciendo la multiplicación, diferenciación o quimiotaxis celular. Las plaquetas son la única fuente de factor de crecimiento presente en este pegamento biológico.

"Material de relleno" se refiere al trombo recién formado en el medio de cultivo que posteriormente se congela y/o liofiliza y/o pulveriza con el fin de rellenar defectos osteoarticulares.

30 Antecedentes de la invención

La composición según la invención obtiene su cultivo celular del cultivo celular empleado convencionalmente en procedimientos convencionales para estos tipos de cultivos, complementados mediante altas dosis de complementos con el fin de mejorar el rendimiento de los cultivos celulares y mejorar las propiedades biológicas de este medio de cultivo.

35 Los cultivos celulares proceden de células autólogas o heterólogas. Incluyen condrocitos, fibroblastos, osteoblastos, epitelio pigmentario de la retina, hepatocitos y células de la unidad pilosebácea entre otras, así como células embrionarias.

40 Se usan factores de crecimiento de degranulación plaquetaria, entre los que están: en gránulos densos "serotonina, catecolaminas, ATP y ADP, iones calcio" y en gránulos alfa "albúmina, beta-tromboglobulina, osteonectina, osteocalcina, factor de activación de plaquetas 4, factor de crecimiento endotelial derivado de las plaquetas, factor de crecimiento epidérmico" (Hudson-Goodmafl *et al*, 1990); "factor inhibidor de alfa plasmina, fibrinógeno, proacelerina, fibronectina, péptido III de activación del tejido conjuntivo, factor beta de crecimiento transformante, factor de crecimiento de tipo insulina" (Martin *et al* 1992); "cininógeno de alta masa molecular, factor de von Willebrand, trombospondina, fosfolípido, inhibidor de C1-esterasa, factor de crecimiento de hepatocitos, factores de crecimiento derivados de las plaquetas" (Miyazono y Takaku, 1989, Miyazono y Takaku 1989), (H.L. Wong y S.M. Wahl en "Peptide Growth Factors and their Receptors" Sporn Roberts Eds., Springer-Verlag. Berlín, p. 5 10, Terkeltraub y M. H. Grinsberg en "The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair", Clark & Henson Eds., Plenum Press, Nueva York, p. 38.)

50 Los extractos de plaquetas muestran una alta actividad mitógena y tienen un efecto de cicatrización conocido. (D. M. Carter *et al*, "Growth Factors and Other Aspects in Wound Healing", Barbul. Pine, Cadwell Hunt Eds. Alan R. Liss Inc., Nueva York 1998, páginas 303 - 317, patente estadounidense 4.760.131 y solicitudes de patente PCI WO 86/03 122, WO 88/03409 y WO 89/05656.

No se añaden proteínas exógenas tales como trombina, ni inhibidores de plasmina tales como alfa 2-antiplasmina o aptrotina; la presencia de protrombina y otros factores de coagulación en el pegamento biológico de la invención

puede usarse activando la ruta de coagulación o bien extrínseca o bien intrínseca. La temperatura de funcionamiento preferida es 37°C. Además de estas proteínas coagulables, tampoco se añade fibrinógeno que como el anterior actúa como material hemostático (véase la patente FR 2 448 900 de Immuno AF für Chemisch-Medizinische Produkte).

- 5 Un antecedente remoto del estado de la técnica sería la patente WO90/07931 de Curatech, Inc., que se refiere a factores de recuperación para folículos pilosos usando factores de crecimiento de plaquetas que inducen angiogénesis de origen sanguíneo y de o bien seres humanos o bien otros mamíferos, incorporando complementos como trombina, adenosina difosfato y colágeno.

Descripción de la invención

- 10 La presente invención se refiere al medio de cultivo obtenido para el establecimiento, mantenimiento, propagación y congelación (con DMSO al 10%) usado en líneas celulares tanto humanas como animales de los ejemplos descritos en esta memoria, caracterizándose este medio de cultivo por tener altas concentraciones de complementos y factores de crecimiento del concentrado de plaquetas de un origen o bien heterólogo o bien autólogo.

A. Composición principal y procedimiento de la misma:

- 15 A.1. De la composición:

a) Medio de cultivo celular usado de manera rutinaria en procedimientos convencionales de este tipo de cultivo, complementado con un concentrado de plaquetas al 10% (la variación preferida se estima a entre el 1 y el 30%) estabilizado durante 24 horas en un horno de cultivo. A este medio se le añaden factores de crecimiento tales como: IGF-I, IGF-II, TGF- β , aunque puede añadirse cualquier otro factor de crecimiento que se demuestre que ayuda a la proliferación celular.

