

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 806**

51 Int. Cl.:

A61L 15/32 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2007 E 07733242 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **18.03.2009 EP 2035047**

54 Título: **Composición de matriz extracelular**

30 Prioridad:

16.06.2006 GB 0611986
16.06.2006 US 804996 P
11.05.2007 GB 0709099

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.02.2013

73 Titular/es:

RESTORATION OF APPEARANCE & FUNCTION TRUST (100.0%)
THE LEOPOLD MULLER BUILDING MOUNT VERNON HOSPITAL
NORTHWOOD, MIDDLESEX HA6 2RN, GB

72 Inventor/es:

DYE, JULIAN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 394 806 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 de matriz extracelular

5 La invención se refiere a un procedimiento para preparar una composición de matriz extracelular que comprende fibrinógeno reticulado o un derivado del mismo, a una composición de matriz extracelular obtenida mediante dicho procedimiento y al uso de dicha composición en la cicatrización de heridas con pérdida de piel de grosor completo, regeneración de tejido o como soporte de ingeniería de tejidos.

10 Las heridas que implican pérdida de piel de grosor completo abarcan un amplio espectro de etiología patológica de las tres heridas crónicas principales: úlceras por presión, úlceras venosas y úlceras diabéticas en heridas por traumatismo y quemaduras. Las heridas crónicas y agudas que implican pérdida de piel de grosor completo son potencialmente mortales y pueden ser letales. Estas heridas provocan estrés fisiológico, estructuras significativas expuestas de manera invariable y son muy costosas de tratar. Pueden tener graves consecuencias ya que alteran la función protectora de la piel, aumentando las posibilidades de infección y conduciendo a pérdida de fluido. Además, también pueden provocar al paciente molestia física, emocional y social considerable ya que no cicatrizan fácilmente.

15 A medida que ha progresado el entendimiento básico de los científicos sobre las heridas y los mecanismos de cicatrización de heridas, se han desarrollado varios enfoques diferentes para el tratamiento de heridas. Sin embargo, aunque las heridas pequeñas se han beneficiado de avances tales como cierre con colgajo microquirúrgico y la llegada de presión negativa tópica, los intentos por mejorar las técnicas de tratamiento para heridas grandes han sido menos satisfactorios.

20 Esto es debido a que las heridas grandes necesitan cubierta de piel para lo que hay varias soluciones no satisfactorias. Los injertos de piel de grosor parcial, que eliminan el tejido requerido del paciente provocando lesión adicional, no estimulan la regeneración de dermis perdida y de ese modo a menudo dan como resultado formación de cicatrices graves. Además, los queratinocitos cultivados pueden tardar aproximadamente un mes en prepararse y cuando se aplican a una herida sin una dermis adecuada, también dan como resultado una cicatrización grave a largo plazo.

25 Por esta razón, se han introducido en el foro clínico composiciones de matriz extracelular tales como composiciones de soporte dérmico y están viendo un aumento de su uso (al menos en el R.U.) durante la última década. Se ha reconocido que estas composiciones deben tener propiedades particulares que les permitan reducir la cicatrización y contracción de heridas. El material debe poder soportar la adhesión celular; ser lo suficientemente rígido para resistir el colapso bajo las fuerzas de tracción ejercidas por células en crecimiento; así como ser resistente a la degradación proteolítica rápida de modo que sobreviva en un entorno de herida para que se produzca la fibroproliferación.

30 Actualmente, el colágeno es el componente principal de composiciones de soporte dérmico. Se ha considerado el colágeno como soporte pasivo, permisivo para permitir la conductancia celular. La entrada de células endoteliales y fibroblastos cultivados en materiales colagenosos es limitada. La experiencia clínica indica que en heridas difíciles la "captación", (es decir la unión satisfactoria de un injerto a la piel de un paciente) de tales soluciones basadas en colágeno puede ser de varias semanas. Como tales, a menudo presentan infección, seromas y hematomas, y con frecuencia fracasan con graves consecuencias.

35 La evidencia reciente sugiere que el fibrinógeno puede tener propiedades críticas relevantes a la angiogénesis (Potter *et al.* (2006) *Plast. Reconstr. Surg.* 117(6), 1876-1885) que es un procedimiento fisiológico que implica el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. La angiogénesis es particularmente crítica para el procedimiento de reparación de heridas, no pudiendo algunas células sobrevivir si están > 100 μm del capilar funcional más cercano (Langer *et al.* *Tissue Eng* 1995:1:151-161). El documento US 2004/0229333 (Bowlin *et al.*) da a conocer una serie de matrices y tejidos a base de fibrina electroprocesada.

45 Se ha identificado el fibrinógeno como un potencial componente en una dermis sintética (Baldwin *et al.*: Development of a pro-angiogenic matrix for synthetic dermis using cultured endothelial cells. Institute Pasteur Euroconferences 40, 2005).

El documento WO 2004/067704 da a conocer una matriz de fibrina porosa para soportar el crecimiento celular tridimensional. La matriz está formada por proteínas de plasma comprendiendo fibrinógeno, trombina y un aditivo seleccionado de glicosaminoglicano pero no comprende agente de reticulación ni espumante.

50 El objeto de esta invención es proporcionar una composición de matriz extracelular, estable que interaccione activamente con células, particularmente para fomentar la adhesión de células endoteliales, aumentando la probabilidad de "captación" y por tanto el éxito del material de matriz artificial.

Por tanto, según un primer aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para preparar una composición de matriz extracelular que comprende:

55 (a) mezclar una disolución acuosa de fibrinógeno con un agente coagulante y un agente de carga y un agente

espumante

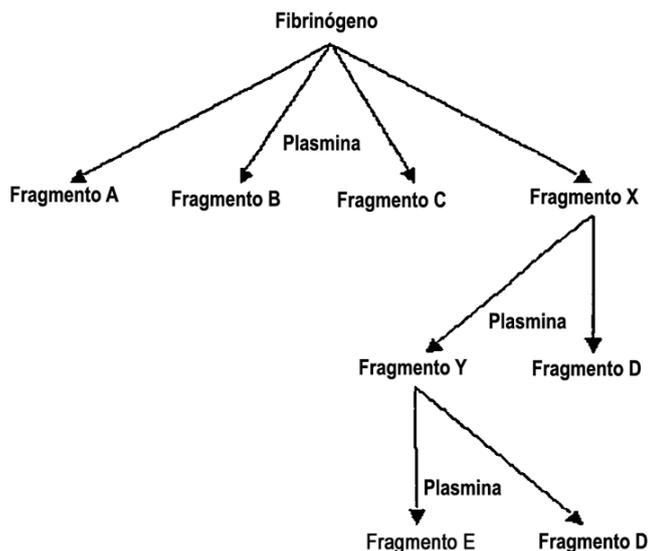
(b) incubar la mezcla obtenida en la etapa (a) con un agente de reticulación seleccionado de: agentes de acoplamiento de carbodiimida tales como N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC); N-hidroxisuccinimida (NHS), agentes de acoplamiento de azida; agentes de reticulación de diisocianato tales como diisocianato de hexametileno; agentes de reticulación de epóxido tales como epíclorhidrina, glicidil éteres y glicidilaminas; y agentes de reticulación de aldehído tales como formaldehído, glutaraldehído y glioxal y

(c) lavar la composición reticulada obtenida en la etapa (b) para eliminar el agente de reticulación.

Tal como se usa en el presente documento, el término "matriz extracelular" se refiere a una estructura, soporte o plataforma compuesta por un material química o bioquímicamente definido al que pueden adherirse diversas células (por ejemplo dérmicas, musculares, nerviosas, de tejido conjuntivo, de fascia, de duramadre o peritoneales) de vertebrados superiores y multiplicarse sin provocar toxicidad o inhibición de replicación celular.

El fibrinógeno tiene una masa molecular de 340 kDa (Doolittle, R.F. Annu Rev Biochem. 1984; 53:195-229) y está compuesto por tres pares de cadenas de polipéptido ($A\alpha B\beta\gamma$)₂. Los extremos amino terminales de los tres pares de cadenas están unidos entre sí mediante enlaces disulfuro en la región central de la molécula. Los extremos carboxilo terminales de las cadenas B β contienen las regiones de extremo proximal, y los extremos carboxilo terminales de la cadena γ contienen las regiones de extremo distal (Weisel, J.W., Stauffer, C.V., Bullitt, E., Cohen, C. Science. 1985; 230:1388-1391).

El fibrinógeno puede escindirarse en diversos sitios diferentes para producir fragmentos de fibrina. Por ejemplo, el fibrinógeno puede dividirse en fragmento A, B, C y X usando plasmina. El fragmento X puede dividirse entonces en fragmento Y y fragmento D. El fragmento Y puede dividirse adicionalmente para producir otro fragmento D y fragmento E.



Las referencias a "fibrinógeno o un derivado del mismo" incluyen por tanto referencias a fibrinógeno nativo purificado de plasma, fragmentos de fibrinógeno o análogos de fibrinógeno. Se apreciará que cualquier fragmento o análogo del mismo debe conservar la función angiogénica de fibrinógeno nativo y se ha mostrado en el presente documento que los productos de degradación mencionados anteriormente imitan el efecto proangiogénico del fibrinógeno nativo.

Se apreciará que las referencias a fibrinógeno purificado incluyen fibrinógeno a un nivel de pureza superior a uno del 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o el 99%.

Ejemplos de fragmentos de fibrinógeno incluyen formas truncadas de fibrinógeno, tales como fibrina A, fibrina B, fibrina C, fibrina D, fibrina X y fibrina Y. En una realización adicional, la forma truncada de fibrinógeno es fibrina E.

Los ejemplos de análogos de fibrinógeno incluyen un derivado modificado de fibrinógeno en el que se han sustituido uno o más residuos de aminoácido del péptido por otros residuos de aminoácido sintéticos o que se producen de

manera natural y/o en el que se han eliminado uno o más residuos de aminoácido del péptido y/o en el que se han añadido uno o más residuos de aminoácido al péptido. Tal adición o eliminación de residuos de aminoácido puede tener lugar en el extremo N-terminal del péptido y/o en el extremo C-terminal del péptido. Un ejemplo adicional puede ser una molécula de fibrinógeno genéticamente recombinante.

- 5 Se apreciará que las referencias a fibrinógeno o un derivado no se extienden a fibrinógeno electroprocesado o un derivado del mismo tal como los descritos en el documento US 2004/0229333.

La presencia de fibrinógeno o un derivado del mismo en la composición tiene un efecto estimulador intrínseco y potente sobre la migración de células endoteliales, lo que conduce a captación mejorada y permite un procedimiento de cicatrización significativamente más rápido. Por tanto, se cree que la matriz de fibrina porosa obtenida mediante el procedimiento de la invención puede representar un tratamiento más eficaz de heridas que composiciones de matriz extracelular descritas previamente (por ejemplo soportes de piel dérmicos).

En una realización, está presente fibrinógeno dentro de la composición como disolución acuosa tamponada a un pH de entre 4 y 10. En una realización adicional, se tampona fibrinógeno a un pH de entre 7 y 8 (por ejemplo de 7,4). En una realización, se tampona fibrinógeno con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o solución salina tamponada con HEPES.

En una realización, el agente coagulante comprende un agente coagulante enzimático o no enzimático. En una realización adicional, el agente coagulante enzimático es trombina (nomenclatura de enzimas de IUBMB EC3.4.21.5) o un mimético de trombina. La presencia de trombina o un mimético de trombina dentro de la matriz extracelular ayuda a la formación de una composición estable en forma de un gel.

20 En una realización, el agente coagulante enzimático es trombina que puede derivarse del reino animal o procariota. En una realización adicional, el agente coagulante enzimático es trombina de salmón. Esta realización proporciona la ventaja de reducir el riesgo de transmisión de enfermedad infecciosa. En una realización alternativa, el agente coagulante enzimático es trombina humana.

La trombina es una endopeptidasa de la familia de quimotripsina, con especificidad de sustrato de tipo tripsina. La trombina convierte el fibrinógeno en fibrina escindiendo de manera selectiva enlaces Arg-Gly en fibrinógeno para liberar fibrinopéptidos A y B.

También se describe la trombina como fibrinogenasa, trombasa, trombofort, trombina C tópica, tropostasina, factor II de coagulación de sangre activado, factor IIa de coagulación de sangre, factor IIa, trombina E, β -trombina y γ -trombina. Por tanto, las referencias a un mimético de trombina incluyen cualquier agente estructural y funcionalmente relacionado, análogos y todos los derivados del mismo que demuestran estas propiedades. Ejemplos de tales miméticos de trombina incluyen: batroxobina (sinónimos: defibrasa, reptilasa; nomenclatura de IUBMB S01.176); crotalasa (derivada del veneno de *Crotalus adamanteus*; sinónimos: defibrinzinga; nomenclatura de IUBMB S01.177); botrombina (derivada del veneno de *Bothrops jararaca*; nomenclatura de IUBMB S01.179); atroxina (derivada de *Bothrops atrox*; nomenclatura de IUBMB U9G.05); ancrod (derivada de la toxina de *Agkistrodon contortrix*; sinónimos arvina, protac, activador de proteína C; nomenclatura de IUBMB S01.178); y gabonasa (derivada de *Bitis gabonica*; nomenclatura de IUBMB S01.430).

En una realización, el agente coagulante no enzimático es protamina o hialuronano.

En una realización, la etapa (a) del procedimiento comprende adicionalmente mezclar una disolución acuosa de fibrinógeno con un agente espumante. Ejemplos de un agente espumante incluyen un tensioactivo, un tensioactivo de copolímero en bloque tal como un tensioactivo Pluronic, detergente o similares. La presencia de un agente espumante proporciona el beneficio de crear una estructura de espuma eficaz al tiempo que puede eliminarse fácilmente de la composición, por ejemplo, disolviendo en etanol en el caso de un tensioactivo o mediante reducción de la concentración de ión de calcio para disolver un gel de perla dependiente de calcio en el caso de una microperla. En una realización adicional, el agente espumante comprende un tensioactivo, tal como un detergente no iónico, tensioactivo de gelificación termosensible (por ejemplo Pluronic 127), fosfolípido de tipo difosfatidilglicerol o una mezcla de una fase inmiscible (por ejemplo isopentano) con la fase de disolución acuosa de fibrinógeno.

La presencia de un agente de carga dentro de la etapa (a) proporciona la ventaja de iniciar la formación de la matriz extracelular y controla sinérgicamente la microestructura de la mezcla resultante.

Los ejemplos de agentes de carga incluyen: alginatos; biopolímeros incluyendo goma xantano y escleroglucano; carboximetilcelulosa; carragenanos (por ejemplo sulfato de galactosa); galactomananos es decir flor de goma guar y goma de semilla de algarroba; heta-almidón; una microperla inerte de solubilidades diferentes; glicosaminoglicanos (GAG; por ejemplo 6-sulfato de condroitina, 4-sulfato de condroitina, heparina, sulfato de heparina, sulfato de queratano, sulfato de dermatano, quitina, quitosano, sulfato de dextrano o hialuronano) y extractos refinados de goma de semilla de algarroba, tales como lecitinas y pectinas.

55 En una realización, el agente de carga es un alginato o alginato derivatizado. En una realización adicional, el agente de carga es alginato de sodio o propilglicolalginato de sodio. La presencia de alginato dentro de la composición de

matriz extracelular induce una reacción de coprecipitación independiente de calcio lo que proporciona la ventaja de ayudar con la formación de una composición estable en forma de un gel.

Los alginatos son sales de ácido algínico, que es un poliurónido compuesto por una secuencia de dos residuos de ácido hexurónico: ácido β -D-manurónico (o residuo M); y ácido α -L-gulurónico (o residuo G). El ácido α -L-gulurónico se forma a partir de epimerización enzimática de ácido β -D-manurónico. Estos monómeros pueden aparecer en bloques homopoliméricos de residuos G consecutivos (bloques G), residuos M consecutivos (bloques M), residuos M y G alternantes (bloques MG) o bloques organizados al azar. La cantidad relativa de cada tipo de bloque varía tanto con el origen del alginato. Los bloques alternantes forman las cadenas más flexibles y son más solubles a pH más bajo que los otros bloques. Los bloques G son más adecuados ya que forman geles más fuertes que las cadenas ricas en M con la adición de cationes divalentes, por ejemplo Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Cu^{2+} etc. Esto se debe a que dos bloques G de más de 6 residuos pueden formar uniones reticuladas estables con cationes divalentes que conducen a una red de gel tridimensional (Simpson-NE, *et al.*, Biomaterials 25 (2004) 2603-2610).

En una realización alternativa, el agente de carga es un glicosaminoglicano (GAG; por ejemplo 6-sulfato de condroitina, 4-sulfato de condroitina, heparina, sulfato de heparina, sulfato de queratano, sulfato de dermatano, quitina, quitosano, sulfato de dextrano o hialuronano). La presencia de un GAG dentro de la composición proporciona la ventaja de potenciación de la estabilidad en virtud de poseer residuos de aminoácido que pueden reticularse de manera covalente con fibrinógeno durante la reticulación de fibrinógeno.

Se apreciará que pueden usarse una variedad de métodos para formar la mezcla a base de fibrinógeno preparada en el procedimiento (a), cualquiera de los cuales dará como resultado matrices porosas para formar soportes de tejido. Por tanto, en una realización, la etapa (a) puede comprender alternativa o adicionalmente una etapa de colada, colada con separación de fases, espumación, liofilización, extrusión, elaboración de materiales textiles, elaboración de fieltros, recubrimiento por pulverización o fabricación rápida.

El agente de reticulación usado en la etapa (b) puede ser uno cualquiera de varios agentes de reticulación o técnicas de reticulación comúnmente conocidos por los expertos en la técnica, tal como métodos químicos, de radiación y deshidrotérmicos. Una ventaja adicional proporcionada por composiciones de matriz extracelular que comprenden fibrinógeno reticulado es la eliminación de crecimientos bacterianos de los materiales. Por tanto, las composiciones de la invención se esterilizan simultáneamente durante la reticulación. Además, se ha mostrado que la presencia de reticulación permite que las propiedades físicas y terapéuticas de la composición creen una sinergia, que proporciona ventajas significativas en comparación con fibrinógeno no reticulado o un derivado del mismo u otros soportes de piel dérmicos.