20 b) Al cultivo celular se le añaden los siguientes complementos, destinados a mantener las diversas líneas celulares: adenosina trifosfato (entre 1 y 10 mg/l), bicarbonato de sodio (entre 1,2 y 5 g/l), citicolina (histidina-5'-colina difosfato (entre 10 y 100 mg/l), etanolamina (entre 10 y 50 mg/l), fosfoetanolamina (entre 5 y 25 μ g/l), glucagón (entre 1 y 5 mg/l), 1-glutamina (entre 2 y 10 mM), heparina sódica (entre 10.000 y 50.000 UI/l), hidrocortisona (entre 10 y 100 mg/l), insulina humana recombinante (entre 100 y 1.000 UI/l), levotiroxina (entre 50 y 200 μ g/l), ácido linoleico (entre 10 y 50 μ g/l), ácido oleico (entre 10 y 50 μ g/l), piruvato de sodio (entre 50 y 150 mg/l), seleniato de sodio (entre 10 y 50 mg/l), toxina colérica (entre 0,1 y 1 mg/l), antibióticos (penicilina 100.000 UI/l, estreptomycin 100 μ g/l y anfotericina B 2,5 μ g/l), colina (entre 1 y 30 mg/l), ácido fólico (entre 1 y 10 mg/l), mio-inositol (entre 1 y 40 mg/l), niacinamida (entre 1 y 10 mg/l), ácido p-aminobenzoico (entre 1 y 10 mg/l), ácido D-pantoténico (entre 1 y 15 mg/l), 30 piridoxina (entre 1 y 10 mg/l), riboflavina (entre 2 y 20 mg/l), tiamina (entre 1 y 5 mg/l), vitamina B12 (entre 1 y 10 μ g/l) y aminoácidos {1-histidina (entre 1 y 20 mg/l)}, {1-isoleucina (entre 4 y 50 mg/l)}, {1-metionina (entre 1 y 25 mg/l)}, {1-fenilalanina (entre 2 y 20 mg/l)}, {1-triptófano (entre 1 y 5 mg/l)}, {1-tirosina (entre 2 y 10 mg/l)} y opcionalmente albúmina humana (entre 100 y 1.000 mg/l) y transferrina humana (entre 10 y 50 mg/l).

c) Concentrado de plaquetas.

- 35 A.2. Procedimiento

Se evaluó el medio de cultivo según la norma "Evaluación biológica de dispositivos médicos, Parte 5: Prueba de citotoxicidad: métodos *in vitro*" (ISO 10993-5: 1992). La prueba se realiza en células 3T3 A31, que es una línea celular del ratón Swiss albino (ATCC CRL 1658). El cultivo celular se realiza en frascos de cultivo en un entorno adecuado para la proliferación celular.

- 40 Las plaquetas usadas en este procedimiento se obtuvieron de la siguiente manera:

A.2.1 Con extracción mediante punción venosa del paciente:

Se usan tubos de 5 mililitros que contienen citrato de trisodio al 10% como anticoagulante. Se centrifugaron los tubos a 200 g durante 10 minutos. Se separó la sangre en sus tres componentes: plasma en la parte superior, glóbulos blancos como una línea estrecha en el medio y eritrocitos en la parte inferior. Se eliminó aproximadamente 45 el 80% del volumen de la capa de plasma, usándose el 20% restante debido a su alta concentración de plaquetas para complementar el medio de cultivo. Estas plaquetas se activan mediante la presencia de calcio en el medio de cultivo, formando un trombo que puede retirarse y que se conoce como material de relleno. Dicha activación de plaquetas es responsable de la liberación de factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF) en el medio.

- 50 A.2.2 Del banco de sangre, según el siguiente protocolo:

A.2.2.1 Preparación del concentrado de plaquetas.

Se preparan concentrados de plaquetas a partir de sangre completa usando centrifugas refrigeradas grandes. Las

elevadas fuerzas g generadas por estas máquinas separan la sangre dando plasma líquido y sus diversos componentes celulares.

5 Cuando se preparan los concentrados de plaquetas, la centrifugación se realiza a temperatura ambiental; sin embargo, para otros componentes sanguíneos se realiza a entre 1 y 6°C. Es importante equilibrar el material en lados opuestos del cabezal de centrífuga, lo que se logra fácilmente usando discos de caucho de diferentes pesos. Es conveniente colocar una bolsa de plástico alrededor del recipiente de sangre para su protección, ya que puede romperse. Los orificios y tubos conectados a la bolsa deben protegerse también frente a la rotura. La centrífuga no debe frenarse manualmente ya que esto afectará al contenido de la bolsa de sangre. Todas las instrucciones de seguridad deben seguirse estrictamente.

10 El protocolo descrito es el que se sigue lo más frecuentemente en bancos de sangre para separar productos sanguíneos. Con la centrífuga a bajas velocidades, se obtiene plasma rico en plaquetas (PRP) de la unidad de sangre en la parte superior y eritrocitos en la parte inferior. El PRP se mete en una bolsa satélite adyacente, dejando los eritrocitos en la bolsa principal.

15 Las dos bolsas conectadas se centrifugan de nuevo, esta vez a alta velocidad, de modo que se obtiene un sedimento de plaquetas agregadas a partir del PRP. Se eliminan aproximadamente 200 ml de plasma pobre en plaquetas y se dejan 50 ml con el sedimento de plaquetas.

20 Estos 200 ml de plasma pueden usarse para fabricar plasma recuperado, plasma fresco congelado (PFC) o añadirse a eritrocitos para obtener sangre completa modificada. Simultáneamente, la bolsa con el sedimento de plaquetas y los 50 ml de plasma se separa de la bolsa de eritrocitos primaria y se deja asentar durante 1 hora a temperatura ambiental, con el fin de favorecer la desagregación plaquetaria.

Las plaquetas se colocan entonces en un rotor mecánico para resuspender suavemente el sedimento de plaquetas. La mayoría de las plaquetas en la unidad de sangre completa están presentes en este concentrado de plaquetas. Con el fin de mantener las plaquetas en su estado funcional óptimo, deben agitarse constantemente a temperatura ambiente.

25 A.2.2.2 Preparación del concentrado de plaquetas a partir de múltiples donantes.

Se obtienen plaquetas de múltiples donantes a partir de sangre completa 6 u 8 horas tras su recogida (dependiendo del fabricante de la bolsa y del tipo de anticoagulante empleado) mediante centrifugación a baja velocidad, proporcionando un plasma rico en plaquetas.