Los ejemplos de agentes de reticulación químicos adecuados incluyen: agentes de acoplamiento de carbodiimida tales como N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC); N-hidroxisuccinimida (NHS), agentes de acoplamiento de azida; agentes de reticulación de diisocianato tales como diisocianato de hexametileno; agentes de reticulación de epóxido tales como epiclorhidrina, glicidil éteres y glicidilaminas; y agentes de reticulación de aldehído tales como formaldehído, glutaraldehído y glioxal.

En una realización adicional el agente de reticulación químico comprende N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) y/o N-hidroxisuccinimida (NHS).

En una realización alternativa el agente de reticulación químico comprende agentes de reticulación de aldehído tales como formaldehído, glutaraldehído y glioxal. Los agentes de reticulación de aldehído tienen la ventaja de proporcionar composiciones de matriz extracelular con biocompatibilidad mejorada. Por ejemplo, se ha mostrado en el presente documento que la presencia de un agente de reticulación de aldehído potencia la propagación *in vitro* (por ejemplo la siembra de fibroblastos o células endoteliales humanas sobre la matriz). En una realización adicional, el agente de reticulación de aldehído es glutaraldehído. El uso de glutaraldehído como agente de reticulación proporciona una ventaja sorprendente de producir una densidad de reticulación óptima más rápidamente que otros aldehídos y también puede lograr una densidad relativamente alta de reticulación.

Cuando el agente de reticulación comprende glutaraldehído o N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) y/o N-hidroxisuccinimida (NHS), la etapa (b) puede comprender adicionalmente la adición de un agente reductor de toxicidad (por ejemplo lisina).

En una realización, cuando el agente de carga comprende alginato, el procedimiento de la invención puede comprender una etapa de reticulación adicional para reticular alginato con fibrinógeno. En una realización adicional, el agente de reticulación comprende ácido peryódico. Es probable que una etapa de reticulación adicional de este tipo potencie la estabilidad de la composición resultante.

La etapa de incubación (b) puede realizarse normalmente durante entre 1 minuto y 24 horas (por ejemplo 4 horas) a una temperatura adecuada (por ejemplo temperatura ambiente).

Cuando el agente de reticulación comprende un agente de reticulación de aldehído, el procedimiento puede comprender adicionalmente la adición de un agente reductor tras la etapa (b) y antes de la etapa (c).

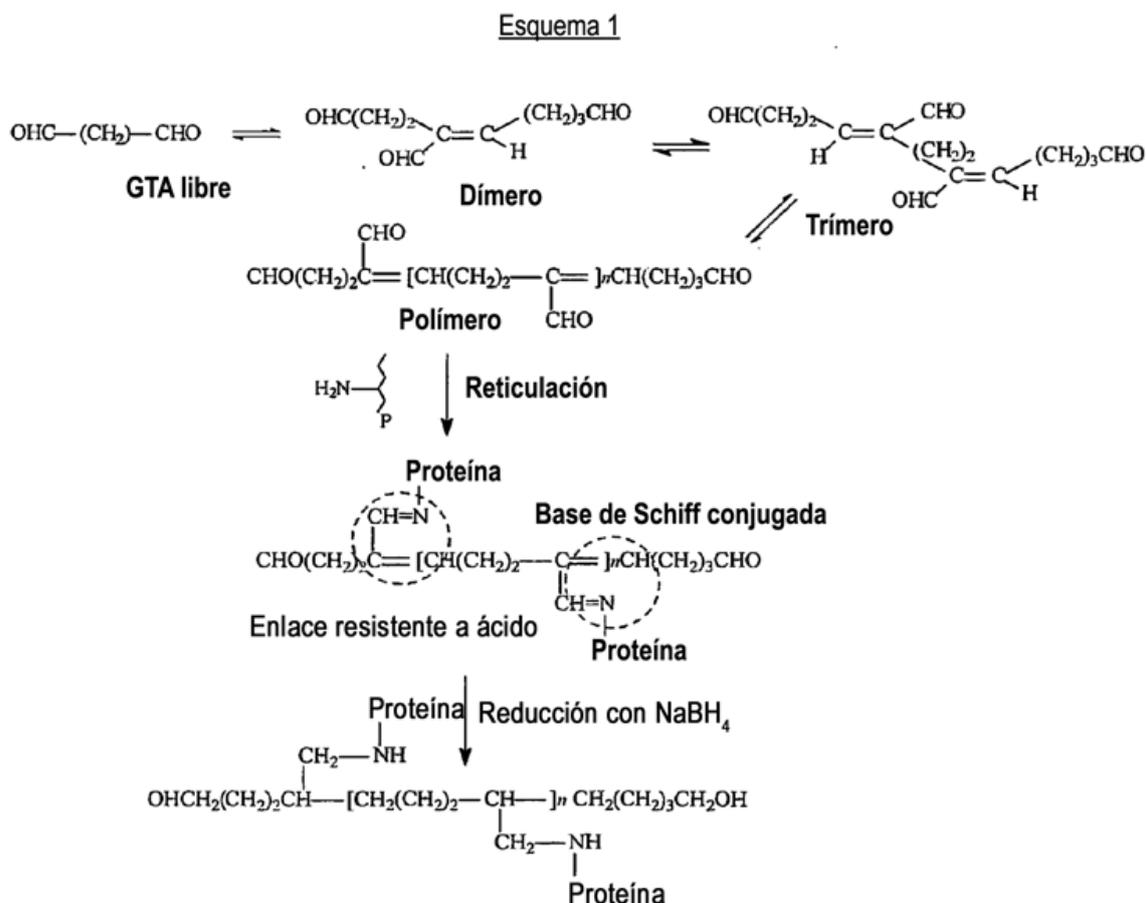
Se cree que la presencia del agente reductor estabiliza el procedimiento de reticulación y sorprendentemente da como resultado una composición de matriz extracelular con eficacia biológica potenciada. Además, es probable que la presencia del agente reductor reduzca los efectos citotóxicos provocados por la lixiviación de agente de reticulación no reducido a partir de la composición.

- 5 Los ejemplos de un agente reductor adecuado incluyen borohidruro de sodio o agentes con reactividad de grupo carbonilo similar.

El agente reductor puede añadirse normalmente en una cantidad de entre el 0,1% p/p y el 10% p/p (por ejemplo el 1% p/p).

- 10 El glutaraldehído existe en varias conformaciones diferentes. Por ejemplo, a pH ácido, el glutaraldehído está en equilibrio con su hemiacetal cíclico; cuando se aumenta el pH hasta el intervalo neutro o ligeramente básico el dialdehído experimenta una condensación de aldol con sí mismo, seguido por deshidratación para generar polímero de aldehído α,β -insaturado. Aunque ambas estructuras generan mecanismos y productos diferentes, se está de acuerdo ampliamente en que el sitio de reacción principal para el glutaraldehído son los residuos de lisina o hidroxilisina de cadenas laterales de proteína. Cuando se lleva a cabo la reticulación a pH 3, se forma la unión de base de Schiff de glutaraldehído con dos residuos de lisina, que estabiliza contra hidrólisis ácida.
- 15

A pH neutro, la base de Schiff que se forma con aldehído está en conjugación con un doble enlace. Es la interacción de resonancia de la base de Schiff con doble enlace etilénico lo que conduce a la hidrólisis ácida (tal como se muestra en el esquema 1).



- 20 La base de Schiff conjugada todavía puede experimentar adición de Michael si la concentración de amina local es particularmente alta. Alternativamente, tanto el ácido como la base catalizan la actividad nucleófila del grupo aldehído, la reacción de reticulación con proteína también es dependiente de la disponibilidad de la disponibilidad de ϵ - NH_2 libre que se decide mediante pK_a de residuo de lisina o punto isoelectrico (pI) de la proteína con pH de medios. En la práctica, la reacción se lleva a cabo normalmente en condiciones próximas a la neutra tales como pH 7,4 para lograr el grado y la velocidad de reacción óptimos. La estabilidad final resultante de la estructura depende de la cantidad de glutaraldehído usado y la accesibilidad de sitios de fijación. Aun así, se producen reacciones de competencia aleatoriamente mediante los diversos modos: fijación de monopunto, reticulación bifuncional o multifuncional,
- 25

- intermolecular o intramolecular, etc. Por tanto, el glutaraldehído es un reactivo de reticulación no confinado. Sin querer limitarse por la teoría, su éxito puede deberse a la diversidad de formas moleculares presentes simultáneamente en la disolución de reactivo, permitiendo la formación de puentes de distancias diferentes entre los sitios reactivos en la estructura terciaria de la proteína, mediante reticulaciones tanto intermoleculares como intramoleculares.
- En una realización el procedimiento puede comprender adicionalmente la adición de un ión de metal divalente o multivalente tal como calcio (por ejemplo cloruro de calcio). La presencia de calcio proporciona una o más de las siguientes propiedades beneficiosas: (i) etapa de activación de trombina; (ii) etapa de gelación de agentes de carga tales como alginato; (iii) control de la reacción de coagulación de fibrinógeno; (iv) estabilidad de fibrinógeno reticulado, fibrina o fragmento derivado frente degradación proteolítica. Se apreciará que la concentración de calcio se seleccionará de modo que sea lo suficientemente alta para gelar alginato y/o activar trombina, sin embargo, no superará una cantidad que es probable que se lixivie de la composición y tenga efectos citotóxicos. En una realización, se añade calcio en una concentración final de entre 1 y 50 mM. En una realización adicional, se añade calcio en una concentración final de aproximadamente 50 mM.
- La etapa de lavado (c) es un procedimiento esencial con el fin de eliminar el agente de reticulación químico residual (y agente reductor si está presente), que puede separarse por lixiviación a lo largo de varias horas o días. La etapa de lavado también aumenta la biocompatibilidad de las composiciones de matriz extracelular resultantes tras la reticulación.
- En una realización, el lavado en la etapa (c) se logra usando un régimen de lavado adecuado (por ejemplo lavados de 5x5 min.) en un tampón adecuado, tal como PBS o un disolvente, tal como agua, etanol, metanol, propanol, isopropanol o una mezcla de los mismos. En una realización adicional, la etapa de lavado (c) está acompañada por sonicación. La presencia de sonicación en forma de ultrasonidos (por ejemplo ráfagas de 5x30 s) potencia adicionalmente la eliminación del agente de reticulación (y agente reductor si está presente). Aún en una realización adicional, la etapa de lavado (c) comprende lavados 5x5 min. en una mezcla de etanol/agua (por ejemplo etanol al 95% v/v y agua al 5% v/v).
- En una realización, la etapa de mezclado (a) puede lograrse mediante espumación, por ejemplo mezclado con aireación. En una realización adicional, la espumación se logra usando un aireador (por ejemplo durante 30 s).
- En una realización, la mezcla obtenida en la etapa (a) se cuele, congela y opcionalmente se liofiliza antes de la etapa de incubación (b).
- Se apreciará que la etapa de colada comprende normalmente procedimientos conocidos por los expertos en la técnica de preparación de composiciones de matriz extracelular. Normalmente, la etapa de colada comprende la incubación de la mezcla obtenida en la etapa (a) a 37°C durante 15 minutos.
- La etapa de congelación comprenderá normalmente el almacenamiento de la mezcla de colada obtenida en la etapa (a) por debajo de 0°C (por ejemplo desde -20°C hasta -70°C) desde varias horas hasta durante la noche. En una realización, la mezcla de colada obtenida en la etapa (a) se congela a -20°C durante 1 hora seguido por congelación a -70°C durante la noche.
- Se apreciará que la etapa de liofilización comprende normalmente procedimientos conocidos por los expertos en la técnica de liofilización. Por ejemplo, la liofilización de la mezcla colada, congelada obtenida en la etapa (a) comprenderá normalmente liofilización desde durante la noche hasta varios días (por ejemplo 24 h) a una presión adecuada (por ejemplo 10⁻² mBar) y a una temperatura adecuada (por ejemplo -60°C).
- En una realización, la composición lavada, reticulada obtenida en la etapa (c) se congela y opcionalmente se liofiliza antes de su uso.
- Se apreciará que las etapas de congelación y liofilización pueden realizarse tal como se describió anteriormente en el presente documento.
- Según un segundo aspecto de la invención se proporciona una composición de matriz extracelular que comprende fibrinógeno reticulado o un derivado del mismo.
- Según un tercer aspecto de la invención se proporciona una composición de matriz extracelular que puede obtenerse mediante un procedimiento tal como se definió anteriormente en el presente documento.
- Además de los usos *in vivo* de la composición de matriz definida en el presente documento, también se prevé que la composición puede ser beneficiosa para usos *in vitro* y *ex vivo*, tales como modelos de ingeniería de tejidos de piel para estudios de selección. Tales modelos pueden prepararse sembrando fibroblastos y células endoteliales en la composición de matriz extracelular y cultivando queratinocitos sobre la superficie superior.
- Según un aspecto adicional de la invención se proporciona el uso de una composición de matriz extracelular tal como se definió anteriormente en el presente documento para la cicatrización de heridas *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*,

regeneración de tejido o como soporte de ingeniería de tejidos.

Según aún un aspecto adicional de la invención se proporciona un método de cicatrización de heridas o regeneración de tejido que comprende aplicación de una composición de matriz extracelular tal como se definió anteriormente en el presente documento a una herida.

- 5 Según aún un aspecto adicional de la invención se proporciona una composición de matriz extracelular tal como se definió anteriormente en el presente documento para su uso en la cicatrización de heridas, regeneración de tejido o como soporte de ingeniería de tejidos *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

Ahora se describirá la invención, a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La figura 1 demuestra los resultados de un análisis del efecto de reticulación sobre la resistencia a la proteólisis.

- 10 Las figuras 2-4 demuestran los resultados de un análisis de biocompatibilidad que implica soportes reticulados.

La figura 5 demuestra los resultados de un análisis del efecto de reticulación sobre la adhesión celular.

Las figuras 6-8 demuestran los resultados de un análisis de toxicidad que implica agentes de reticulación.

Las figuras 9-13 demuestran los resultados de un análisis de floculación/coagulación de fibrinógeno.

Las figuras 14-28 demuestran los resultados de estudios de optimización de reticulación.

- 15 La figura 29 demuestra los resultados de un análisis SEM del soporte de fibrina/alginateo.

Las figuras 30-35 demuestran los resultados de un análisis citotóxico de componentes de soporte.

Las figuras 36-41 demuestran los resultados de un análisis inflamatorio de componentes de soporte.

La figura 42 demuestra los resultados de una evaluación *in vivo* de un soporte de espuma según la invención.

Ejemplos

- 20 Ejemplo 1: preparación de una composición de matriz extracelular que comprende fibrinógeno reticulado con glutaraldehído

(a) Materiales usados

Fibrinógeno bovino al 2% (fracción 1 de plasma bovino tipo IV) (F4753, Sigma, St Louis, EE.UU.) en PBS + CaCl₂/MgCl₂ (Gibco, Paisley, R.U.).

- 25 Ácido algínico al 2% (polímero de ácido manurónico/ácido glucurónico mixto de *macrocyttis pyrifera*, alga parda; Sigma) en PBS de Dulbecco, pH 7,4, solubilizado mediante la adición de NaOH 1 M.

Trombina humana (plasma humano EC 3.4.21.5, T6884 Sigma), 10 unidades de NIH/ml en BSA al 0,1%/M199 (Gibco, Paisley, R.U.).

Disolución de glutaraldehído al 25% (grado II G62517 Sigma).

- 30 1-(3-Dimetilamino-propil)-3-etil-carbodiimida (EDC) HCl al 98% (Acros Organics, Nueva Jersey, EE.UU.).

Borohidruro de sodio (Sigma).

Etanol al 95% (Hayman Ltd, Witham, R.U.)/diH₂O al 5%.

PBS de Dulbecco sin sales de calcio y magnesio (PBS).

PBS de Dulbecco con sales de calcio y magnesio.

- 35 (b) Equipo usado

Liofilizador Christ y bomba de vacío (Vacuubrand RZ2.5 clasificada para vacío máximo de 4x10⁻⁴ mBar).

Placas Petri de poliestireno o placas de múltiples pocillos.

Pipetas Stripette.

Puntas de pipeta sometidas a autoclave.

- 40 Tubos de polipropileno de 50 ml.

(c) Preparación de la matriz

Se mezcló una disolución de fibrinógeno de 2 ml con una disolución de ácido algínico de 2 ml en un tubo de polipropileno de 50 ml a temperatura ambiente. A esta mezcla se le añadió una disolución de trombina de 50 µl y se espumó la mezcla resultante usando un aireador durante 30 segundos. Entonces se coló la mezcla espumada en un pesasustancias de 2,5 x 2,5 cm seguido por incubación durante 15 min. a 37°C. Entonces se congeló la mezcla de colada durante 1 hora a -20°C seguido por congelación adicional durante la noche a -80°C. Entonces se liofilizó el producto congelado durante 24 horas usando un liofilizador Christ 1-2-alpha a aproximadamente 10⁻² mBar y -60°C. Entonces se almacenó el producto resultante a 4°C antes de transferirlo a una placa de 6 pocillos (Greiner-Bio, Alemania). Se añadieron 10 ml de glutaraldehído (en un intervalo de concentraciones de desde el 0,05-0,4%) en etanol al 95%/H₂O al 5% al sustrato seguido por incubación durante cuatro horas a temperatura ambiente. Tras la reticulación, se lavó el sustrato cinco veces en 10 ml de etanol al 95%/H₂O al 5% seguido por congelación y liofilización como anteriormente y almacenamiento a 4°C antes de la caracterización adicional.

Ejemplo 2: preparación de una composición de matriz extracelular que comprende fibrinógeno reticulado con EDC

Se preparó esta composición de una manera análoga a la descrita en el ejemplo 1 con la excepción de que se usaron 10 ml de EDC (en un intervalo de concentraciones de desde 25-100 mM) como agente de reticulación.