30 Este plasma se transfiere a una bolsa satélite y entonces se centrifuga intensamente para formar un sedimento de agregado de plaquetas y un plasma pobre en plaquetas. El plasma se elimina con la excepción de 50 ml para formar un concentrado de plaquetas. Los restantes 200 ml de plasma pobre en plaquetas pueden añadirse posteriormente a los glóbulos rojos para obtener sangre completa modificada, o congelarse para obtener PFC, o usarse como plasma recuperado para elaboración posterior.

35 Este concentrado de plaquetas se deja asentar durante 1 hora a temperatura ambiente, permitiendo de ese modo que el sedimento de plaquetas se desintegre lentamente. Posteriormente se someten las plaquetas a un proceso de agitación suave y constante a temperatura ambiental (de 20 a 24°C) durante un periodo de conservación de hasta 5 días. Es importante garantizar que las plaquetas mantengan un pH de 6 o superior para mantener su funcionalidad y que hay una dosis mínima de $5,5 \times 10^{10}$ plaquetas en el 75% de las unidades estudiadas.

A.2.3 Preparación de suero con alta concentración de PDGF.

40 Las plaquetas obtenidas o bien mediante punción venosa del paciente o bien de un banco de sangre pueden activarse según el siguiente protocolo: por ejemplo, se recogen 9 mililitros de concentrado de plaquetas de cualquier origen y se añaden entre 1 y 2 mililitros de glucobionato de calcio (1 mililitro proporciona 4,5 mg de calcio elemental); esta disolución se lleva a 37°C proporcionando un suero rico en factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF) y un trombo que puede usarse como material de relleno. Este suero rico en PDGF puede usarse como una adición al medio de cultivo celular o como una disolución sobre defectos cutáneos, osteoarticulares u otros con el fin de acelerar los procesos de cicatrización de heridas. El suero también puede congelarse y/o liofilizarse para extender su conservación hasta el momento de su uso.

A.3 Otros complementos específicos

45 Además de la composición principal y para líneas celulares distintas de células de tipo de epitelio pigmentario de la retina, fibroblastos, hepatocitos, líneas tumorales y sus equivalentes, se definen las siguientes adiciones con algunos o todos de los siguientes complementos adicionales: biotina (entre 1 y 10 mg/l), dexametasona (entre 1 y 10 mg/l), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (entre 10 y 1.000 µg/l), teofilina (entre 1 y 100 mg/l), ácido 1-ascórbico (entre 20 y 100 mg/l), calcitonina recombinante humana (entre 100 y 10.000 UI/l), calcitriol (entre 0,1 y 10 µg/l), dexametasona (entre 1 y 10 mg/l), sales inorgánicas tales como fosfato de potasio anhidro monobásico (entre

- 100 y 500 mg/l) y fosfato de potasio anhidro dibásico (entre 1.000 y 2.500 mg/l) u otras sales equivalentes, factor inhibidor de leucemia recombinante humano (de 100 a 10.000 UI/ml), timidina (entre 5 y 10 mg/l), guanosina (entre 10 y 50 mg/l), citidina (entre 10 y 50 mg/l), uridina (entre 10 y 50 mg/l), 2-b-mercaptoetanol (entre 10 y 100 µg/l), forscolina (entre 0,1 y 10 mg/l), 2-b-mercaptoetanol (entre 10 y 100 µg/l), adenosina trifosfato (entre 1 y 10 mg/l) y factor inhibidor de leucemia recombinante humano (de 100 a 10.000 UI/ml).
- 5 B. Otras composiciones específicas y procedimientos de las mismas:
- Se incorporan estos complementos específicos tal como sigue:
- B.1 De la composición
- Para adipocitos: biotina (entre 1 y 10 mg/l), dexametasona (entre 1 y 10 mg/l).
 - 10 - Para melanocitos: factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (entre 10 y 1.000 µg/l), teofilina (entre 1 y 100 mg/l).
 - Para condrocitos y osteoblastos: ácido 1-ascórbico (entre 20 y 100 mg/l), calcitonina recombinante humana (entre 100 y 10.000 UI/l), calcitriol (entre 0,1 y 10 µg/l), dexametasona (entre 1 y 10 mg/l), sales inorgánicas tales como fosfato de potasio anhidro monobásico (entre 100 y 500 mg/l) y fosfato de potasio anhidro dibásico (entre 1.000 y 2.500 mg/l) o sales equivalentes.
 - 15 - Para células madre: factor inhibidor de leucemia recombinante humano (de 100 a 10.000 UI/ml), nucleósidos, adenosina trifosfato (entre 1 y 10 mg/l), timidina (entre 5 y 10 mg/l), guanosina (entre 10 y 50 mg/l), uridina (entre 10 y 50 mg/l), 2-b-mercaptoetanol (entre 10 y 100 µg/l), forscolina (entre 0,1 y 10 mg/l).
- B.2 Cultivo y mantenimiento de estas líneas celulares.
- 20 Se preparó el medio de cultivo con los componentes indicados anteriormente. Se usaron antibióticos en disolución con las siguientes dosis finales: penicilina, 100.000 UI/l, estreptomycin 100 µg/l y anfotericina B 2,5 µg/l. Se ajustó el pH a 7,40 y la osmolaridad para células humanas del cultivo era de 290 mOsm/kg, que se supone que es ideal para el mantenimiento *in vitro*, mientras que para otras especies tales como ratones la osmolaridad de los cultivos iniciales era de 310 mOsm/kg.
 - 25 Se mantuvieron las células en frascos de cultivo de 25 cm² o 75 cm² en un medio de cultivo rutinario con todos los complementos y productos de degranulación plaquetaria, en un horno a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂.
- Cuando las células contenidas en un frasco de cultivo se adhieren a su superficie, formando una monocapa (fase de crecimiento exponencial), se obtienen las células mediante el siguiente proceso:
- decantación del medio de cultivo en el frasco;
 - 30 - lavado con una solución salina tamponada con fosfato (pH 7,3 a 4°C) y posterior decantación;
 - adición de EDTA-PBS (entre 1 y 10 mM) y agitación vigorosa, con el fin de liberar las células adheridas a la parte inferior del frasco;
 - adición de 3 ml de solución salina tamponada con fosfato para alcanzar una cantidad final total de 10 ml y resuspensión. Después de eso, centrifugación (Minifuge T Heraeus Christ) en un tubo cónico de 50 ml a 200 g durante 5 minutos a 37°C;
 - 35 - decantación del sobrenadante mientras que el sedimento se resuspende en un volumen conocido de PBS, procediendo a realizar un estudio de viabilidad celular usando el método de exclusión con azul trípano al 0,1% en una máquina de recuento de corpúsculos tipo Burkner. Si el número de células viables es superior al 95%, se resuspenden de nuevo en el volumen requerido para obtener la concentración celular correcta. La concentración celular usada en este trabajo era de 5×10^5 células en 0,1 ml de PBS.
 - 40
- Todas las etapas anteriores se realizaron en condiciones estrictamente estériles obtenidas con cabinas de flujo laminar estéril Gelaire BSB4.
- Con el fin de detectar la posible contaminación por micoplasmas, se sometieron periódicamente los cultivos a una prueba de detección de micoplasmas por fluorescencia según el siguiente protocolo:
- 45 Se fijaron células mantenidas en el cultivo en metanol - ácido acético (3:1) y se sumergieron en una disolución tampón Hoechst 33258 (bisbencimidazol) preparada a partir de una disolución madre estéril que consistía en 100 ml de PBS y 15 mg de Hoechst 33258, con dilución posterior hasta 1:500 en PBS durante 30 min. en la oscuridad y a temperatura ambiental. Se observaron las células en un microscopio de fluorescencia; en el caso de contaminación por micoplasmas estos se observan como pequeños cuerpos fluorescentes en el espacio extranuclear e intercelular.