Ejemplo 3: preparación de una composición de matriz extracelular que comprende fibrinógeno no reticulado

Se preparó esta composición de una manera análoga a los ejemplos 1 y 2 con la excepción de que se omitieron las etapas de reticulación y lavado.

Ejemplo 4: preparación de una composición de matriz extracelular que comprende fibrinógeno reticulado con glutaraldehído y reducido

Se preparó esta composición de una manera análoga a la descrita en el ejemplo 1 con la excepción de que se hidrató la composición tras la liofilización con borohidruro de sodio al 1% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Entonces se drenó la composición y se sustituyó por reactivo nuevo, se incubó durante cinco minutos adicionales y luego se repitió (3 tratamientos en total). Entonces se lavó la composición reducida resultante con PBS cinco veces, con remojo de cinco minutos entre cada lavado.

Ejemplo 5: efecto de la reticulación sobre la resistencia a la proteólisis

(a) Materiales usados

Tubos de ultrafiltración Vivaspin con punto de corte de 10 kDa (0,5 ml).

Placas de ELISA.

PBS de Dulbecco.

Tripsina al 2,5% en PBS o verseno.

Reactivos A y B de BCA de Pierce.

BSA/PBS 1 mg/ml.

(b) Método de estabilidad macroscópica

Se transfirieron secciones de aproximadamente 1 cm² x 2 mm de grosor del soporte de prueba preparado en los ejemplos 1, 2 y 3 (no reticulado o reticulado con EDC 50 ó 100 mM o glutaraldehído al 0,05%, al 0,2% o al 0,4% en etanol al 95% durante 4 horas) a un tubo de polipropileno. Se añadieron 10 ml de tripsina al 0,25% en PBS o PBS solo (como control) al tubo que entonces se tapó y se incubó a 37°C durante 1 semana.

Entonces se inspeccionó el soporte para determinar su integridad macroscópica y se observaron los resultados y se registraron en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1

Agente de reticulación	Tratamiento con PBS	Tratamiento con tripsina al 0,25%
Control (sin agente de reticulación)	Fragmentado	Degradado en 4 horas
EDC 50 mM	Intacto en la semana 1, permaneció a las 3 semanas	Degradado en 24 horas
EDC 100 mM	Intacto en la semana 1, permaneció a las 3 semanas	Degradado en 96 horas
Glutaraldehído al 0,2%	Intacto en la semana 1, permaneció a las 3 semanas	Intacto en la semana 1, permaneció a las 3 semanas

Glutaraldehído al 0,4%	Intacto en la semana 1, permaneció a las 3 semanas	Intacto en la semana 1, permaneció a las 3 semanas
------------------------	-------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------

5 Los resultados de la tabla 1 muestran que los soportes fibrinosos eran estables en PBS solo, sin embargo, había una solubilización parcial tras varias horas en ausencia de reticulación. Los resultados también muestran que la tripsina provocó desintegración completa de material no reticulado del control, sin embargo, el material reticulado con EDC o glutaraldehído pudo resistir la degradación. Se observó que el glutaraldehído era el agente de reticulación más eficaz para la estabilización.

(c) Tasa de degradación proteolítica normalizada cuantitativa

10 Se transfirieron secciones de aproximadamente 1 cm² x 2 mm de grosor del soporte de prueba preparado en los ejemplos 1, 2 y 3 (reticulado con EDC 50 ó 100 mM o glutaraldehído al 0,05%, al 0,2% o al 5%) junto con una composición de matriz extracelular comercialmente disponible (Integra™) a un tubo de polipropileno. Se añadieron 10 ml de tripsina al 0,25% en verseno, o verseno solo (como control) al tubo que entonces se tapó y se incubó a 37°C durante hasta 48 horas.

A intervalos específicos (por ejemplo 0, 2, 4, 24 y 48 h), se extrajeron muestras de 100 µl y se transfirieron a un tubo Vivaspin, y se centrifugaron a 8.000 g durante 10 minutos. Entonces se recuperó el ultrafiltrado y se pipetearon alícuotas de 10 µl de cada muestra a una placa de microtitulación de 96 pocillos por triplicado.

15 Se preparó una disolución de calibración de patrón de BSA 1 mg/ml en PBS y a partir de esta se prepararon una serie de diluciones de patrón de 0, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 µg/ml en PBS. Se pipetearon 10 µl de cada disolución de calibración por triplicado.

20 Se preparó una disolución de BCA de trabajo (50 partes de A + 1 parte de B) y se añadieron 200 µl de esta disolución a cada pocillo seguido por incubación a 37°C durante 1 h. Entonces se enfrió la placa hasta temperatura ambiente y se leyó a 540 nm. Entonces se calculó la concentración de proteína de muestra a partir del patrón usando una hoja de cálculo y se muestran los resultados en la figura 1.

25 El análisis de degradación proteolítica cuantitativo mostrado en la figura 1 corrobora los resultados obtenidos con la evaluación de estabilidad macroscópica mostrada anteriormente en la tabla 1. Por ejemplo, las matrices reticuladas con EDC mostraron una liberación rápida de altos niveles de péptidos. La reticulación con glutaraldehído intermedia (al 0,05% y al 0,2%) mostró más estabilidad y las matrices que tienen glutaraldehído al 5% demostraron solamente liberación mínima de péptidos de degradación, lo que fue comparable a la composición de matriz extracelular comercialmente disponible (Integra™).

Ejemplo 6: efecto de reticulación sobre la biocompatibilidad

(a) Materiales usados

30 PBS de Dulbecco sin Ca y Mg y con Ca y Mg, pH 7,4.

Medios mínimos M199 + BSA al 0,5%.

Tripsina (disolución al 0,25% en verseno/PBS).

Agarosa al 5% en PBS (sin Ca/Mg).

Paraformaldehído al 4% en PBS (PFA/PBS).

35 (b) Equipo usado

Placas de 24 pocillos.

Tubos de polipropileno de 50 ml de fondo cónico, estériles, tapados.

Tubo universal de poliestireno de 25 ml estéril.

Pipetas Stripette.

40 Puntas de pipeta sometidas a autoclave.

Cilindros de cultivo de acero inoxidable con dia. interior = 9 mm, dia. exterior = 1,2 mm, altura = 10 mm.

(c) Unión del soporte

45 Se cortaron los soportes de prueba preparados en los ejemplos 1, 2 y 3 junto con una composición de matriz extracelular comercialmente disponible (Integra™) en discos de aproximadamente 1,2 de dia. x 2 mm. Se transfirió cada soporte a un pocillo separado de una placa de cultivo de 24 pocillos. Se fundió una disolución de agarosa a

aproximadamente 80°C y se pipetearon gotitas de aproximadamente 20 µl a los bordes del soporte para pegar el soporte sobre la superficie del pocillo.

Se hidrató el gel de prueba con medio de cultivo y se colocó un cilindro de cultivo de manera central sobre el material de soporte para crear un pocillo interno.

5 (d) Tipos de células

Materiales: medios de cultivo.

Se inactivó con calor suero bovino fetal (Gibco-Invitrogen) mediante incubación a 56°C durante 30 minutos (HIFBS).

Se obtuvo suero bovino fetal derivado de plasma empobrecido en plaquetas (PDPDS) de First Link (Birmingham, R.U.).

10 Se complementó medio 199 con sales de Earles y HEPES 25 mM con glutaminil-alanina 200 µM + penicilina 100 U/ml / estreptomina 100 µg/ml / ceftazidina 100 µg/ml (M199).

El medio de crecimiento de HPMEC patrón fue M199 + PDPDS al 5% + HIFBS al 2% y el medio de crecimiento alto de HPMEC fue M199 + HIFBS al 5%.

15 Se complementó medio de Eagles modificado por Dulbecco con glucosa al 1% con penicilina 100 U/ml / estreptomina 100 µg/ml / ceftazidina 100 µg/ml (DMEM).

El medio de crecimiento de HDF fue DMEM + HIFBS al 10%.

Células endoteliales microvasculares de placenta humanas (HPMEC)

20 Se aislaron HPMEC a partir de placentas humanas obtenidas con consentimiento y se cultivaron según métodos publicados previamente (Leach *et al.* (1994) *Placenta* 15(4): 355-64; Dye *et al.* (2001) *Microvasc Res* 62(2): 94-113; Dye *et al.* (2004) *Faseb J* 18(1): 125-7). Los cultivos establecidos son fenotípicamente estables durante normalmente hasta 25 pases a una razón de fraccionamiento de 1:3. Se mantienen los cultivos en medio de crecimiento patrón (M199 + PDPDS al 5% + HIFBS al 2%). Se mantuvieron los cultivos en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5% y 37°C. Para la evaluación de biocompatibilidad de soportes, se resuspendieron células recogidas en medio de crecimiento alto (M199 + HIFBS al 5%). Para ensayos de adhesión celular se resuspendieron células recogidas en M199 + BSA al 0,5%.

Fibroblastos dérmicos humanos (HDF)

30 Se aislaron fibroblastos dérmicos humanos a partir de piel humana de adulto normal obtenida de escisiones operatorias de rutina con el consentimiento del paciente. Se mantuvieron las muestras en condiciones estériles mientras se eliminó la grasa subdérmica mediante disección y se cortó la piel en trozos de aproximadamente 1-2 mm³. Estos se introdujeron en matraces de cultivo T25 usando pinzas estériles (6 por matraz) con el lado dérmico hacia abajo y se introdujeron 3 ml de medio de cultivo. El medio de crecimiento de HDF es DMEM + HIFBS al 10%. Se mantuvieron los cultivos en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5% y 37°C durante aproximadamente de dos a tres semanas para permitir la salida de fibroblastos. Entonces se retiraron los explantes de piel y se mantuvieron los cultivos durante 1-2 semanas adicionales antes del pase. Después, se mantuvieron los cultivos mediante pase a una razón de fraccionamiento de aproximadamente 1:4 y se usaron hasta aproximadamente el pase 9 ó 10. Para la evaluación de la biocompatibilidad de soportes, se resuspendieron las células recogidas en medio de crecimiento (DMEM + HIFBS al 10%). Para ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular, se resuspendieron células con DMEM + HIFBS al 2% tal como se describió.

(e) Preparación celular

40 Se preparó tripsina al 0,25%/verseno a partir de disoluciones madre de cultivo tisular, y se calentó medio de cultivo caliente y PBS sin Ca/Mg hasta 37°C.

45 Se aspiró el medio de crecimiento a partir de células confluentes. Se aclaró el cultivo con PBS y se aspiró. Se añadió tripsina/verseno (1 ml por 25 cm³) y se incubó el cultivo a 37°C hasta la separación de las células. Se añadió un volumen igual de medio de cultivo a la suspensión celular y se transfirió a un tubo universal. Se lavó el matraz de cultivo con PBS y luego se transfirió al tubo universal. Entonces se realizó la centrifugación a 200x g durante 7 minutos, se aspiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1-2 ml de cultivo según fuese apropiado, se trituró y se contó la densidad celular (1:10 en azul tripano al 4%/PBS), con un objetivo de aproximadamente 2 x 10⁶/ml.

50 Se calculó el número de células requeridas para el ensayo usando 0,5-1 x 10⁵ células/pocillo. Se diluyó el volumen calculado de células hasta el volumen de ensayo total basándose en 500 µl/pocillo en M199/BSA.

(f) Ensayo de evaluación de biocompatibilidad

Se aspiró el medio de hidratación del soporte a partir de cada pocillo y se sustituyó por 1 ml de medio de cultivo nuevo.

5 Se trituró la suspensión celular (5 x) para asegurar una suspensión uniforme y se tomaron alícuotas de 500 μ l/pocillo gota a gota sobre el soporte en el pocillo interno. Se cubrieron las placas y se incubaron en una atmósfera humidificada a 37°C, CO₂ al 5% durante hasta 4 días.

10 Se aspiró el medio de cultivo, se fijaron células en PFA al 4%/PBS durante 15 min., se lavaron dos veces en PBS y se añadió gota a gota agarosa LMP al 5% y se dejó reposar. Se retiró cuidadosamente el soporte incrustado en agarosa de cada pocillo, se separó la región dentro del anillo de cultivo, se eliminó mediante corte la agarosa en exceso y se colocó entre dos esponjas en una cesta de procesamiento de tejido para el incrustamiento en cera automatizado (Bright).

Se bisecó la muestra incrustada y se montó sobre un bloque de microtomo con orientación de lado. Se cortaron los bloques a 8 μ m y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

15 Se conservaron secciones adicionales para la inmunotinción con antígeno de proliferación Ki67 y se observaron mediante microscopía de campo claro. Se registraron los resultados y se tomaron fotomicrografías representativas con una cámara digital Leica DC200 y software de captura de fotogramas que se muestran en las figuras 2-4.

20 Los resultados mostrados en la figura 2 demuestran que las células endoteliales mostraron diferentes grados de adhesión a matrices de fibrina/alginateo reticuladas con EDC o glutaraldehído lavadas 5 veces en etanol al 95%, en comparación con matrices de fibrina/alginateo no reticuladas. Se observó que las células endoteliales se adherían a matrices reticuladas con glutaraldehído pero aparecían inhibidas, y en las matrices con EDC ni siquiera lograron adherirse. Estos resultados demuestran que concentraciones estabilizantes de agentes de reticulación tienen efectos adversos persistentes. En una referencia paralela (material Integra™) las mismas células formaron una monocapa endotelial típica, pero no lograron ingresar en la matriz.

25 Los resultados mostrados en la figura 3 demuestran que las células endoteliales mostraron adhesión y propagación para matrices de fibrina/alginateo reticuladas con glutaraldehído al 0,2% y al 0,5% que se lavaron adicionalmente con PBS tras la segunda liofilización. El hecho de que tanto las células endoteliales como los fibroblastos dérmicos no lograron propagarse en matrices reticuladas con glutaraldehído al 0,2% y al 0,5% sin la etapa de lavado con PBS adicional indicó que el no lograr propagarse no es específico de células endoteliales.

30 Los resultados mostrados en la figura 4 demostraron que las células endoteliales mostraron adhesión y propagación en matrices de alginateo de fibrina reducidas con borohidruro reticuladas o bien mediante glutaraldehído o bien mediante EDC. Además, las células endoteliales ingresaron rápidamente en una matriz de alginateo de fibrina reticulada con glutaraldehído al 0,2%, reducida con borohidruro. Este comportamiento contrasta de manera notable con las mismas células en el material Integra™ a base de colágeno de referencia y se espera que se traduzca *in vivo* en una angiogénesis rápida.

Ejemplo 7: efecto de reticulación sobre la adhesión celular

35 (a) Materiales usados

NaHCO₃ 0,1 M pH 9,5. También, BSA al 0,1% en NaHCO₃.

Disolución de verseno para cultivo tisular.

PBS de Dulbecco sin Ca y Mg y con Ca y Mg, pH 7,4.

Medios mínimos M199 + BSA al 0,5% (M199/BSA).

40 Accutase (1x disolución almacenada en alícuotas a -20°C, Innovative Technologies Inc).

Fibrinógeno (bovino, Sigma).

Fracción de fibrina E (aproximadamente 1 mg/ml en PBS, trasilol 100 U/ml).

Fibronectina (bovina, Sigma).

Colágeno tipo I, mg/ml en ácido acético al 0,6% (First Link, Birmingham).

45 Disolución de tinción violeta cristal (violeta cristal al 0,5%, formaldehído al 1,85%, NaCl al 0,85%, EtOH al 50%).

PBS sin Ca y Mg para lavado (preparado a partir de 10x disolución madre).

Ácido acético, al 33%.

Disolución acuosa de glutaraldehído al 25% (Sigma).

EDC (Acros).

(b) Equipo usado

Placas de 96 pocillos CovalINK.

Tubos de polipropileno de 50 ml de fondo cónico estériles, tapados.

5 Tubo universal de poliestireno de 25 ml estéril.

Pipetas Stripette.

Puntas de pipeta sometidas a autoclave.

Lector de placas de espectrofotómetro de ELISA.

(c) Recubrimiento de matriz y reticulación

10 Se disolvió fibrinógeno a 1 mg/ml en PBS, lo que requirió calentar desde 20-37°C. Se diluyeron las proteínas de matriz de prueba en NaHCO₃ 0,1 M frío (0-4°C) pH 9,5 y se pipetearon 50 µl por pocillo en placas de ELISA de 96 pocillos Nunc covalink y se incubaron durante 1 h a 37°C. Se asignaron pocillos por cuadruplicado para cada tratamiento celular o control positivo, y los pocillos para adhesión "nula" sólo recibieron recubrimiento con BSA. Se incubaron todas las muestras durante 1 h a 37°C.

15 Se preparó una disolución de trabajo de agente de reticulación y una dilución de intervalo (glutaraldehído al 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5%; EDC 0,3, 1,5, 6,25, 100 mM). Se aspiró disolución de proteína del pocillo y se pipetearon 100 µl/pocillo de disolución de reticulación seguido por incubación durante 1 h a 20°C.

Se lavó el pocillo con un número suficiente de lavados para reducir la concentración residual hasta por debajo de límites citotóxicos (5 x 100 µl por pocillo) con PBS, se sustituyó por BSA/NaHCO₃ 50 µl/pocillo (etapa de bloqueo de reactivo covalente) y se incubó durante 1 h a 37°C. Se realizó el lavado dos veces con PBS estéril y se almacenó la placa con PBS 100 µl/pocillo hasta que las células estaban listas.

20

(d) Preparación celular

Se descongeló Accutase y se preparó M199/BSA. Se aspiró el medio de crecimiento a partir de células confluentes, se aclaró el cultivo con verseno y se aspiró. Se añadió Accutase (1 ml por 25 cm²) y se incubó el cultivo a 37°C hasta la separación de células. Se añadió un volumen igual de medio M199/BSA a la suspensión celular y se transfirió a un tubo universal. Se lavó el matraz de cultivo con PBS, se transfirió al tubo universal y se centrifugó a 200x g durante 7 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1-2 ml de M199/BSA según fuese apropiado, se trituró y se contó la densidad celular (1:10 en azul tripano al 4%/PBS), con un objetivo de aproximadamente 2 x 10⁶/ml.