B.3 Mantenimiento de las líneas celulares a bajas temperaturas.

Se obtuvo el mantenimiento a largo plazo de una reserva de células congelando células de cultivo en nitrógeno líquido. El método seguido para esta congelación fue el siguiente:

5 Cuando las células de cultivo comienzan su fase de crecimiento exponencial, se calcula la viabilidad celular mediante tinción con azul tripano. Si es superior al 95%, se resuspenden en una disolución del medio de cultivo completo y DMSO (dimetilsulfóxido) al 10%.

10 Se ajusta la concentración a 2×10^6 células/ml. Se introduce esta suspensión en ampollas de congelación y se sumergen en nitrógeno líquido. Después de eso, se almacenan en una cámara de congelación a -180°C . Se descongelan las células calentando las ampollas en un baño a 37°C con una centrifugación posterior con el fin de eliminar el DMSO. Se resuspende el sedimento en medio de cultivo completo y se siembra en un frasco de cultivo, y de esta manera se introduce en un horno de incubación a 37°C .

B.4 Mantenimiento de las células madre

15 Tras seleccionar las células madre obtenidas de un embrión, feto o adulto mediante un proceso enzimático, cultivo celular tisular u ovocitos, el mantenimiento de estas células madre en el medio de cultivo se condiciona o no por células STO, STO SNL 76/7 o VERO durante 48 horas, y hasta el 40% de este medio condicionado se usa para cultivos celulares. Se conoce el uso ocasional de células STO SNL 76/7 (McMahon y Bradley, 1990) o células VERO en forma de monocapas mitóticamente inactivadas (Evans y Kauffman, 1981) usadas de manera rutinaria en procedimientos convencionales para este tipo de cultivos (Nagy *et al.*, 1993). Estas monocapas pueden secretar sustancias embriotróficas tales como TGF-a (factor de crecimiento transformante a), TGF-b (factor de crecimiento transformante b), PDGF-a (factor a de crecimiento derivado de las plaquetas) y IGF-I y II (factores de crecimiento de tipo insulina), y por tanto soportan tanto el desarrollo embrionario como el mantenimiento de células madre. También es posible proporcionar LIF (factor inhibidor de leucemia) recombinante humano en una dosis de entre por ejemplo 100 y 10.000 unidades/ml (Kitamura *et al.*, 1989) para mantener el fenotipo pluripotente de células madre. Con el fin de obtener niveles que permitan la formación de nichos de células madre que permanecen indiferenciadas (Rathjen *et al.*, 1990) este factor puede por sí mismo mantener y servir para aislar células madre (Ernst *et al.*, 1994; Nagy *et al.*, 1993). Las células madre de la unidad pilosebácea mantenidas *in vitro* presentan una actividad fosfatasa alcalina directamente demostrable como en blastocitos (Johnson *et al.*, 1977). Esta propiedad permite el uso de marcaje histoquímico para detectar células madre, así como expresar el estado indiferenciado de estas células (Piquet-Pellorce *et al.*, 1994; WO90/08188; PCT AU 89/00330) mediante marcaje positivo para fosfatasa alcalina de los cuerpos embrioides y las células madre.

Las células empleadas pueden ser células pluripotentes o totipotentes de diversos orígenes, tales como la médula ósea, pero también pueden usarse células embrionarias o células diferenciadas del mismo paciente. Estas últimas y las obtenidas de la médula ósea tienen un origen autólogo y por tanto no generan una respuesta autoinmunitaria.