25

30 Se calculó el número de células requeridas para el ensayo usando 1-2 x 10⁴ células/pocillo. Se diluyó el volumen calculado de células hasta el volumen de ensayo total basándose en 100 µl/pocillo en M199/BSA.

(e) Ensayo de adhesión celular

Se trituró la suspensión celular (5 x) para garantizar una suspensión uniforme y se alicuotaron 100 µl/pocillo en los pocillos recubiertos previamente. Se cubrió la placa con una película adhesiva de sello de placa y se incubó en una atmósfera humidificada a 37°C, CO₂ al 5% durante 1 h.

35

Se aspiró el medio de cultivo, se lavaron cuidadosamente los pocillos dos veces con 100 µl de PBS, usando colector de vacío de aguja fina para aspirar/lavar. Se fijaron/tiñeron las células adherentes con 50 µl de disolución violeta cristal y se incubaron durante 10 minutos.

Se aspiró violeta cristal usando una aguja fina y un matraz de aspirador de violeta cristal dedicado. Se lavaron los pocillos dos veces con 400 µl de PBS, usando un colector de aguja fina para hacer gotear la disolución sobre la pared lateral mientras se mantenía la placa a 45° y se giraba para vaciar los pocillos y se drenaba mediante inversión sobre toalla de papel. Es importante eliminar cualquier violeta cristal residual del cuello de cada pocillo que no se haya lavado tras el primer lavado con algodón.

40

Se disolvió la tinción de violeta cristal unida con ácido acético al 33%, se tapó la placa hasta que se disolvió uniformemente todo el violeta cristal en cada pocillo y se comprobó cuidadosamente antes de la lectura. Se midió la DO con un lector de microplaca a 595 nm.

45

La adhesión celular (es decir el número de células restantes) es proporcional a (A₅₉₅[sustrato de prueba]-A₅₉₅[BSA]). Se expresó la adhesión de condición de prueba como una fracción de adhesión a sustrato control correspondiente y se muestran los resultados en la figura 5.

Los resultados mostrados en la figura 5 demuestran de manera sorprendente que la reticulación aumenta continuamente la adhesión a fibrinógeno pero tiene un efecto bifásico sobre el colágeno.

Ejemplo 8: análisis de toxicidad

(a) Materiales usados

5 Medio de crecimiento: medio de Eagles modificado por Dulbecco (DMEM) con HIFBS al 10% (suero bovino fetal inactivado con calor).

PBS de Dulbecco.

Tripsina al 2,5% en PBS, almacenada en alícuotas a -20°C.

Verseno (NaEDTA/PBS).

10 MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna, Promega) 2,14 mg/ml en PBS, alícuotas de 20 ml, almacenado a -20°C.

PMS (metosulfato de fenazina, Sigma) 0,9 mg/ml en PBS, alícuotas de 2 ml, almacenado a -20°C.

(b) Equipo usado

Placas de cultivo de 24 pocillos.

15 Lector de placas espectrofotométrico de ELISA.

(c) Preparación celular

Se aspiró medio de cultivo a partir de cultivo confluyente y se lavó con verseno. Se añadió 1 ml de tripsina al 0,25%/verseno por 25 cm² y se incubó a 37°C hasta la separación. Se neutralizó la tripsina con un volumen igual de medio de crecimiento, se transfirió la suspensión celular a un tubo universal. Se lavó el matraz de cultivo con PBS y se transfirió al tubo universal. Se realizó la centrifugación a 200x g durante 7 minutos. Se resuspendieron las células en 1-2 ml de medio de crecimiento.

20 Se sembraron células (10⁵/pocillo) en placas de 24 pocillos en 0,5 ml de medio de crecimiento DMEM/pocillo y se incubaron a 37°C en un incubador humidificado con CO₂ al 5%, hasta que las células se adhirieron y se propagaron, normalmente durante la noche. Se conservó un único pocillo en blanco/placa para un control de reactivo.

25 (d) Ensayo de toxicidad

Se aspiró medio de cultivo de cultivos y se sustituyó por: una muestra pesada de soporte (20 mg/pocillo) en DMEM libre de suero nuevo; DMEM libre de suero con un intervalo de diluciones de glutaraldehído o EDC como agentes de reticulación. Se incubaron células a 37°C en CO₂ al 5% humidificado durante 1 h.

30 Se retiró el medio y el material de soporte de las células y se sustituyó por medio de mantenimiento nuevo (DMEM con HIFBS al 2%) y se devolvió al incubador durante de 2 a 22 horas. Se realizaron mediciones de toxicidad directa a las 2, 14 y 20 horas. Para la exposición a matrices, la incubación fue durante 20 h. Se añadió el mismo medio a un pocillo control vacío para un blanco de reactivo.

(e) Ensayo MTS/PMS de viabilidad celular

35 Se descongelaron alícuotas de disoluciones madre de MTS y PMS y se preparó un reactivo MTS/PMS de trabajo (2 ml de MTS + 100 µl de PMS). Se añadió el reactivo MTS/PMS a todos los pocillos (50 µl/pocillo) y se devolvió al incubador durante 2-4 horas, hasta que se desarrolló color en el medio sobre cultivos control sin exposición tóxica.

Se transfirieron alícuotas de 100 µl de medio a una placa ELISA de 96 pocillos para una medición espectrofotométrica a 495 nm.

40 Se restó la absorbancia de blanco de todas las lecturas y se expresaron los resultados (prueba - blanco) como cambio en porcentaje con respecto al control positivo de prueba.

45 Los resultados del análisis de toxicidad se muestran en las figuras 6-7 en las que puede observarse generalmente que la exposición aguda de cultivos de fibroblastos dérmicos humanos a glutaraldehído o EDC da como resultado toxicidad dependiente de la concentración aguda. La incubación de células durante hasta 24 h tras un periodo de exposición muestra que la pérdida de viabilidad es similar tras 2 h o 20 h y no indica que una muerte retrasada, que podría deberse a la inducción de apoptosis por ejemplo, sea un procedimiento principal.

La DL50 para células es un factor de 5-10 veces inferior a la concentración de reticulación más baja de glutaraldehído, pero es 5.000-10.000 veces inferior a la concentración más baja de EDC usada.

(f) Efecto sobre la toxicidad de lavado

5 Se reticularon matrices de fibrina al 1%/alginato al 1%, espumadas y liofilizadas, con EDC o glutaraldehído y se lavaron 5 veces en glicina o PBS antes de una segunda liofilización, o no, según se indica. Se incubaron trozos de 20 µg de matriz en pocillos con cultivos de fibroblastos confluentes en medio libre de suero durante 1 h para detectar toxicidad lixiviable, se evaluaron tras 20 h para comprobar la inducción de muerte celular retrasada.

Los resultados del análisis de lavado pueden observarse en la figura 8 en la que las matrices que no se lavaron tenían toxicidad lixiviable demostrable. El procedimiento de lavado preferido con cinco cambios de PBS demostró ser eficaz en la eliminación de cualquier toxicidad lixiviable residual a partir de matrices reticuladas. PBS era más eficaz que glicina 1 mM, pH 7,4.

10 Ejemplo 9: análisis de floculación que implica fibrinógeno

(a) Materiales usados

PBS (sin Ca/Mg) pH 7,4.

Solución salina tamponada con HEPES (HEPES 5 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4).

15 Disolución de fibrinógeno bovino al 10% (p/vol) en PBS (sin Ca/Mg) pH 7,4 (preparada disolviendo mediante mezclado suave y calentamiento hasta 37°C, pH corregido con NaOH 0,3 M, luego almacenado en hielo).

Disolución de alginato de sodio al 10% en PBS (sin Ca/Mg) pH 7,4 (preparada disolviendo suspensión espesa de ácido algínico mediante adición gota a gota de NaOH 10 M, luego 1 M).

Trombina humana 10 U/ml (Sigma) en M199/BSA al 0,1%.

Polietilenglicol al 20% (PM = 20.000 y 6.000; BDH) en PBS (sin Ca/Mg), pH 7,4.

20 Viastarch al 20% (Fresenius) en PBS (sin Ca/Mg), pH 7,4.

BSA al 20% (Sigma) en PBS (sin Ca/Mg), pH 7,4.

(b) Equipo usado

Espectrofotómetro.

Cubetas ópticas desechables (1 ml).

25 (c) Evaluación de coagulación o floculación de fibrinógeno

30 Se mezclaron fibrinógeno, PBS o solución salina de HEPES y alginato, PEG o Viastarch o trombina o cloruro de calcio a concentraciones deseadas hasta un volumen final de 1 ml en una cubeta, se mezclaron rápidamente mediante inversión cuidadosa usando Parafilm y se transfirieron al espectrofotómetro para leer la DO. Puesto que el alginato tiene un color significativo, se prepararon diluciones solamente de alginato a cada concentración de prueba como blancos de espectrofotómetro. Se realizaron experimentos de ejemplo a temperatura ambiente.

(d) Mediciones de velocidad

35 Para estudios de velocidad de reacción, se mezclaron 100 µl de alginato, 10 µl de trombina y un volumen apropiado de diluyente para proporcionar un volumen final de 1 ml en la cubeta. Para experimentos que implicaban adición de CaCl₂, se mezclaron 100 µl de fibrinógeno y 10 µl de CaCl₂ 1 M en un vial de 0,5 ml. A t=0, si pipeteó fibrinógeno en la cubeta de alginato/trombina, se mezcló rápidamente el tubo mediante inversión usando sellante de Parafilm y se colocó en el espectrofotómetro para una primera lectura a los 30 segundos. Se estudiaron tres cubetas en paralelo con este método.

40 Los resultados de floculación se muestran en las figuras 9 a 14. La figura 9 demuestra la floculación dependiente de la concentración de fibrinógeno al 1% mediante alginato al 1% o al 1,8%, que proporcionó una dispersión óptica similar a la coagulación inducida por trombina 0,2 U. El alginato al 0,2% no logró provocar turbidez medible. Las mediciones ópticas a 425 nm permitieron medir los efectos de la concentración de componentes diferentes sobre la precipitación de fibrinógeno. La tendencia inherente del fibrinógeno (pero no por ejemplo albúmina de suero) para flocularse o "pseudocoagularse" tiene posible utilidad en la formación de estructuras de soporte, o bien mediante métodos de aireación o de formación o bien mediante extrusión de fibra. La floculación y la coagulación se reflejan mediante la dispersión de la luz a lo largo del espectro de luz visible y pueden medirse de manera espectrofotométrica (tal como en la figura 9). La tasa de floculación a temperatura ambiente es rápida y es esencialmente completa tras varios segundos de mezclado vigoroso.

La figura 10 demuestra adicionalmente la floculación dependiente de la concentración de fibrinógeno al 0,5%, 1% y al 2% con alginato a lo largo del intervalo del 0,1-9%, en diluyente de PBS. Esta figura también muestra que el

5 polietilenglicol 20000 (PEG) y el hidroxietil-almidón (Viastarch, VS) provocan floculación similar. Este efecto es específico para fibrinógeno puesto que BSA a concentraciones de hasta el 10% no se floculó por alginato al 4%, PEG al 5-10% o Viastarch al 5%. La reacción de floculación depende claramente de la concentración de alginato y fibrinógeno, pero no en una relación recíproca directa. Las curvas de dependencia de la concentración en la figura 10 muestran un alginato umbral para la floculación y una disminución en el alginato requerido para la floculación máxima con concentraciones de fibrinógeno superiores.

10 La figura 11 demuestra que el sistema de tampón para la mezcla de fibrinógeno/alginato tiene una influencia significativa sobre el grado de floculación espontánea, mostrado para fibrinógeno al 1% mezclado con alginato al 1% en tampón isoosmótico a pH 7,4. La solución salina tamponada con fosfato dio como resultado mayor floculación que HEPES. Por tanto, la floculación en alginato se ve influida por la composición de tampón. Por ejemplo, el uso de solución salina de HEPES como diluyente en lugar de PBS proporcionó una floculación reducida en la figura 11.

15 La figura 12 demuestra que los iones de calcio modulaban la floculación de alginato de fibrinógeno al 1%. Las concentraciones de calcio suficientes para inducir aumento de la viscosidad y gelificación de alginato (<10 mM) redujeron la densidad de floculación. Por tanto, es probable que el efecto del calcio en el control de la floculación y coagulación enzimática proporcione un medio útil de control de la deposición de fibrina. La adición de calcio a mezclas de fibrinógeno/alginato puede modular la floculación espontánea, tal como se muestra a modo de ejemplo en la figura 12. Los iones de calcio aumentaron la tasa de coagulación por trombina y la densidad de coágulo, en ausencia de alginato. En cambio, los iones de calcio con alginato atenúan la tasa de formación de coágulo, mostrado a modo de ejemplo en la figura 13.

20 La figura 13 demuestra que alginato al 1% aumentó la tasa de coagulación de fibrinógeno al 1% catalizada por trombina 0,1 U/ml y la densidad de coágulo, pero la adición de Ca^{2+} 10 mM a alginato atenúa el aumento de la tasa, sin afectar a la densidad final. La misma concentración de calcio aumentó la tasa y densidad de coagulación por trombina de fibrinógeno en ausencia de alginato, pero en un grado inferior. Por tanto, parece que el alginato acelera la coagulación por trombina y da como resultado la formación de un coágulo más denso. Parece que el procedimiento de coagulación enzimático compite con el procedimiento de floculación, dando como resultado una formación progresiva de un coágulo en vez de flóculo instantáneo, tal como se muestra en la figura 13. La trombina añadida a un flóculo dio como resultado su coagulación.

Ejemplo 10: estudios de optimización de reticulación

(a) Materiales usados

30 Fibrinógeno bovino al 2% (fracción 1 de plasma bovino tipo IV) (F4753, Sigma, St Louis, EE.UU.) en H_2O (preparado disolviendo en H_2O e incubando a 40°C durante 1 h).

Gelatina al 2% (piel bovina, 225 Bloom, tipo B, Sigma) en H_2O (preparada disolviendo en H_2O e incubando a 70°C durante 1 h).

Disolución de glutaraldehído al 25% (grado II G62517 Sigma).

35 Borohidruro de sodio (Sigma)

Ácido morfolinoetanosulfónico (MES) (Sigma) tampón 100 mM pH 7,4

Etanol (Hayman Ltd, Witham, R.U.)

Ácido clorhídrico (BDH)

Ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (Sigma)

40 Tripsina 25 mg/ml (páncreas bovino) en PBS (Invitrogen)

Ensayo de proteína BCA™ (Pierce)

Fenol (Sigma)

Ácido perclórico al 70%

(b) Equipo usado

45 Pesasustancias cuadrados de plástico (35 x 35 x 9 mm)

Bloque térmico seco (Techne Dri-Block DB 3D)

Espectrómetro UV-Vis (Camspec M330)

Lector de microplacas (Biorad)

Calorímetro diferencial de barrido (TA, 1000)

Espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier (Shimadzu 8400s)

(c) Preparación de película de proteína reticulada

5 Se colaron lotes de 2 ml de fibrinógeno al 2% o gelatina al 2% en pesasustancias cuadrados de plástico (35 x 35 x 9 mm). Se obtuvo una película tras secado con aire durante la noche en una campana extractora. El contenido de proteína en una película es aproximadamente de 26 mg para fibrinógeno y de 40 mg para gelatina. Se llevó a cabo la reacción de reticulación con glutaraldehído en tampón MES 100 mM pH 7,4/etanol al 80%/H₂O al 20% (v/v) (a menos que se especifique). Se diluyó una disolución de glutaraldehído comercial al 25% (p/p) en el tampón a las concentraciones en serie del 0,05%, 1%, 2%, 4%, 8%, 1%, 3%, 5% (v/v). Se usaron 2 ml de disolución de reticulación en un pesasustancias para una película. Se llevó a cabo la reacción en el pesasustancias, cubierto, con agitación constante a 23°C durante 4 horas (a menos que se especifique).

Se lavaron meticulosamente las películas en 15 ml de H₂O durante 5 min., 10 veces; o se lavaron en 15 ml de disolución acuosa de NaBH₄ al 0,1% durante 5 min., 5 veces, seguido por lavado con 15 ml de H₂O durante 5 min., 5 veces. Entonces se secaron las películas con aire durante la noche en una campana extractora.

15 (d) Caracterización de película

(i) Medición de hidrólisis ácida y base de Schiff

20 Se añadieron aproximadamente 5 mg de película y 1 ml de HCl 6 N en un microtubo de polipropileno de 1,5 ml con tapón roscado y se selló de manera ajustada. Se llevó a cabo la hidrólisis ácida en un bloque térmico a 110°C durante 24 horas. Tras mezclar con formación de vórtex, se diluyó la disolución de hidrolizado 10 veces con dH₂O y luego se realizó un barrido a lo largo del rango UV completo mediante un espectrómetro UV-Vis, midiéndose específicamente la absorbancia a 265 nm como la concentración de base de Schiff. Se analizó cada muestra de película al menos por triplicado, con un control con blanco. Se expresaron los resultados como la media con desviación estándar de valores por triplicado tras restar el blanco.

(ii) Hinchamiento en equilibrio

25 Se hincharon aproximadamente 15 mg de película reticulada en 50 ml de dH₂O sin agitación. Se midió el aumento de peso tras secar el agua de la superficie con pañuelo. La mayor parte del hinchamiento de película alcanza el equilibrio en 24 h, mientras que en el caso de películas no reticuladas se disuelve gradualmente en 30 min. Se calculó la razón de hinchamiento como: $E = (W_e - W_0) / W_0 \times 100$.

Se expresaron los resultados como el valor medio y la desviación estándar para ensayos por triplicado.