35 Para este fin, las células se aíslan mediante un proceso enzimático con tripsina y/o dispasa/colagenasa dependiendo del tipo celular. Las líneas celulares se llevan a un frasco con 25 cm^2 de área de superficie y se preparan los subcultivos observando la presencia de cuerpos embrioides o la desaparición de células de la monocapa, manteniéndolos en el horno de cultivo y sometidos a pases de rutina cada 48 horas. Después de eso, pueden introducirse en el pegamento biológico que posteriormente se convertirá en el implante biológico.

40 Dicho implante biológico puede dejarse en el horno durante más de 90 días, siendo sus células viables y permitiendo un nuevo pase celular siempre que las condiciones de cultivo para cada línea celular se mantengan.

45 Las células usadas tanto en el pegamento biológico como en los implantes biológicos se obtienen por ejemplo de la siguiente manera: se tripsiniza la línea celular, se inactiva la tripsina mediante un inactivador y se centrifuga a 200 g. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 1 ml de medio de cultivo. Se prepara una alícuota que contiene 10×10^6 células para un volumen final de 10 ml, considerando que 1 ml es el concentrado de plaquetas. Todo el procedimiento se realiza a 37°C .

Si se usa como pegamento biológico, presenta una excelente adhesión a tejidos o materiales protésicos; si se desea un implante biológico se lleva al horno, en el que se obtienen dos variantes: tras la retracción de los 10 ml del pegamento biológico en un tubo de ensayo con una luz interna de 10 mm, tras 24 horas se presenta un cilindro de $10 \times 1 \text{ mm}$, en un experimento realizado tres veces.

50 Si esto se usa en frascos de cultivo o se multiplica a partir de un cultivo en 6 pocillos, no se produce retracción de modo que esto demuestra ser el medio ideal en el que lograr una lámina.

55 Se obtienen parches compuestos por fibroblastos y queratinocitos superpuestos sobre aquéllos que se asemejan a la dermoepidermis. La isoleucina es el aminoácido requerido para mantener el crecimiento de queratinocitos, aunque un aumento en los otros aminoácidos tiene efectos positivos sobre el potencial de proliferación de las diferentes líneas celulares.

En el caso de osteoblastos, se producen capas variables en las que puede inducirse la calcificación en grado variable, con el fin de cubrir o rellenar defectos óseos. La malla extracelular producida por los osteoblastos en cultivos realizados *in vitro* presenta un grado variable de mineralización, de modo que permite su introducción en un defecto osteoarticular con las mismas células (autoinjerto) o tras eliminar éstas (aloinjerto).

- 5 Como pegamento biológico, puede usarse en casos de desprendimiento de retina, incluso portando células epiteliales pigmentarias de dicha retina.

Los factores plaquetarios liberados tanto en el medio de cultivo como en el interior del implante o pegamento biológico logran un aumento de la proliferación celular y estimulan el crecimiento, mientras que previenen simultáneamente la degradación del producto que se adhiere a las superficies expuestas.

- 10 El uso de inhibidores de proteasa tales como ácido epsilonaminocaproico (200 - 400 µg/ml de gel) y ácido tranexámico (200 - 400 µg/ml de gel) no se consideró necesario, y se descartó la adición de otros tipos de proteasa (yema de huevo de pollo, de Sigma Co. tipo III).

C. Uso de bioimplantes.

Pueden usarse bioimplantes de las siguientes maneras:

- 15 a) El pegamento biológico recién preparado puede servir como material para adhesión directa en el sitio de la herida, tal como en casos de desprendimiento de retina con células que proceden directamente de los cultivos o con aquellas conservadas en nitrógeno líquido. Con este pegamento, es posible rellenar el defecto osteoarticular, o al menos puede usarse como material de relleno para una gran extensión de dicho defecto.

- 20 b) Cuando el implante biológico va a aplicarse a la herida o defecto, puede empaparse en el pegamento biológico y comprimirse posteriormente el implante en el sitio de la herida. En el plazo de 48 horas, se observa proliferación celular y tras 3 semanas pueden observarse nódulos de calcificación si las células son osteoblastos.

- 25 Como pegamento biológico, dada la velocidad con la que se produce el trombo, los condrocitos se adhieren a las superficies dañadas, tal como lo hacen otros tipos celulares tales como fibroblastos implantados en la región dérmica o hipodérmica o células del epitelio pigmentario en la retina. Este último caso merece especial atención, ya que el volumen final del pegamento biológico cuando se forma el trombo es casi insignificante (1 mm³ por mililitro en promedio) y en vista del poder regenerativo de estas células (debido a su naturaleza pluripotente). El campo de regeneración de la retina estaría abierto en casos tales como retinitis pigmentaria y desprendimiento de retina.

Una de las principales ventajas de este procedimiento es la ausencia de una adición de proteínas exógenas, la ausencia de suero animal, lo que reduce los riesgos de contaminación accidental.

- 30 c) Como material de relleno, es obvio que el producto congelado, desecado y/o liofilizado tiene una durabilidad de más de tres años. Tanto los productos desecados como el implante deben irrigarse con el pegamento biológico, y tal disolución debe aplicarse sobre la herida que va a tratarse.

El procedimiento de la invención es por tanto muy adecuado para la necesidad actual de usar productos autólogos.

- 35 Estos productos: medio de cultivo, pegamento biológico, implante biológico y material de relleno pueden usarse en el tratamiento de heridas traumáticas o quirúrgicas, en implantes óseos o reconstrucciones osteoarticulares, en el mantenimiento de injertos (piel y hueso, entre otros) y en el mantenimiento *in vitro* a largo plazo de implantes biológicos. El mismo pegamento biológico puede usarse para fijar piezas protésicas incluyendo prótesis óseas, piezas de osteosíntesis y prótesis dentales, y para fijar y proporcionar cohesión a materiales de relleno óseo tales como carbonato de calcio, hidroxiapatita o polímeros biodegradables tales como poli(ácido láctico).

- 40 Con respecto a la industrialización del producto, la composición básica para añadir al cultivo celular específico se realiza en un único complejo de complementos, preparado previamente con el fin de facilitar y acelerar las operaciones descritas en la presente memoria, así como para su uso directo con líneas celulares que no requieren complementos adicionales, dejando para cada caso específico la incorporación de los dos complementos opcionales: albúmina humana y transferrina.

- 45 Lo mismo es cierto para los complementos adicionales destinados para líneas celulares que requieren su adición: para cada línea celular específica la mezcla correspondiente al grupo correcto de complementos está previamente disponible, para el mismo fin de facilitar las operaciones específicas.

Realización preferida de la invención

Composición básica.

- 50 Incorpora los siguientes complementos biológicos: adenosina trifosfato (1 mg/l), aminoácidos (1-histidina 2 mg/l; 1-isoleucina 4 mg/l; 1-metionina 1 mg/l; 1-fenilalanina 2 mg/l; 1-triptófano 1 mg/l; 1-tirosina 2 mg/l), antibióticos

5 (penicilina 100.000 UI/l, estreptomina 100 µg/l y anfotericina B 2,5 µg/l), bicarbonato de sodio (1,2 g/l), citicolina (colina histidina-5'-difosfato, 10 mg/l), etanolamina 10 mg/l, fosfoetanolamina 5 mg/l, glucagón 1 mg/l, ácido linoleico 10 µg/l, ácido oleico 10 µg/l, 1-glutamina 2 mM, heparina sódica 10.000 UI/l, hidrocortisona 10 mg/l, insulina humana recombinante 100 UI/l, levotiroxina 50 mg/l, piruvato de sodio 50 mg/l, ácido selenioso 10 µg/l, toxina colérica 0,1 mg/l y vitaminas (d-biotina 1 mg/l, colina 1 mg/l, ácido fólico 1 mg/l, mio-inositol 1 mg/l, niacinamida 1 mg/l, ácido p-aminobenzoico 1 mg/l, ácido D-pantoténico 1 mg/l, piridoxina 1 mg/l, riboflavina 2 mg/l, tiamina 1 mg/l, vitamina B12 1 µg/l).

Otros complementos específicos.

10 En ciertos casos, además de la albúmina humana 100 mg/l y transferrina 10 mg/l opcionales, se añaden los siguientes complementos: calcitonina recombinante humana (1.000 UI/l), factor inhibidor de leucemia humano recombinante (1.000 UI/ml), vitaminas (D-biotina 1 mg/l, dexametasona 1 mg/l), factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF) (10 µg/l), teofilina (1 mg/l), ácido 1-ascórbico (20 mg/l), calcitriol (0,5 µg/l), sales inorgánicas tales como fosfato de potasio anhidro monobásico (200 mg/l) y fosfato de potasio anhidro dibásico (1.100 mg/l) u otras sales equivalentes, forskolina (0,1 mg/l), nucleósidos; adenosina 10 mg/l, timidina 5 mg/l, guanosina 10 mg/l, citidina 10 mg/l, uridina 10 mg/l, 2-b-mercaptoetanol 10 µg/l.

15 En lo que se refiere a los ejemplos mostrados a continuación, éstos pretenden ilustrar adicionalmente el modelo y representan la realización preferida. Estos ejemplos se prepararon y sometieron a prueba tal como sigue:

Ejemplo 1. Creación de un sustituto dermocutáneo con la capacidad para desarrollar folículos pilosos.

20 Las líneas celulares se obtienen a partir de un punzón de piel de diámetro variable o a partir de la unidad de folículo o la unidad sebácea pilosa. Se cortan en tres partes, dependiendo de sus anchuras, y a partir de la epidermis se obtienen queratinocitos y melanocitos, a partir de la dermis los fibroblastos y a partir de la hipodermis los adipocitos que se mantienen con los siguientes complementos: vitaminas (D-biotina 1 mg/l, dexametasona 1 mg/l), se cultiva cada grupo por separado. El medio de cultivo usado en este ejemplo corresponde en esencia al usado para las células madre.

25 Después de eso, se obtienen los adipocitos mediante procesamiento enzimático con dispasa/colagenasa. Se resuspenden 10×10^6 de éstos en 5 ml de cultivo nuevo con un concentrado de plaquetas al 10%, añadiendo los complementos específicos; se siembra en un frasco de 75 cm² y se deja coagular en un horno durante 1 hora. Se extraen los fibroblastos de la misma manera, y finalmente los queratinocitos que se han cultivado en su medio específico, es decir: factor de inhibición de leucemia humana recombinante, 1.000 UI/ml, forskolina 0,1 mg/l para mantener la especificidad de las células madre cutáneas, con el mismo procedimiento; se hacen entonces cambios con el medio enriquecido durante 15 días con el fin de aumentar el grosor de la capa de queratinocitos.

30 De esta manera, se obtiene un sustituto cutáneo tras un proceso de queratinización mediante exposición a aire que puede usarse en la práctica clínica diaria.

Ejemplo 2. Implante biológico que contiene osteoblastos.