30 (iii) Determinación del contenido de ε-NH₂ mediante el método TNBS

35 Se determinó el contenido de grupo amina primaria (residuos de lisina) de películas de fibrinógeno usando ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS) mediante un método modificado a partir de la bibliografía. A una muestra de película de fibrinógeno pesada (aproximadamente 3 mg), se le añadió 1,0 ml de una disolución de NaHCO₃ al 4% (pH 9,0) en tubos de vidrio Pyrex de 20 ml con un tapón roscado (inserto de PTFE/caucho). Tras 10 min. de hinchamiento a 40°C en un baño de agua, se añadió 1,0 ml de una disolución de TNBS al 0,5% recién preparada (p/v) en agua destilada. Tras hacer reaccionar durante 4 horas a 40°C, se añadieron 3,0 ml de HCl 12 N y se elevó la temperatura hasta 110°C. Se logró la solubilización de fibrinógeno en un plazo de 1 hora, pero se continuó con la digestión durante 15 horas. Se diluyó la disolución resultante con 5,0 ml de dH₂O. Entonces se extrajo la disolución de hidrolizado con tres partes de 20 ml de etil éter anhídrido para eliminar el TNBS sin reaccionar en exceso y los productos del grupo TNP-α-amino. Se procesaron todos los extractos mediante agitación con vórtex durante 1 min. y se dejaron reposar durante 15 min. para permitir la separación de fases. Se puso una alícuota de 200 μl de la fase acuosa en la campana extractora durante 20 min. para evaporar el éter residual y se diluyó con 600 μl de H₂O. Se midió la absorbancia a 346 nm mediante el espectrómetro UV-Vis. Se preparó un control aplicando el mismo procedimiento con material de proteína de blanco. Se procesaron todas las muestras mediante cuatro repeticiones y se expresaron las lecturas de absorbancia tras la resta del blanco. Se calculó el contenido del grupo amina mediante:

$$\text{Moles de Lis/moles de proteína} = 2 (\text{Abs}) \times (0,02 \text{ l}) \times \text{Mw} / (1,46 \times 10^4 \text{ l/mol.cm}) \times 1 \text{ cm} \times x$$

Donde Mw es el peso molecular de la proteína con la unidad de g/mol (340 k para fibrinógeno); 1,46*10⁴ l/mol.cm es la absorción molar de TNP-lis; x es el peso de la muestra en g.

50 Además, se expresó la proporción de grupo amino relativa como:

$$R_{\text{NH}_2} = (\text{moles de Lis/moles de Fbg modificado}) / (\text{moles de Lis/moles de Fbg}) \times 100$$

(iv) Degradación de tripsina

Se realizó la degradación de muestras de fibrinógeno usando diluciones de patrón 25 mg/ml en PBS-tripsina de páncreas bovino. Se llevó a cabo la digestión en solución salina de PBS pH 7,6, aproximadamente 5 mg de fibrinógeno por ml de disolución de enzima en incubador a 37°C. Se usaron tres proporciones de enzima:proteína, 1:100, 1:50, 1:20. Se monitorizó el procedimiento de degradación midiendo la concentración de proteína en el sobrenadante mediante ensayo de BCA convencional (Pierce, método de microplaca). En cada punto de tiempo de 24 h, se extrajeron alícuotas de 25 µl (por duplicado) de cada muestra para cuantificar la digestión de proteína y se reabastecieron las muestras con 50 µl de enzima nueva (misma concentración) manteniendo el volumen constante. Se llevó a cabo la digestión enzimática durante 2 semanas. Se expresaron los resultados como la razón de degradación, que se calcula como:

$$(W_{\text{Proteína en sobrenadante}}) / (W_{\text{Proteína en total}}) \times 100$$

El método sigue el protocolo de producto. Para la calibración con BCA, se usó fibrinógeno en vez de BSA como patrón. Se mezclaron 25 µl de disolución de proteína con 200 µl de disolución de trabajo de BCA. Tras la incubación a 37°C durante 30 min., se leyó la absorbancia a 540 nm mediante lector de microplaca y se calculó la concentración de proteína a partir de la curva patrón. El intervalo de trabajo es de desde 20-2000 µg/ml.

15 (v) Medición de temperatura de desnaturalización mediante DSC

Se observó el efecto de reticulación sobre el fenómeno de desnaturalización hidrotérmica de película de fibrinógeno mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) (TA, 1000). Se calibró el equipo con indio y galio. Se sellaron 3 mg de película hidratada en equilibrio en una bandeja de aluminio, con una bandeja vacía como referencia. Se usó la velocidad de calentamiento de 5°C/min. y se eligió un intervalo de temperatura de entre 30 y 100°C. Se registró la temperatura pico como la temperatura de desnaturalización.

20

(vi) Espectro de barrido de ATR/FT-IR

Se observaron los cambios de componentes químicos de la película aplicando un instrumento Shimadzu FTIR 8400s mediante el modo de atenuación de reflectancia total. El intervalo de barrido fue de desde 4000 hasta 600 cm⁻¹, con un número de barridos de 64 y una resolución de 4 [cm⁻¹]. Se editaron los datos mediante el software Origin.

25 (e) Reticulación de fibrinógeno

Antes de la reticulación, la película de fibrinógeno es de aspecto blanco opaco, y con reticulación con glutaraldehído cambia de color, oscilando entre amarillo pálido y naranja claro. El cambio de color aumenta con la concentración de glutaraldehído aplicado, hasta el 1%, pero permaneció igual con más glutaraldehído. En cambio, el material colagenoso tal como piel bovina en polvo o gelatina se vuelve de un color de amarillo a marrón (en vez de naranja) a lo largo del mismo intervalo de concentración de glutaraldehído. La diferencia en el intervalo de color puede deberse a la composición aromática relativamente alta de fibrinógeno en comparación con gelatina, suponiendo que estos residuos también reaccionan con glutaraldehído además de lisina. La reducción con NaBH₄ reduce significativamente el color de la película de fibrinógeno, de blanco a naranja claro, e incluso más pálido para la película de gelatina. Como observación general, el fibrinógeno mostró resistencia mecánica superior a la gelatina.

30

35 Tabla 2: peso de película de fibrinógeno reticulado con GTA

Fibrinógeno						
Con. de GTA / %	GTA:proteína (p/p / %)	Peso / mg	DE*	Aumento de peso / mg	Aumento de peso / %	Peso de película reducido
0	0	26,0	±0	0	0	
0,05	4	26,4	±1,0	0,4	1,5	28,3
0,1	8	29,7	±1,0	3,7	14,2	29,9
0,2	15	30,2	±0,9	4,2	16,1	29,9
0,4	31	30,5	±0,6	4,5	17,3	32,2
0,8	62	33,1	±2,0	7,1	27,3	32,2
1	77	31,9	±0,9	5,9	22,7	31,3
3	231	31,6	±0,3	5,6	21,5	31,2
5	385	30,8	±1,2	4,8	18,4	31,2

* basándose en tres experimentos diferentes

Tabla 3: peso de película de gelatina reticulada con GTA

Gelatina						
Con. de GTA / %	GTA:proteína (p/p / %)	Peso / mg	DE*	Aumento de peso / mg	Aumento de peso / %	Peso de película reducido
0	0	40	±0	0	0	-
0,05	2,5	38,4	±0,2	-1,7	-4,3	40
0,1	5	40,6	±1,1	0,6	1,5	41,5

0,2	10	40,7	±1,6	0,7	1,8	42,2
0,4	20	41,7	±0,9	1,7	4,2	43,1
0,8	40	41,8	±0,4	1,8	4,5	41,1
1	50	42,3	±0,3	2,3	5,8	40,4
3	150	42,5	±0,3	2,5	6,2	41,2
5	250	41,6	±1,9	1,6	4	41,9

* basándose en dos experimentos diferentes

La relación de concentración de GTA usada con respecto a la ganancia de masa es bifásica, con incremento de masa hasta un valor de GTA óptimo (el 0,8% para Fbg, el 3% para gelatina). Más allá de esto, existe progresivamente menos aumento de masa de modo que, incluso con un gran exceso p/p de GTA (por ejemplo GTA al 5% era 3,85 veces la masa de Fbg). Esta ganancia de peso refleja hasta cierto grado cuánto GTA se incorpora al polímero de proteína; sin embargo, también hay algo de pérdida de material de proteína en tampón de reticulación y mediante lavado exhaustivo (que se ha observado con coloración con reactivo de BCA). Por tanto la masa neta es el efecto resultante de dos factores en oposición: la incorporación de GTA y la liberación de proteína. Se espera que la pérdida de proteína por lixiviación sea superior con reticulación baja, y también a concentraciones de GTA muy altas, debido a modificación de un único punto aumentada en vez de reticulación y estabilización de la molécula. La comparación de los datos de Fbg y de gelatina muestra diferencias en el comportamiento. A la misma concentración de GTA, el Fbg muestra mayor ganancia de peso proporcional que la gelatina, y la ganancia proporcional máxima de Fbg es más de 4 veces la de gelatina. La razón principal puede ser una abundancia relativa de residuos reactivos (figura 14) pero Fbg puede formar más reticulaciones intermoleculares en la superficie molecular de la proteína que la gelatina (debido a impedimento estérico intramolecular). El tratamiento de películas de GTA con reducción con NaBH₄ tiene un efecto muy pequeño sobre el peso de la película, lo que indica que no provoca una gran alteración de la estructura de proteína reticulada.

(f) Mediciones de base de Schiff

El líquido de digestión ácida de Fbg tratado con GTA era de un color marrón oscuro cuya intensidad dependía de la concentración de GTA. Esto era distinto del del colágeno o la gelatina, que es amarillo claro. Se observó la absorbancia UV a 265 nm de base de Schiff característica se observó con muestras de Fbg tratado con GTA, y también se relacionó con la concentración de GTA (figura 15). Esto se observó aunque el hidrolizado de Fbg no reticulado tiene una absorbancia relativamente fuerte a lo largo todo el rango UV, reflejando probablemente su alta proporción de aminoácidos aromáticos (figura 15A). Aun así, la absorbancia tras la deducción de la absorbancia de fondo de muestras de Fbg sin tratar podía considerarse como una medida sensible del nivel de base de Schiff y por tanto un índice de densidad de reticulación con GTA en fibrinógeno reticulado. Como comparación, el pico a 265 nm también se produce en el espectro de colágeno reticulado, y la absorbancia para colágeno sin tratar es bastante baja (figura 15B). Dado que está correlacionado con la captación de GTA, puede considerarse una medida sensible del nivel de base de Schiff y por tanto un índice de densidad de reticulación con GTA en fibrinógeno reticulado. Como comparación, el pico a 265 nm también se produce en el espectro de colágeno reticulado y la absorbancia para colágeno sin tratar es relativamente baja (figura 15B). Debe observarse que el alto fondo afecta a una medición absoluta de la incorporación de GTA en Fbg mediante este método. Además, deducir la captación mediante la medición de residuo de GTA libre que permanece en el líquido de reticulación usado es propenso a errores, puesto que la proteína lixiviada de la película reacciona con GTA libre. La relación entre la captación de GTA y la densidad de reticulación es compleja, porque no todos los grupos aldehído reaccionan con residuos de lisina de la proteína. La figura 15 también ilustra que el tratamiento de reducción con NaBH₄ redujo significativamente la absorbancia (aproximadamente el 30%) y el color de la película, afectando tanto al doble enlace como al grupo aldehído libre, funcionando para estabilizar adicionalmente la estructura.

El contenido en base de Schiff de las películas de Fbg aumenta con la concentración de GTA en una relación aproximadamente exponencial (figura 16A), dando una curva sigmoidea sobre una escala de log[GTA] (figura 16B) y una meseta por encima de GTA al 1%. Estos datos coinciden ampliamente con los datos previos que muestran aumento del peso máximo con GTA al 0,8%. A la concentración del 1%, la razón en masa de GTA con respecto a Fbg es de 0,769, siendo la razón molar equivalente de 6579, da una estimación de que la densidad de reticulación máxima es en promedio de hasta 23 moléculas de GTA (polímero de GTA) por residuo de lisina (284 lis/molécula de Fbg). Sin embargo, en realidad algunos residuos de Lis pueden estar estéricamente protegidos de GTA. Si se supone un promedio de grado de polimerización de GTA de 5, en la condición de GTA al 0,05% la lisina que reacciona puede ser del 20% del total, tal como se observa en la tabla 4.

Tabla 4: Cálculo teórico de la razón de GTA:Fbg y proporción de lisina que reacciona.

Con. de GTA / %	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	1	3	5
GTA/Fbg (p/p)	0,038	0,077	0,154	0,308	0,615	0,769	2,207	3,845
GTA/Fbg (Mol/Mol)	329	658	1316	2632	5263	6579	-	-
GTA/Lys (Mol/Mol)	1	2	5	10	19	23	-	-
Proporción de lisina que reacciona	20%	40%	100%	-	-	-	-	-

(g) Razón de hinchamiento en equilibrio

La razón de hinchamiento en equilibrio no sólo es una medida del grado de reticulación sino también un indicador de la estabilidad mecánica del biomaterial en el estado hidratado (fisiológico). La disminución de la razón de hinchamiento para los polímeros se debe normalmente a dos consecuencias de reticulación: en primer lugar, los enlaces introducidos en la molécula del polímero de tipo inter o intramolecular para formar agregación molecular y red supramolecular; en segundo lugar, las reacciones pueden implicar la conversión de un residuo polar (por ejemplo lisina) en un aducto menos polar (por ejemplo base de Schiff de GTA), dando así una pérdida neta de grupos hidrófilo, y adición de carácter hidrófobo a partir del agente de reticulación (por ejemplo en el caso de GTA, se confiere hidrofobicidad adicional mediante la "estructura principal" reticulada de di-dieno conjugado y polimerizado).

La concentración de GTA de reticulación afectó a la razón de hinchamiento de las películas de Fbg resultantes en una relación de tipo de degradación aproximadamente exponencial (figura 17), que alcanza una meseta de razón de hinchamiento baja del 47% por encima de GTA al 1%. Entre el 0,05% y el 1%, la razón de hinchamiento disminuye rápidamente con el incremento de la concentración de agente de reticulación, por ejemplo con GTA al 0,05% la película ganó una estabilidad significativa como hinchamiento de aproximadamente el 90%. Por el contrario, la película de Fbg sin tratar se disuelve rápidamente en agua. Esta relación coincide ampliamente con los datos de base de Schiff (ejemplo 10(f)); sin embargo, la razón de hinchamiento aumenta muy ligeramente a partir de GTA al 1-5%, lo que puede deberse a aumento de reacciones con GTA de un único punto, como se sugiere por los datos de cambio de peso bifásicos. No se ha medido el cambio en hidrofobicidad, pero las películas reticuladas muestran una humectabilidad de superficie relativamente hidrófoba.

20 (h) Contenido de ϵ -NH₂

Esta investigación demostró una pérdida de ϵ -amina libre en películas de Fbg dependiente de la concentración de reticulación con GTA. La relación, a lo largo del intervalo estudiado, coincide con las mediciones de la densidad de base de Schiff y el hinchamiento en equilibrio (figura 18). La concentración de GTA crítica para una reacción máxima con lisina es de entre el 0,8%-1%, cuando la conversión de la lisina alcanzó el 90%, por encima de lo cual hay una meseta de aproximadamente el 10% de lisina que no reacciona. Se produce una pérdida significativa de ϵ -amina libre a una concentración de GTA muy baja. Incluso al 0,05%, la concentración más baja estudiada, el 20% de lisina reaccionó, y con GTA al 0,1%, hay una pérdida del 40%. Estos datos están de acuerdo con la predicción en la tabla 4 derivada de mediciones de base de Schiff.

(i) Degradación de tripsina

La degradación con tripsina de películas de Fbg con diferente concentración de GTA se muestra en la figura 19. Las condiciones fueron: concentración de tripsina de 0,25 mg/ml en tampón PBS pH 7,6, enzima: película de Fbg 1:20 (p/p), digestión de 24 horas a 37°C, y se midió el péptido soluble mediante el método de BCA. La película menos reticulada (GTA al 0,05%) se disolvió casi completamente en 24 horas dando un baño de digestión turbio de color amarillo. Se encontró que los productos de degradación de péptido solubles eran del 28% de la masa total. La muestra de GTA al 0,1% se disolvió parcialmente con una pérdida de peso del 14% recuperado en disolución; se observó que la película tratada con GTA al 0,2% se hinchó y perdió el 2% del peso. Las películas tratadas con concentración más alta de GTA (del 0,8% al 1%) fueron relativamente estables, conservando su forma, y casi sin pérdida de peso, manteniéndose transparente la disolución de remojo. Sin embargo, para muestras de GTA al 3% y al 5% se detectó una pequeña cantidad de lixiviación de proteína con una pérdida de peso del 0,5%, que concuerda con el resultado del hinchamiento en equilibrio (figura 17).

Estos datos indican que GTA al 1% da la mayor estabilización de Fbg, dando más GTA ligeramente menos estabilidad. Aunque se muestran a las 24 horas, con incubaciones más largas, a lo largo de varios días, se obtiene como resultado más degradación de matrices reticuladas al 3 y al 5%. Los sitios de escisión de tripsina en el sustrato de proteína están en residuos de aminoácidos básicos tales como lisina, que son los sitios de reacción de GTA. Por lo tanto se esperaría que la resistencia a la tripsina siguiera el número de residuos de lisina libre en la proteína reticulada. La determinación del grupo épsilon-amino primario muestra una disminución similar pero ligera, para GTA al 1%, al 3% y al 5%, se podría predecir que la resistencia a la tripsina aumentaría gradualmente a lo largo del mismo intervalo. Pueden proponerse que tres factores contribuyen a la resistencia relacionada con la reticulación frente a la proteólisis enzimática: en primer lugar, la modificación de reticulación provoca pérdida de sitios de escisión y reconocimiento enzimáticos; en segundo lugar, la reticulación provoca impedimento estérico protegiendo y bloqueando el acceso enzimático a sitios de escisión específicos, en tercer lugar, la proporción de reacción de un único punto con respecto a reticulada del reactivo de reticulación. Los resultados sugieren que concentraciones crecientes de GTA por encima del 1% provocan un ligero cambio en el modo de reacción de GTA con proteína, hacia un aumento en la modificación de un único punto, que implica proporciones similares de residuos de lisina que reacciona pero menos impedimento para el ataque enzimático. Por debajo del 1%, la reticulación intramolecular multipunto es el modo de reacción dominante pero para el 0,05%-0,1%, se cree que predomina la reticulación intermolecular. Además, tal como se observa en la figura 19, la estabilidad frente a degradación enzimática del material de fibrinógeno puede controlarse ajustando la densidad de la reticulación a lo largo del intervalo de GTA al 0,05%-1%.