35 La línea celular se obtiene del hueso trabecular o de una cresta ósea o punción ósea. Se lavó bien para eliminar los restos de médula ósea o periostio. Se obtienen las células de la misma manera que en el ejemplo 1, observando las propiedades de crecimiento particulares de esta línea celular y resuspendiendo en 10 ml finales del medio de cultivo y concentrado de plaquetas al 10%, así como los siguientes complementos específicos: ácido 1-ascórbico (20 mg/l), calcitriol (0,5 µg/l), calcitonina humana recombinante (1.000 UI/l), sales inorgánicas tales como fosfato de potasio anhidro monobásico (200 mg/l) y fosfato de potasio anhidro dibásico (1.100 mg/l) u otras sales equivalentes. Se llevan a un horno para producir la retracción del trombo plaquetario en un tubo de 10 cm por 1 cm de diámetro interno, dejando un cilindro de 10 mm de longitud y 1 mm de diámetro.

Ejemplo 3. Pegamento y/o implante biológico que contiene condrocitos.

Obtención del cultivo de condrocitos a partir del cartílago articular mediante procesamiento con dispasa/colagenasa.

45 Mantenimiento de la línea celular con los siguientes complementos específicos: ácido 1-ascórbico (20 mg/l), calcitriol (0,5 µg/l), sales inorgánicas tales como fosfato de potasio anhidro monobásico (200 mg/l) y fosfato de potasio anhidro dibásico (1.100 mg/l) u otras sales equivalentes y recuperación posterior con procesamiento enzimático similar. Se resuspenden 10×10^6 células/ml de medio de cultivo como en los casos anteriores. Se llega al cartílago dañado mediante cirugía artroscópica, se prepara el lecho para la intervención y se rellena el defecto en el momento cuando se prepara la suspensión celular y el pegamento biológico. Coagula rápidamente.

Ejemplo 4. Pegamento biológico para reparar el desprendimiento de retina y/o regeneración en el caso de retinitis pigmentaria.

Se cultivan células del epitelio pigmentario de la retina, con una capacidad demostrada de regeneración de la retina.

El medio de cultivo usado es el medio convencional. Se resuspende como en el ejemplo 3 y se rellena la zona desprendida. Debe remarcarse que este medio ocupa finalmente 1 milímetro cúbico en los experimentos realizados en el laboratorio.

5 Estos procedimientos, realizados en la mesa de operaciones, muestran la ventaja de proporcionar grandes cantidades de factor de crecimiento de plaquetas en la zona dañada ya que las plaquetas se activan tras ponerse en contacto con el medio de cultivo.

Procedimiento general.

10 El desarrollo del medio de cultivo se complementa mediante factor de crecimiento obtenido del concentrado de plaquetas, de origen o bien autólogo o bien heterólogo. Puede tener de manera rutinaria una concentración del 1%. Se añaden otros factores de crecimiento (IGF-I, IGF-II y TGF- β , entre otros) y complementos dependiendo del tipo celular que va a mantenerse *in vitro*. El mantenimiento de las células madre requiere factor inhibidor de leucemia humano recombinante.

15 El implante biológico se obtiene a partir de la activación del concentrado de plaquetas, su coagulación y retracción inducida mediante el calcio presente en el medio de cultivo celular. El pegamento biológico se forma en los primeros minutos de activación plaquetaria y se usa como relleno en cualquier tipo de heridas. El material de relleno se obtiene del trombo creado por la retracción plaquetaria, con el fin de rellenar defectos osteoarticulares.

Procedimiento específico 1

20 La unidad pilosebácea está destinada al mantenimiento de rutina en el cultivo de células madre, entre las células generalmente obtenidas, de 12 unidades pilosebáceas para un frasco de cultivo con 25 cm² de área de superficie, se preparan subcultivos cuando se alcanza la subconfluencia celular y se usa el medio de cultivo específico cada vez. Si éste último no se usa, las células perderán capacidades y se desarrollará una piel que puede usarse como sustituto de piel.

Procedimiento específico 2.

25 Se obtienen osteoblastos a partir de un cultivo celular. Se limpian defectos osteoarticulares de cualquier etiología conocida y se dotan de una forma geométrica (cilíndrica, cúbica u otra) según el material de implante que va a usarse. Estos implantes biológicos incorporan los osteoblastos de cultivo; pueden adherirse mucho mejor mediante el uso del pegamento biológico preparado inmediatamente antes. El relleno puede realizarse con el material congelado, liofilizado o pulverizado. Pueden rellenarse defectos osteoarticulares pequeños con pegamento biológico preparado inmediatamente antes que contiene o no las líneas celulares anteriormente establecidas. En cualquier caso, el pegamento biológico puede contener o no células en el momento de aplicación. Puede sumergirse y/o empaparse cualquier tipo de implante y/o vendaje en el pegamento biológico así como en el lugar de implantación o que va a cubrirse.

Procedimiento específico 3.

35 En el caso de desprendimiento de la retina o retinitis pigmentaria, se cultiva la línea celular preferida, tal como epitelio pigmentario de la retina. Se obtienen células de cultivo, se resuspenden y se añade el concentrado de plaquetas para formar el pegamento biológico con el que se rellenan los defectos de la retina.

Procedimiento específico 4.

40 En desgarros osteotendinosos, el pegamento biológico puede introducirse directamente con o sin células, mientras que para defectos grandes pueden usarse implantes que sustituyen al hueso con la forma apropiada, recubriéndolo con pegamento biológico o con el material pulverizado.

Procedimiento específico 5.

45 En el caso de melanocitos, el procedimiento comienza con el procesamiento enzimático con tripsina de 12 unidades pilosebáceas, obteniendo células de la unión dermoepidérmica, que consisten principalmente en melanocitos entre otras células, y estas células se incorporan en un frasco de 25 cm² de área de superficie realizándose los subcultivos cuando se logra la subconfluencia celular, usando siempre el medio de cultivo específico para impedir que las células pierdan capacidades y desarrollándose hasta el momento de su introducción en las zonas dañadas.