La figura 19 también ilustra que el efecto de la reducción con NaBH₄ es aumentar la cantidad de degradación de

tripsina en casi un 50%, a todas las concentraciones de GTA. Esto puede explicarse mediante el efecto de la reducción sobre las estructuras reticuladas con GTA polimérico si el grupo aldehído libre y la base de Schiff conjugada y el di-dieno α,β -insaturado polimerizado son más resistentes a la digestión enzimática que la estructura saturada en películas reducidas.

5 (j) Determinación de la temperatura de desnaturalización térmica mediante calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) ha demostrado ser un enfoque útil y potente para caracterizar cambios de conformación inducidos por temperatura de macromoléculas biológicas. Para el material de colágeno, la reticulación provoca un gran desplazamiento de la temperatura de desnaturalización (T_d) relacionado con el grado de reticulación y coincide con el contenido de amina primaria y la determinación de estabilidad frente a degradación enzimática. El colágeno de piel bovina sin tratar tiene una T_d de 64°C, y la reticulación con GTA máxima puede aumentar la T_d hasta 85°C. Esta transición de desnaturalización es irreversible y endotérmica, debido a la "fusión" o deformación de triple hélice de la molécula de colágeno.

Algunos investigadores también han investigado los cambios conformacionales térmicos de fibrinógeno mediante DSC para estudiar la estructura de la proteína, pero no los efectos de reticulación. A diferencia del colágeno, el fibrinógeno muestra dos fases distintas de desnaturalización, un pico endotérmico a 61°C del dominio D y un pico a 100°C del dominio E. También se notificó que una transición débil y amplia a 78°C se atribuía a las partes C-terminales de cadenas $A\alpha$ de Fbg. El espectro de DSC obtenido a partir de películas de Fbg reticulado a lo largo de un intervalo de GTA se muestra en la figura 20. Sólo el Fbg muy poco reticulado (0,05%) muestra un pico de transición característico, claro. El pico a 61°C está casi ausente pero los otros dos permanecen. Esta curva sugiere que a una baja concentración de GTA reacciona más con dos dominios D en vez del dominio E central. Sin embargo, el pequeño aumento con GTA a desde el 0,05% hasta el 0,1% o al 0,4% también provoca que ambos picos a alta temperatura casi desaparezcan, dejando pendientes parcialmente inestables. Con GTA al 1%, la curva es incluso más plana con un área endotérmica muy débil y amplia que corresponde a la desnaturalización del dominio E, lo que indica más estabilidad o rigidez de la estructura de Fbg completa introducida mediante reticulación con GTA. A diferencia del colágeno, estos resultados no muestran una relación progresiva entre la concentración de GTA y el desplazamiento del pico de desnaturalización, pero sí sugieren alguna susceptibilidad preferible de los dominios D para GTA.

(k) Optimización de la reticulación con fibrinógeno mediante glutaraldehído

(i) Proporción de GTA

30 Las investigaciones han hallado que la cantidad de GTA es más importante que la propia concentración, y por tanto el volumen de disolución de reacción debe determinarse en la práctica. En los resultados y comentarios anteriores, la concentración de GTA que logra la mayor estabilización en el modelo es del 1%, cuando se aplican 2 ml de tampón de reticulación a 26 mg de Fbg, dando una razón de GTA:Fbg que es de 0,77:1 (p/p) o 6579:1 (molar:molar).

Se evaluó el efecto de la concentración usada para aplicar las mismas proporciones en cantidad de GTA, sobre la densidad de reticulación de Fbg resultante (figura 21). Cuatro concentraciones aplicadas (0,2%, 0,25%, 0,5%, 1%) dieron una ligera variación en las densidades de reticulación tanto para Fbg como para gelatina pero sólo de menor importancia. Los resultados mostraron que 2 ml de GTA al 1% dieron una densidad de reticulación similar a 10 ml de GTA al 0,2%. La densidad de reticulación ligeramente superior dada por GTA al 0,25% o al 0,5% puede deberse a una penetración y reacción más uniforme en la matriz de película; la baja concentración de reactivo de la disolución al 0,2% podía haber reducido el equilibrio de captación por la película de proteína del medio de reacción. Las pequeñas variaciones podían por tanto reflejar algunos efectos cinéticos dependientes de la concentración de GTA, pero la similitud sustancial en la reticulación sugiere que es sustancialmente completa a lo largo de 24 horas.

(ii) Tiempo de reacción de reticulación

45 Se observó que la densidad de reticulación, caracterizada por la formación de base de Schiff, aumentó con el tiempo, tal como se muestra en la figura 22. La reacción alcanza una finalización sustancial a las 4 horas con poco aumento adicional a las 24 horas. Esto va en contra de las observaciones publicadas para la reticulación con GTA-colágeno monitorizada mediante el aumento de T_d , que muestra que se produce una reacción máxima entre unos pocos minutos y ½ hora a TA y pH neutro en un medio acuoso. Sin embargo, debe observarse que este estudio se realiza en tampón acuoso de etanol al 80%, y el disolvente orgánico ciertamente ralentizará la reacción.

50 (iii) pH de reticulación

El efecto del pH de los medios de reacción sobre la formación de base de Schiff se muestra en la figura 23. Las películas obtenidas a diferente pH mostraron una variación en la intensidad del color amarillo, que se oscurece con pH creciente. En consecuencia, la concentración de base de Schiff en condiciones ácidas (pH 3,5) es muy baja pero sustancialmente superior a pH 4,5. Hubo poco aumento entre pH 4,5-pH 6,5, pero un aumento adicional a de pH 7,4 a pH 8,5. Los resultados coinciden con el mecanismo de reacción dependiente de pH y la estructura de GTA descrito anteriormente en el presente documento. A condiciones neutras o ligeramente alcalinas, la base de Schiff conjugada es el producto dominante de la reacción de GTA-proteína, que es estable frente a digestión ácida. A pH bajo de 3,5,

este es un producto secundario, y otras estructuras no son estables en medio ácido. La densidad de reticulación más baja a de pH 4,5 a pH 6,5 también puede reflejar el pl de Fbg, que es de aproximadamente pH 5,5-5,8, lo que puede influir sobre el acceso de GTA.

(iv) Reticulación media

- 5 Se han estudiado tanto el tampón acuoso como de etanol/H₂O (80:20 v/v) MES 0,1 M pH 7,4 en los experimentos de optimización descritos anteriormente en el presente documento. Los medios acuosos dieron una densidad de reticulación y velocidad de reacción superiores a los medios etanólicos. Tal como se observa en la figura 24, en medio acuoso la reacción alcanza la finalización en ½ hora, y la densidad de reticulación es aproximadamente 1,4 veces la de los medios etanólicos. Aunque la reacción en el tampón etanólico alcanza la finalización en 24 horas, el grado total de la reacción es ligeramente inferior al del sistema de H₂O.

(I) Optimización de la reducción con borohidruro de sodio para fibrinógeno reticulado con glutaraldehído

- 15 El agente reductor NaBH₄ reacciona tanto con enlaces carbonilo como con dobles enlaces, convirtiendo así los grupos aldehído y la base de Schiff conjugada en estructuras saturadas. La reticulación con GTA se beneficiaría de este tratamiento posterior tanto por estabilización de estructuras como por extinción de los grupos reactivos (detoxificación). La figura 25 muestra la determinación de base de Schiff para Fbg y gelatina reticulados con diferentes concentraciones de GTA y después reducidos. El nivel de base de Schiff para Fbg es más de dos veces el de gelatina, y el nivel máximo para ambas proteínas es próximo al 1%. Las curvas de proteína reducida tienen una tendencia similar. Para Fbg densamente reticulado, el tratamiento de reducción reduce el 50% de base de Schiff y para la gelatina, sólo aproximadamente el 30%. A menor reticulación (desde el 0,05%-1%), la reducción de base de Schiff es proporcional a la concentración de GTA para Fbg, pero para la gelatina es constante. Los resultados muestran que para ambas proteínas, el tratamiento con NaBH₄ sólo elimina hasta el 50% de bases de Schiff detectables en la proteína reticulada. Esto sugiere que las estructuras de base de Schiff restantes pueden estar estéricamente protegidas por la molécula de proteína, planteando la pregunta de si puede lograrse una extinción adicional mediante reducción potenciada.

- 25 Se han investigado diferentes concentraciones de NaBH₄, o duración del tiempo de reducción, en el estudio basándose en la muestra reticulada con GTA óptima (GTA al 1%, reticulada durante 4 horas, pH 7,4, TA). Los resultados se muestran en la figura 26. Para 15 ml X 5 min. X 5 lavados de reducción, NaBH₄ 1 mg/ml cortó eficazmente la lectura de base de Schiff mientras que una concentración doble de NaBH₄ a 2 mg/ml solo disminuye ligeramente de manera adicional la lectura de base de Schiff; aumentando la concentración 3 ó 4 veces todavía se mantiene al mismo nivel. Tiempos de lavado mayores, también sometidos a prueba, no logran alcanzar una reducción adicional de base de Schiff, y muestran que la reacción que puede alcanzarse se termina en 5 minutos.

- 35 Se observó que la resistencia mecánica de películas de proteína reticulada se debilitaba durante el procedimiento de reducción. Tal como se observa en el ejemplo 10 (i) la estabilidad frente a la degradación enzimática también disminuye ligeramente en comparación con los equivalentes no reducidos. También se demuestra un efecto sobre la estructura de la proteína por resultados de DSC (figura 27) y FT-IR (figura 28).

- 40 Tal como se observa en la figura 27, la estabilidad hidrotérmica proporcionada por la reticulación con GTA al 1% a la conformación de Fbg se suprime en su mayor parte mediante la reducción con NaBH₄ 1 mg/ml. El pico a 55°C que se atribuye a la transición del dominio D de Fbg ha vuelto a aparecer; además, la absorción endotérmica vuelve hasta 100°C. Este resultado es indicativo del restablecimiento de flexibilidad y movilidad en los dominios D, lo que podía deberse a la conversión de estructuras basadas en alqueno rígido o base de Schiff conjugada (C=C y C=N) en estructura principal de alcano flexible y saturado (C-C y C-N).

- 45 El espectro infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) de la película reducida en comparación con la no reducida muestra una absorbancia más débil a lo largo del intervalo de 1655-800 cm⁻¹ (figura 28). Los espectros IR de la base de Schiff presentan una banda que corresponde a un enlace C=C a 1650-1655 cm⁻¹, y una banda del enlace C=C en la región de 1610-1620 cm⁻¹. La reducción con NaBH₄ muestra que ambas bandas se han reducido. Se ha demostrado que la reducción del enlace C=N con NaBH₄ elimina la banda de adsorción de imina a 1650 usando compuestos de modelo (aminoácido-malonaldehído). Aunque no hay una señal fuerte para la banda del grupo carbonilo del aldehído a 1700 cm⁻¹ (quizá debido a un solapamiento con C=O o C=N), se ha empleado NaBH₄ como reductor primario en síntesis orgánica para la conversión de aldehídos en alcohol. Los picos a 1655, 1546, 1458 cm⁻¹ atribuidos a la banda de amida (carbonilo C=O unido con N), existen normalmente en péptidos. Los espectros también pueden indicar que hay posibilidad de reducción en el carbonilo del péptido. Ya que una reducción más potente probablemente daña la integridad de la estructura primaria de la proteína y su estabilidad material, es preferible una concentración de 1 mg/ml o 2 mg/ml.

Ejemplo 11: análisis SEM del soporte de fibrina/alginate

- 55 Se reticuló una composición que comprendía Fbg al 1%/trombina/alginate al 1%/espuma de CaCl₂ 50 mM con GTA al 0,2% en EtOH al 80%/MES al 20% pH 7,4 durante 4 horas, se lavó 5 veces, se liofilizó y se preparó para SEM. Se cortó un bloque de 0,5 x 1 cm y se montó en la cinta de laboratorio como refuerzo. Se cubrió el material mediante pulverización con oro a vacío y se examinó mediante SEM. Los resultados del SEM se muestran en la figura 29 en la

que se observó que una estructura fina del material consistía en una matriz lamelar de filamentos densamente empaquetados orientados al azar.

5 Los resultados estructurales indican que el procedimiento de fabricación ha permitido que el fibrinógeno forme una red coagulada de fibras y se estabiliza mediante alginato durante el procedimiento de reticulación y de reducción con retención de porosidad adecuada de macroescala (100-200 nm) y microescala (1-10 μm). Esto ilustra la viabilidad del procedimiento para formar un soporte de ingeniería de tejidos.

Ejemplo 12: análisis citotóxico de los componentes del soporte

Se usó el ensayo MTS tal como se describió anteriormente en el presente documento con ciertas modificaciones.

10 En primer lugar, se usaron dos modalidades, (i) citotoxicidad aguda y (ii) efecto sobre la proliferación a lo largo de 3 días.

En el día -1, se sembraron fibroblastos dérmicos humanos para (i) a alta densidad (5×10^5 /pocillo) y para (ii) a baja densidad ($2,5 \times 10^4$ /pocillo).

15 En el día 0, se lavaron los cultivos en PBS/g y se expusieron al agente de prueba diluido en PBS/g a menos que se indique lo contrario, durante un período de prueba (1-4 h). Entonces se retiró el agente de prueba y se reemplazó el medio de cultivo. Para (i), se devolvieron las células a medio de mantenimiento (FBS al 2%/DMEM) seguido por reactivo MTS/PMS durante dos horas. Para (ii), se devolvieron las células a medio de crecimiento (FBS al 10%/DMEC) durante tres días. Después de este período, se aspiró el medio de crecimiento y se sustituyó por medio de mantenimiento (FBS al 2% /DMEM) seguido por reactivo MTS/PMS durante dos horas.

Se midió el cambio de color de MTS a las 2 horas como se describió anteriormente en el presente documento.

20 Los agentes de prueba fueron sobrenadantes de soporte remojado y GTA (a), hidrolizado de fibrinógeno y de base de Schiff de fragmento E (b) y (c) y alginato (d).

(a) Sobrenadantes de soporte y GTA

25 Los resultados para sobrenadantes de soporte y GTA pueden observarse en las figuras 30 y 31. La DL_{50} aguda para GTA sobre la citotoxicidad de HDF es de aproximadamente 50-150 μM , y para la proliferación es más potente, de aproximadamente 7 μM .

30 La exposición de células a sobrenadante de PBS de soportes no reducidos remojados durante una hora en PBS da como resultado citotoxicidad sustancial para la proliferación y una citotoxicidad aguda marcada. Ambos de estos efectos se previenen mediante el procedimiento de reducción. Basándose en los valores de DL_{50} de GTA anteriores y la dilución del sobrenadante, el equivalente de GTA en el sobrenadante de soportes no reducidos es de aproximadamente 20 μM .

(b) Hidrolizado de base de Schiff de fibrinógeno reticulado con GTA

35 Se prepararon hidrolizados de base de Schiff como se describió anteriormente en el presente documento y los resultados de este estudio pueden observarse en las figuras 32 y 33. Se observó algo de pérdida de viabilidad celular debido a la incubación durante 1 hora en PBS/g en comparación con medio de cultivo. Sin embargo, no se detectaron efectos citotóxicos de hidrolizados de fibrinógeno reticulado con GTA de base de Schiff. Estos datos proporcionan evidencias de que la proteína reticulada con GTA no provoca citotoxicidad intrínsecamente, contribuyendo al uso seguro de la reticulación con GTA.

(c) Hidrolizados proteolíticos de fibrinógeno

40 Se lisaron coágulos de fibrina 10 mg/ml con tripsina o plasmina durante 16 horas, y entonces se inhibió la actividad proteolítica adicional con inhibidor de tripsina de semilla de soja o aprotinina respectivamente, en condiciones descritas anteriormente en el presente documento. La proteína de fibrinógeno equivalente en hidrolizados resultantes estaba a 7,5 mg/ml.

45 Los resultados se muestran en la figura 34 en la que puede observarse que ninguno de los hidrolizados proporcionó evidencias de citotoxicidad sugiriendo que es improbable que su degradación proteolítica natural provoque citotoxicidad adversa. Estos datos respaldan el uso seguro de fibrinógeno como material de soporte.

(d) Alginato de sodio

Se evaluaron los posibles efectos citotóxicos de un ácido algínico de calidad para laboratorio y un alginato de sodio de calidad farmacéutica (ambos neutralizados con hidróxido de sodio a pH 7,4) a lo largo del intervalo de concentración del 0,02 -0,2% y los resultados se muestran en la figura 35.

50 Aunque el alginato de calidad para laboratorio provocó alguna citotoxicidad, debida posiblemente a contaminantes

de bajo peso molecular, esto no se observó con el alginato de calidad farmacéutica. Esto aporta datos de seguridad para el uso de alginatos como constituyentes de soporte.

Ejemplo 13: análisis inflamatorio de los componentes del soporte

(a) Ensayo de activación de neutrófilos humanos

5 (i) Procedimiento de aislamiento

Materiales usados

Ácido-citrato-dextrosa (ACD)

Dextrano 70

DiH₂O (agua purificada de Sigma)

10 NaCl 0,6 M en DiH₂O

PBS de Dulbecco con sales de magnesio y calcio + glucosa al 0,2% (PBS/g)

Azul tripano (para recuento de viabilidad celular)

Equipo usado

Jeringa de 20 ml

15 Agujas para extraer sangre

Vaso de precipitados grande para almacenamiento

Tubos de polipropileno de 15 ml

Pipetas de plástico de 1 ml

Baño de agua a 37°C

20 Se calentaron dextrano 70 y ACD hasta 37°C en un baño de agua. Se extrajeron 2,5 ml de ACD en una jeringa de 20 ml. Se extrajeron 10-15 ml de sangre de un voluntario en la misma jeringa y se invirtió varias veces para mezclar. Se cambió la aguja y se extrajeron 6-7 ml de dextrano 70. Se extrajo un poco de aire en la parte superior de la jeringa y se mezcló exhaustivamente invirtiendo la jeringa varias veces. Se puso la jeringa en posición vertical, se adhirió dentro del baño de agua a 37°C y se dejó durante aproximadamente 1,5 horas para permitir que los eritrocitos se sedimentaran, dejando una capa superior de plasma rico en leucocitos.

25 Se retiró cuidadosamente la jeringa del baño de agua manteniéndola vertical y se dobló la parte superior de la aguja aproximadamente 120°. Se colocó un tubo de polipropileno de 15 ml bajo la punta de la aguja y lentamente se retiró aproximadamente la mitad del plasma (que contenía los leucocitos). Se retiró el resto del plasma en un segundo tubo dejando los glóbulos rojos en la jeringa para desecharse. Se rellenó cada uno de los tubos de 15 ml con PBS/g y se invirtió para mezclar.

30 Se centrifugaron los tubos a 1000 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante usando una pipeta de plástico de 1 ml y se soltó el sedimento. Si el sobrenadante aparecía turbio entonces se realizó una comprobación con el microscopio para determinar células restantes y se centrifugó otra vez si era necesario. Cuando el sobrenadante era transparente se desechó.

35 Se añadieron 2 ml de diH₂O al sedimento celular y se agitaron con vórtex para lisar eritrocitos residuales. Exactamente 30 segundos después de añadir agua se restauró la isotonicidad añadiendo 500 µl de NaCl 0,6 M y se agitó con vórtex otra vez.

40 Se añadió PBS/g para llenar los tubos y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante con una pipeta de plástico, se resuspendieron los sedimentos y se combinaron en un tubo en 1-2 ml de PBS/g. Entonces se realizó un recuento celular con azul tripano.

(ii) Procedimiento de activación

Materiales usados

PBS/g

Disoluciones de prueba formadas en PBS/g

PMA 5 μ M en PBS/g (control positivo)

PBS

PFA al 4%/PBS

Tampón de anticuerpos de BSA al 1%/PBS

5 Tampón de lavado de BSA al 0,1%/PBS

Anticuerpo primario – de ratón anti-CD 18 humana

Anticuerpo secundario – de conejo anti-IgG de ratón

Equipo usado

Tubos de polipropileno de 5 ml

10 Citómetro de flujo

Se añadió suspensión celular de 0,5 - 1×10^6 células/tubo a tubos de polipropileno marcados para cada condición de prueba, incluyendo control a $t=0$, control a $t=1$ hora, un control de células sin teñir y un control de células teñidas sólo con anticuerpo secundario.

15 Se añadieron 250 μ l de cada disolución a los tubos apropiados. Para los tubos control, excepto $t=0$, se añadieron 250 μ l de PBS/g. Para control a $t=0$, se añadieron 250 μ l de PFA al 4%/PBS. Se incubaron los tubos durante 1 hora a 37°C.

20 Se añadió 1 ml de PBS/g a cada tubo (excepto a $t=0$) y se centrifugó a 1000 rpm durante 4 minutos. Se extrajo el sobrenadante y se resuspendieron las células en 250 μ l de PFA al 4%/PBS y se dejó durante 15 minutos. Se diluyó cada tubo (incluyendo $t=0$) con 1 ml de PBS y se centrifugó a 1000 rpm durante 4 minutos. Se extrajo el sobrenadante y se lavó otra vez con PBS. Se resuspendieron los sedimentos en tampón de lavado de BSA al 0,1% y se dejaron refrigerados durante la noche para teñir al día siguiente. Se resuspendieron el control sin teñir y las células sólo con anticuerpo secundario en tampón de lavado de BSA al 0,1%. Se añadieron 100 μ l de anticuerpo primario a todas las demás células a una concentración de 10 μ g/ml, formada en tampón de anticuerpos de BSA al 1% y se incubaron a 37°C durante 15 minutos.

25 Se añadió 1 ml de PBS a cada una de las células teñidas con anticuerpo y se centrifugaron a 1000 rpm durante 4 minutos. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en tampón de lavado. Se añadió 1 ml de PBS a todos los tubos que iban a teñirse con anticuerpo secundario (es decir todos excepto las células sin teñir), y se centrifugaron a 1000 rpm durante 4 minutos. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 100 μ l de tampón de anticuerpos de BSA al 1% que contenía anticuerpo secundario en la concentración 10 μ l en 1 ml.

30 Se incubaron las células y se protegieron de la luz durante entre 20 minutos y 1 hora. Se añadió 1 ml de PBS a los tubos y se centrifugaron a 1000 rpm durante 4 minutos. Se resuspendieron las células en 250 μ l de tampón de lavado de BSA al 0,1% y se almacenaron protegidas de la luz a 4°C antes del análisis con FACS.

35 Se realizó el análisis de exploración de FACS usando parámetros de instrumento predeterminados (dispersión frontal, dispersión lateral apropiada para muestras mixtas de leucocitos y amplificación de detector de fluorescencia apropiada para el intervalo de intensidad de las muestras), evitando la saturación del detector pero con amplificación adecuada a lo largo de una escala logarítmica de 4 décadas. Se seleccionó la población de neutrófilos y se registró la fluorescencia del canal medio de cada muestra.

(b) Efecto de glutaraldehído

40 Los resultados para GTA pueden observarse en las figuras 36 y 37 en las que GTA tiene un potente efecto sobre la activación de CD18 de neutrófilos, con una DE_{50} de aproximadamente 150-500 μ M.

45 El PBS sobrenadante de soportes prototipo remojados (fibrina/alginato/CaCl₂ 50 mM) reticulados con GTA a pH 7,4 durante 1 hora, no provocó activación significativa de CD18 de neutrófilos. Los sobrenadantes de soportes reducidos con borohidruro de sodio provocaron menos CD18 que de matrices no reducidas. Estos datos sugieren que la lixiviación aguda de GTA a partir de soportes puede ser detectable para soportes no reducidos, pero está debajo del nivel de citotoxicidad o activación de neutrófilos, es decir menor que 100 μ M, y se reduce adicionalmente mediante reducción química del soporte.

(c) Efecto de residuos de base de Schiff

La formación de base de Schiff es mayor a pH neutro que a pH 3,5, por tanto los residuos de base de Schiff estarán

a concentración superior en los hidrolizados correspondientes de matrices neutras. Los datos mostrados en la figuras 38 y 39 demuestran que los hidrolizados de base de Schiff provocan poca activación, sugiriendo que es poco probable que los productos de degradación provoquen inflamación mediada por neutrófilos. Estos datos contribuyen a validar la seguridad intrínseca de la reticulación con GTA.

- 5 La comparación de hidrolizados de fibrinógeno reticulado con GTA a pH 7,4, muestras o bien no reducidas o bien reducidas con de borohidruro de sodio, no muestran activación significativa de CD18 de neutrófilos de ningún material, demostrando que no es probable que la reducción con borohidruro de sodio de fibrinógeno reticulado con GTA introduzca un estímulo inflamatorio en la estructura intrínseca del soporte.

(d) Efectos de fibrinógeno

- 10 Los resultados para fibrinógeno se muestran en la figura 40, en la que ni los digestos de tripsina ni de fibrinógeno proteolítico plasmático como se describieron anteriormente provocan activación de neutrófilos. Esto proporciona evidencias de que no es probable que estas proteínas en un soporte provoquen una respuesta inflamatoria.

(e) Efectos de alginatos

- 15 Los resultados de los alginatos se muestran en la figura 41, en la que ni la calidad de laboratorio (ácido algínico) ni farmacéutica (LXX, Manuacol o DMB) de alginato, ni alginato derivatizado con propilglicol (Kelcoloid), provocaron activación de neutrófilos detectable. Estos datos proporcionan evidencias de que los alginatos parecen ser seguros para su uso en un soporte y no es probable que provoquen inflamación mediada por neutrófilos.

Ejemplo 14: Evaluación *in vivo* de un soporte de espuma de fibrina/alginato/calcio reticulado con GTA, reducido con borohidruro de sodio

- 20 (a) Matriz de fabricación

(i) Materiales usados

HEPES/NaCl (HEPES 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4);

Fibrinógeno humano al 2% (fracción 1 de plasma bovino tipo IV) (F4753, Sigma) en HEPES 25 mM, NaCl 150 mM, dH₂O (equilibrado a pH7,4);

- 25 Fybex™ al 2%-fibrinógeno humano derivado en HEPES 25 mM, NaCl 150 mM pH 7,4;

Ácido algínico al 2% (polímero de ácido manurónico + ácido glucurónico mixto de *macrocyttis pyrifera*, algas pardas) en HEPES 25 mM, NaCl 150 mM, dH₂O equilibrado a pH 7,4;

CaCl₂ 1 M (Sigma) en dH₂O;

- 30 Trombina humana (plasma humano EC 3.4.21.5, T6884 Sigma), 10 unidades de NIH/ml en BSA al 0,1%/M199 (Gibco);

Glutaraldehído al 0,2% (disolución de glutaraldehído al 25% grado II G62517 Sigma) en etanol al 80% (Hayman Ltd, Witham, R.U.)/MES 100 mM al 20% pH 7,4 (usado dentro de campana extractora para ventilar el vapor de GTA);

Borohidruro de sodio (Sigma) en dH₂O 1 mg/ml (usado dentro campana extractora para ventilar el gas liberado de hidrógeno).

- 35 (ii) Equipo usado

Tubos Visking (dia. de 14,3 mm, 12-14 kDa, Medicell International, Londres, R.U.) y Mediclips;

Agitador magnético;

Armario frío o cámara frigorífica (4°C).

(iii) Diálisis de Fybex™

- 40 Fybex™ es un sistema adhesivo de fibrina humana hemostático quirúrgico, comercialmente disponible (Bio Product Laboratories, Elstree, R.U.). Se usa como fuente de fibrinógeno humano seleccionado por patógenos y se estabiliza para este uso mediante excipientes y tampón citrato.

- 45 Se preparó Fybex™ para la fabricación de matrices mediante reconstitución en agua estéril como se recomienda (produciendo 5 ml de disolución de fibrinógeno 60 mg/ml por ampolla). Esto se transfirió a tubos de diálisis Visking esterilizados de 12-14 kDa sellados con pinzas de diálisis Mediclip, y se dializaron frente a HEPES/NaCl a 4°C con agitación mediante un agitador magnético con tres cambios a lo largo de 24 horas. Tras la finalización de la diálisis, se retiró cuidadosamente la disolución de fibrinógeno purificado de los tubos y se diluyó hasta una concentración

final de 20 mg/ml con disolución de HEPES 25 mM, NaCl 150 mM.

(iv) Fabricación de matrices

5 A 10 ml de disolución de fibrinógeno dentro de un tubo de centrifuga de 50 ml (Greiner Bio One) se le añadió 1 ml de disolución de CaCl_2 1 M (concentración final de 50 mM), a temperatura ambiente en condiciones asépticas (campana de flujo, utensilios de plástico estériles). Para coagular la fibrina a lo largo de 20 minutos, se añadieron 150 μl de trombina y se mezcló mediante un breve batido. Finalmente, se añadieron 10 ml de disolución de ácido algínico (inmediatamente la disolución gelifica en presencia de calcio).

10 Se genera espuma con 30 segundos con la mini-batidora y se cuele en un pesasustancias cuadrado de 100 ml de PTFE rectangular de 5x5 cm (Fisherbrand). Se incubó la espuma durante 30 minutos a 37°C para permitir la coagulación de fibrina en bandejas cubiertas. (Heraeus HERAcCell 150 Incubator, Alemania). Se transfirieron las espumas a un refrigerador a 4°C para su almacenamiento durante la noche.

(v) Reticulación con GTA

15 Usando un bisturí estéril dentro una campana de flujo estéril, se cortaron las esquinas del pesasustancias y se liberaron las matrices desde el mismo. Se transfirieron las matrices que contenían pesasustancias a placas Petri de cultivo tisular de 100 mm (Greiner Bio-one), se sumergieron en 15 ml de disolución de glutaraldehído al 0,2% a temperatura ambiente, y se agitaron suavemente en una plataforma giratoria de lecho plano a < 20 rev/min. (Kika Labortechnik KS125 basic).

20 En 1 hora, se liberó la matriz del pesasustancias y se desechó este último. Se continuó la reticulación de matriz durante 3 horas adicionales girando las matrices cada hora para garantizar una penetración adecuada de glutaraldehído.

Entonces se retiró la disolución de reticulación, y se lavaron las matrices con 5 lavados de 5 minutos con 15 ml de disolución de borohidruro para extinguir aldehídos libres y saturar estructuras dieno conjugado.

Finalmente se lavaron las matrices con 15 ml de dH_2O 3 veces.

(vi) Liofilización, almacenamiento y preparación para su uso quirúrgico

25 Se congelaron las matrices durante al menos 4 horas (normalmente durante la noche) a -70°C. Se transfirieron rápidamente al liofilizador (Christ 1-2 alpha, 4×10^{-4} mbar, trampa de fluido a -60°C) y se secaron a vacío durante 24 horas. Antes de su uso, se almacenaron las matrices liofilizadas en placas Petri selladas a 4°C.

30 Inmediatamente antes de la aplicación, en el quirófano con técnica aséptica, se afeitó la superficie de las matrices que iba a estar en contacto con el lecho de la herida con un bisturí de hoja 10, para eliminar cualquier posible corteza no porosa. Se reconstituyeron las matrices en 5 lavados de 15 ml solución salina estéril (Baxter). Esto es análogo al procedimiento de lavado recomendado descrito para la eliminación de la disolución de almacenamiento de glicerol al 70% usado para el soporte disponible comercialmente, Integra™.

(b) Modelo *in vivo*

(i) Animales, anestesia y cirugía

35 En el Northwick Park Institute, se emplearon en este estudio dos cerdos blancos grandes hembras de raza cruzada (Bury Farm, Edgware, Middlesex, R.U.). Inicialmente se alojaron los cerdos en pequeños grupos de dos a seis animales. Con el fin de evitar traumatismo inadvertido en las heridas experimentales después del primer procedimiento quirúrgico, se trasladaron los animales a corrales individuales a la vista de los otros cerdos, cada uno de los cuales podía abrirse mediante una puerta cerrada a un pasillo común. Se alimentaron los cerdos una vez al día con aproximadamente 1,5 kg de concentrado para cerdos convencional (J&W Atlee Ltd., Parsonage Mills, Dorking, Surrey, R.U.). Se realizó el despiojado mediante una única inyección subcutánea de Ivermectina (Ivomec™, Merial Animal Health, Cambridge, R.U.) a una dosis de 1 ml por 33 kg. Los animales tenían edades de 6-7 semanas en el momento de la cirugía inicial. Se dejaron reposar los cerdos durante 1 semana antes de iniciar el experimento. La permanencia media de los cerdos usados en estos estudios fue de 34 días. Los cerdos pesaban entre 55 y 65 kg en el momento del primer procedimiento quirúrgico y ganaron peso rápidamente, alcanzando hasta 78 kg cuando se sacrificaron. Se sedaron los animales con una inyección intramuscular de xilazina 1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Bayer AnimalHealth, Newbury, R.U.), y se indujo anestesia con ketamina 5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Pfizer, Newbury, R.U.) y se mantuvo usando una mezcla de halotano al 2-5% (IsoFluothane®, Abbott Laboratories, Maidenhead, R.U.) y 3-5 $\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ de una mezcla 50:50 de óxido nitroso y oxígeno. Para procedimientos de más de 100 min, se intubaron los animales con una cadena McGill de 3,5 mm de vías aéreas oro-traqueales. Se logró la monitorización peri-operatoria con saturación de oxígeno Doppler y medición de temperatura. Se proporcionó analgesia posoperatoria mediante una única inyección subcutánea de carprofeno (Xenecarp™, Pfizer) a una dosis de 4 $\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$. Se proporcionó profilaxis antibiótica de acción prolongada para cada procedimiento mediante una única inyección intramuscular preoperatoria de 1,375 g de amoxicilina (Amfipen LA, Intervet, Milton Keynes, R.U.). Se realizó el sacrificio después del procedimiento final

mediante inyección intravenosa de pentobarbitona sódica 25 mg.kg⁻¹ (Fort Dodge Animal Health, Southampton, R.U.).

5 Una vez anestesiado, se afeitaron los costados y se limpiaron con disoluciones acuosas de clorhexidina y Betadine y se cubrió al animal. Se realizaron tres heridas circulares de grosor completo de 4 cm de diámetro hasta la fascia muscular en el costado de cada animal. Se logró hemostasia con diatermia bipolar. Se aislaron las heridas mediante cámaras de PTFE percutáneas (The Bioengineering Department, Northwick Park Institute for Medical Research, Harrow, R.U.) previniendo la contracción de heridas e influencias de cicatrización lateral. Se reconstruyeron las heridas con o bien plantilla dérmica sintética Integra[™] (Integra Life Sciences, número de lote único) o bien matriz basada en fibrina como se detalla a continuación. Las matrices se adhirieron inmediatamente pero para asegurar la reconstrucción estable, se mantuvieron con una sutura de proleno 3/0 de perímetro continuo (Ethicon, Livingston, R.U.).