Las diversas alternativas y modificaciones propuestas deben someterse a las formas y variaciones abarcadas en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Composición para el establecimiento, mantenimiento, propagación y congelación de líneas celulares que comprende:
- concentrado de plaquetas entre el 1 y el 30%,
 - factores de crecimiento tales como IGF-1, IGF-11, TGF-b y,
 - los siguientes complementos:
 - adenosina trifosfato entre 1 y 10 mg/l,
 - bicarbonato de sodio entre 1,2 y 5 g/l,
 - citicolina entre 10 y 100 mg/l,
 - etanolamina entre 10 y 50 mg/l,
 - fosfoetanolamina entre 5 y 25 µg/l,
 - glucagón entre 1 y 5 mg/l,
 - l-glutamina entre 2 y 10 mM,
 - heparina sódica entre 10.000 y 50.000 UI/l,
 - hidrocortisona entre 10 y 100 mg/l,
 - insulina humana recombinante entre 100 y 1.000 UI/l,
 - levotiroxina entre 50 y 200 µg/l,
 - ácido linoleico entre 10 y 50 µg/l,
 - ácido oleico entre 10 y 50 µg/l,
 - piruvato de sodio entre 50 y 150 mg/l,
 - seleniato de sodio entre 10 y 50 mg/l,
 - toxina colérica entre 0,1 y 1 mg/l,
 - antibióticos,
 - colina entre 1 y 30 mg/l,
 - ácido fólico entre 1 y 10 mg/l,
 - mio-inositol entre 1 y 40 mg/l,
 - niacinamida entre 1 y 10 mg/l,
 - ácido p-aminobenzoico entre 1 y 10 mg/l,
 - ácido D-pantoténico entre 1 y 15 mg/l,
 - piridoxina entre 1 y 10 mg/l,
 - riboflavina entre 2 y 20 mg/l,
 - tiamina entre 1 y 5 mg/l,
 - vitamina B12 entre 1 y 10 µg/l, y
 - aminoácidos.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que los antibióticos se seleccionan del grupo que consiste en:
- penicilina en una concentración de 100.000 UI/l,

- estreptomicina en una concentración de 100 µg/l, y
 - anfotericina B en una concentración de 2,5 µg/l.
3. Composición según la reivindicación 1, en la que los aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste en:
- 5
- 1-histidina entre 1 y 20 mg/l,
 - 1-isoleucina entre 4 y 50 mg/l,
 - 1-metionina entre 1 y 25 mg/l,
 - 1-fenilalanina entre 2 y 20 mg/l,
 - 1-triptófano entre 1 y 5 mg/l y
- 10
- 1-tirosina entre 2 y 10 mg/l.
4. Composición según la reivindicación 1, que comprende además albúmina humana presente en una concentración de desde 100 hasta 1.000 mg/l y transferrina humana presente en una concentración de desde 10 hasta 50 mg/l.
5. Composición según la reivindicación 1, en la que las líneas celulares son líneas celulares tanto humanas como animales.
- 15
6. Composición según la reivindicación 1, en la que las células se seleccionan del grupo que consiste en fibroblastos, hepatocitos, células epiteliales pigmentarias de la retina y células de líneas tumorales.
7. Composición según la reivindicación 1, siendo la composición un medio de cultivo celular especializado adaptado para el cultivo de adipocitos y que comprende además:
- 20
- biotina en una concentración de desde 1 hasta 10 mg/l, y
 - dexametasona en una concentración de desde 1 hasta 10 mg/l.
8. Composición según la reivindicación 1, siendo la composición un medio de cultivo celular especializado adaptado para el cultivo de melanocitos y que comprende además:
- 25
- factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) en una concentración de desde 10 hasta 1.000 µg/l, y
 - teofilina en una concentración de desde 1 hasta 100 mg/l.
9. Composición según la reivindicación 1, siendo la composición un medio de cultivo celular especializado adaptado para el cultivo de condrocitos y osteoblastos y que comprende además:
- 30
- ácido 1-ascórbico en una concentración de desde 20 hasta 100 mg/l,
 - calcitonina recombinante humana en una concentración de desde 100 hasta 10.000 UI/l,
 - calcitriol en una concentración de desde 0,1 hasta 10 µg/l,
 - dexametasona en una concentración de desde 1 hasta 10 mg/l y
 - sales inorgánicas.
- 35
10. Composición según la reivindicación 9, en la que las sales inorgánicas se seleccionan del grupo que consiste en fosfato de potasio anhidro monobásico en una concentración de desde 100 hasta 500 mg/l y fosfato de potasio anhidro dibásico en una concentración de desde 1.000 hasta 2.500 mg/l.
11. Composición según la reivindicación 1, siendo la composición un medio de cultivo celular especializado adaptado para el cultivo de células madre y que comprende además:
- 40
- factor inhibidor de leucemia recombinante humano en una concentración de desde 100 hasta 10.000 UI/l,
 - nucleósidos,
 - adenosina trifosfato en una concentración de desde 1 hasta 10 mg/l,

- timidina en una concentración de desde 5 hasta 10 mg/l,
- guanosina en una concentración de desde 10 hasta 50 mg/l,
- uridina en una concentración de desde 10 hasta 50 mg/l,
- 2-b-mercaptoetanol en una concentración de desde 10 hasta 100 µg/l, y
- forscolina en una concentración de desde 0,1 hasta 10 mg/l.

5

12. Composición según la reivindicación 1 que comprende además DMSO (dimetilsulfóxido) al 10% con el fin de conservar la viabilidad celular durante el almacenamiento en baja temperatura.