15 Se rebajó el perímetro de cada lecho de herida en aproximadamente 1,5 cm para alojar el borde de la cámara de aislamiento de heridas de PTFE. Se insertaron las cámaras por medio de una única extensión vertical de la herida redonda que también permitió acceso al lecho de herida inicial para aplicar las matrices candidatas. Esta herida vertical se cerró después de la inserción y se fijó la cámara usando suturas de seda 3/0 interrumpidas. Para reducir la infección y evitar el secado, se cubrieron las cámaras con gasa remojada con Betadine. Se vendaron las cámaras secuencialmente con venda circunferencial (Smith and Nephew Healthcare, Hull, R.U.), Mefix (Molnlycke Healthcare, Dunstable, R.U.) y vendaje adhesivo elástico Elastoplast (Beiersdorf-Jobst, Hull, R.U.). Se protegieron las cámaras adicionalmente con una camisa protectora diseñada a partir de espectro termoplástico fijado con cintas de Velcro® (Promedics Ltd, Blackburn, Lancashire, R.U.), y rellena con espuma de mobiliario de densidad media (Southern Foam, Crawley, Sussex, R.U.). Las condiciones para la cría y anestesia de animales fueron constantes para ambos animales.

25 Los experimentos se realizaron a lo largo de un transcurso de tiempo de 28 días. Se realizaron biopsias en los días 3, 7, 14 y 28, sacrificándose el animal en el punto de tiempo final. Se tomaron biopsias mediante técnica aséptica con anestesia general. En cada punto de tiempo, se recogieron biopsias de punzón de 10 mm de grosor completo hasta el músculo subyacente (biopsia de punzón desechable Steifel, Alto Wycombe, R.U.) de un único cuadrante de las cámaras de PTFE de 4 cm. Se tomaron fotografías de las cámaras. Volvieron a vendarse las cámaras y se administraron dosis adicionales de analgesia y antibióticos. En el punto de tiempo final, tras las biopsias de punzón del cuadrante final, se retiraron las cámaras de PTFE y se escindieron en bloque los sitios de herida reconstruida restantes con al menos 1 cm de tejido subyacente. Todas las biopsias se fijaron inmediatamente, durante al menos 12 horas en 10 ml de paraformaldehído al 4% para el procesamiento tisular.

30 Se crearon 3 heridas de grosor completo de 4 cm en cada costado de un único cerdo Yorkshire. Se reconstruyeron dentro de la cámara de PTFE con (véase la figura 6.2 para el diseño);

- a; plantilla dérmica sintética Integra[™]
- 35 b; matriz de fibrinógeno Sigma al 1% /alginato al 1%
- c; matriz fibrinógeno Fybex[™] al 1% /alginato al 1%

Las matrices de fibrina y alginato tenían aproximadamente 8 mm de profundidad. El material de colágeno Integra[™] tenía aproximadamente 0,3 mm de profundidad, con un refuerzo de Silastic de grosor similar.

Se recogieron biopsias de punzón en los días 3, 8, 14 y 28 de cada cámara.

40 (ii) Histología e inmunohistoquímica

Se insertó tejido en parafina, se cortó y se tiñó con H&E o se inmunotendió para detectar CD31 (AcMc, Dako), antígeno del factor de von Willebrand (AcMc, Dako) y α -actina de músculo liso (AcMc, Sigma). Se usó piel porcina normal y piel humana normal de control para validar y optimizar la reactividad del anticuerpo.

(c) Observaciones

45 Macroscópicamente, los soportes prototipo se adhirieron al lecho de la herida en el plazo de minutos desde la aplicación. Los materiales eran firmemente adherentes en el momento de la primera biopsia y a lo largo del transcurso de tres semanas parecieron permanecer intactos y mantuvieron sus dimensiones originales, sin signos de contracción radial.

50 En general, la evaluación histológica de las biopsias de las heridas a lo largo del transcurso de tiempo de 3 semanas (días 3, 8, 14 y 21) muestra que:

(i) se desarrolló una respuesta inflamatoria de leucocitos en el día 8, que pareció estar limitada a una zona que se introdujo gradualmente a través del soporte a lo largo de las tres semanas;

(ii) la mayor parte de la profundidad de los soportes de prueba se celularizaron y degradaron en 21 días. La

respuesta inflamatoria con soportes fibrinógeno/alginate fueron mayores que para Integra™;

5 (iii) en el día 21, las heridas consistieron en una capa profunda (hasta 10 mm) de tejido de granulación/fibroblástico de la fascia de la base de herida original. En el caso de Integra™, la regeneración celular *de novo* se extendió completamente a través del soporte y el tejido de granulación desplazó la membrana de silicona en hasta 2 mm desde la capa de colágeno. Sin embargo, con Integra™, el crecimiento interno del tejido fibroblástico fue sustancialmente avascular, y mostró una organización celular y deposición de colágeno similar al tejido de cicatriz

10 (iv) en los casos de la matriz prototipo Smart, se depositó tejido fibroblástico organizado y vascularizado detrás de la banda inflamatoria de tejido que progresó constantemente a través de los soportes. La sustancia de soporte mostró degradación sustancial, progresiva por debajo de la zona inflamatoria, en el día 21; y

(v) se observaron pocas diferencias histológicas entre los soportes fabricados con Fybex y fibrinógeno humano de calidad para laboratorio.

(d) Resumen de los resultados inmunológicos de CD31

15 La tinción de tejido endotelial específica (púrpura) es evidente en la mucosa humana normal (control positivo; figura 42A). En tejido de biopsia del día 3 de la evaluación porcina, en herida tratada con Fybex™ (figura 42B), resulta evidente la evidencia diferenciación de células endoteliales o neovascularización de tejido de granulación que se introduce; mientras que en Integra™, la tinción con CD31 en el soporte parece deberse sólo a plaquetas (flecha a *P; figura 42D), y la tinción endotelial se limita a la zona de granulación bajo el soporte. El tejido de biopsia del día 21 de la herida tratada con soporte de Fybex™ (figura 42C) muestra perfiles de múltiples capilares cerca de la superficie

20 dorsal de la neodermis adyacente a los restos dorsales del soporte remodelado. Integra™ del día 21 (figura 42E) muestra tinción con CD31 en espacios extra-fibróticos, aunque parecen ser principalmente plaquetas (flecha a *P), con pocos perfiles capilares posibles (flechas).

El patrón de inmunotinción de VWF fue similar a CD31. La tinción con α SM-actina mostró que el tejido de granulación era negativo para todos los soportes.

25 Este análisis *in vivo* ha demostrado claramente los siguientes hallazgos:

(i) los materiales se adhieren al lecho de la herida casi inmediatamente después de la aplicación;

(ii) el material persiste durante al menos 21 días (pero se degrada sustancialmente a lo largo de este período de manera simultánea con la proliferación y entrada celular);

30 (iii) el tejido regenerado es altamente vascular, y se organiza como una dermis provisional (apoya el rápido ingreso celular, histológicamente visible en el día 3);

(iv) las heridas no muestran contracción excesiva y el fenotipo miofibroblástico no estaba presente, lo que proporciona evidencias de que los soportes de prueba no pueden estimular la cicatrización.

Todos estos datos concuerdan con las propiedades deseables para el soporte.

Abreviaturas

35 Fbg fibrinógeno

GTA glutaraldehído

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar una composición de matriz extracelular que comprende:
 - (a) mezclar una disolución acuosa de fibrinógeno con un agente coagulante y un agente de carga y un agente espumante;
 - 5 (b) incubar la mezcla obtenida en la etapa (a) con un agente de reticulación seleccionado de: agentes de acoplamiento de carbodiimida tales como N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC); N-hidroxisuccinimida (NHS), agentes de acoplamiento de azida; agentes de reticulación de diisocianato tales como diisocianato de hexametileno; agentes de reticulación de epóxido tales como epiclorhidrina, glicidil éteres y glicidilaminas; y agentes de reticulación de aldehído tales como formaldehído, glutaraldehído y glicoxal; y
 - 10 (c) lavar la composición reticulada obtenida en la etapa (b) para eliminar el agente de reticulación.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que está presente fibrinógeno a un nivel de pureza superior a uno del 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o el 99%.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que está presente fibrinógeno como formas truncadas de fibrinógeno, tales como fibrina A, fibrina B, fibrina C, fibrina D, fibrina X, fibrina Y y fibrina E.
4. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que está presente fibrinógeno como una disolución acuosa tamponada a un pH de entre 4 y 10 con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o solución salina tamponada con HEPES; o
- 20 en el que el agente coagulante comprende un agente coagulante enzimático o no enzimático, que puede ser trombina, tal como trombina humana.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el agente espumante es un detergente no iónico, tensoactivo de gelificación termosensible (por ejemplo Pluronic 127), fosfolípido de tipo difosfatidilglicerol o una mezcla de una fase inmiscible con la fase de disolución acuosa de fibrinógeno.
- 25 6. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que el agente de carga es un alginato, tal como alginato de sodio o un alginato derivatizado, tal como propilglicoalginato de sodio.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el agente de carga es un glicosaminoglicano (GAG; por ejemplo 6-sulfato de condroitina, 4-sulfato de condroitina, heparina, sulfato de heparina, sulfato de queratano, sulfato de dermatano, quitina, quitosano, sulfato de dextrano o hialuronano).
- 30 8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el agente de reticulación comprende un agente de reticulación de aldehído tal como formaldehído, glutaraldehído y glicoxal.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, que comprende adicionalmente la adición de un agente reductor o un agente reductor de toxicidad, tal como borohidruro de sodio o lisina.
- 35 10. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que la etapa de mezclado (a) se logra mediante espumación, tal como mezclado con aireación, y/o en el que la mezcla obtenida en la etapa (a) se cuele, congela y opcionalmente se liofiliza antes de la etapa de incubación (b), y/o que comprende adicionalmente la adición de un ión de metal divalente o multivalente tal como calcio (por ejemplo cloruro de calcio).
- 40 11. Composición de matriz extracelular que puede obtenerse mediante un procedimiento según cualquier reivindicación anterior.
12. Composición de matriz extracelular según la reivindicación 11, para su uso en la cicatrización de heridas, regeneración de tejido o como soporte de ingeniería de tejidos *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

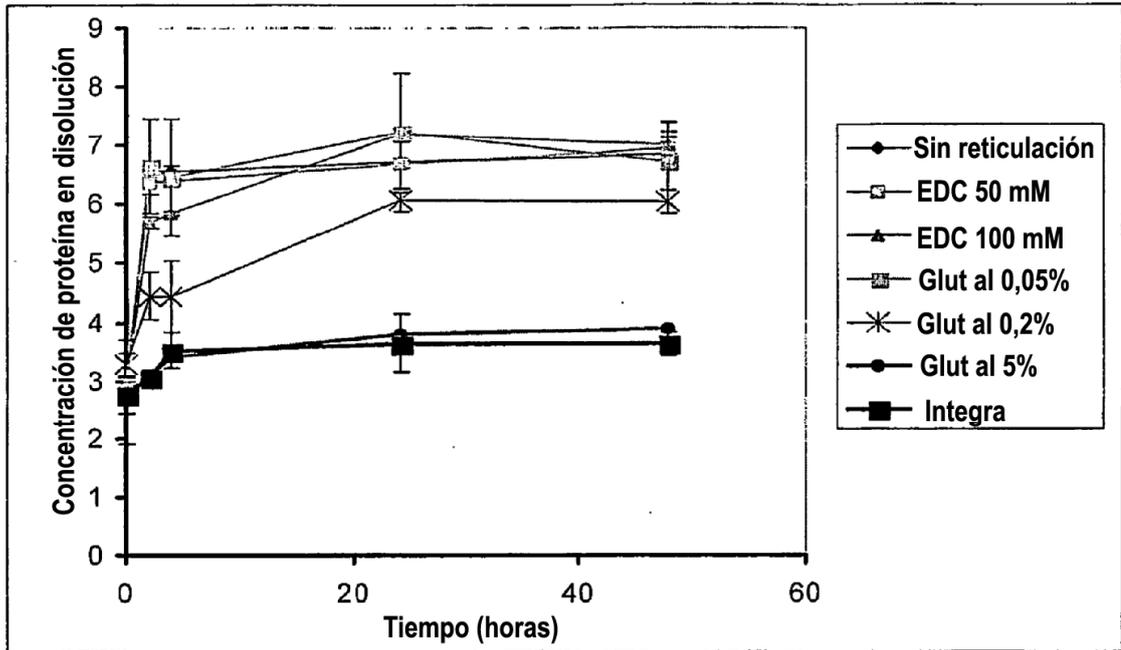


FIGURA 1

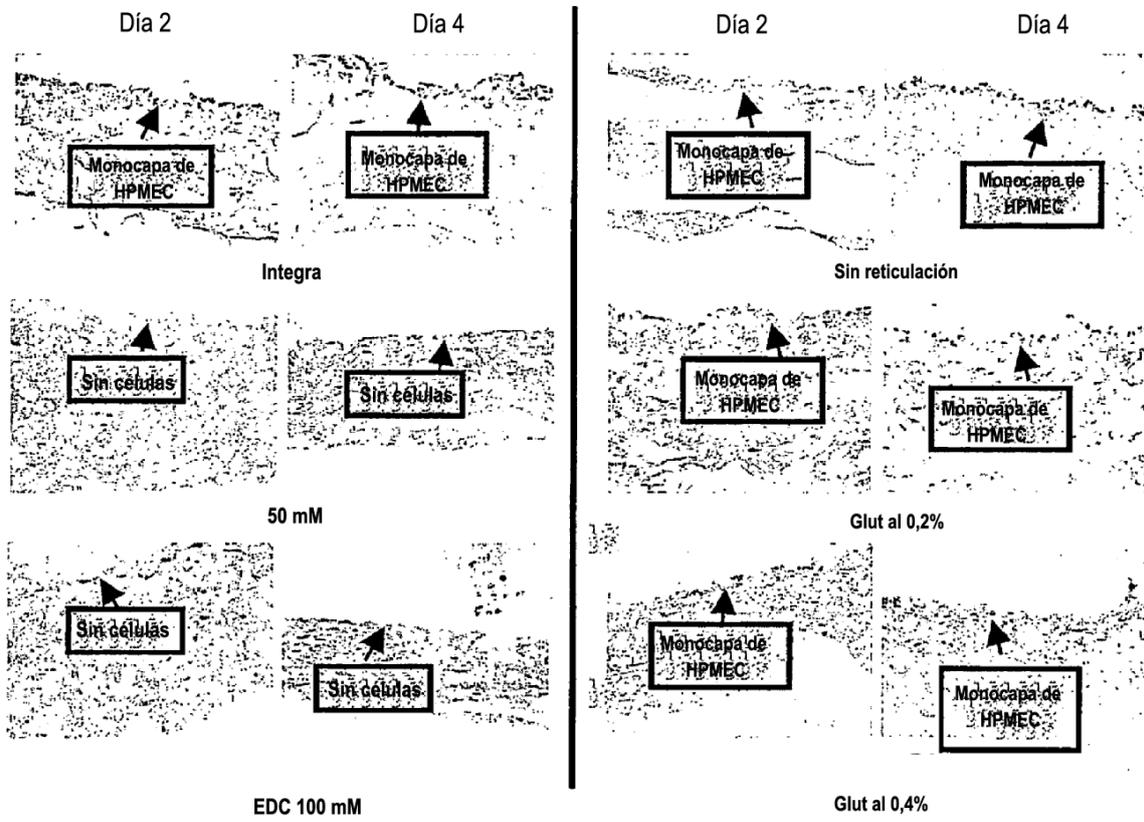


FIGURA 2

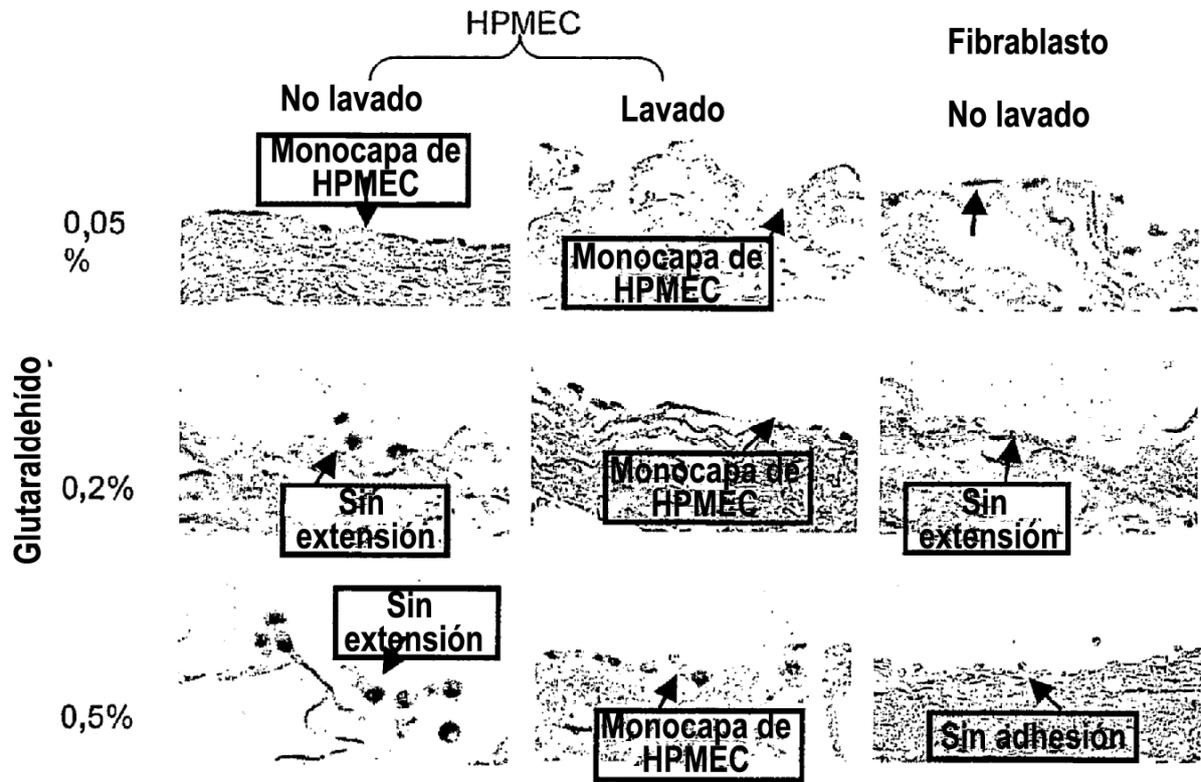
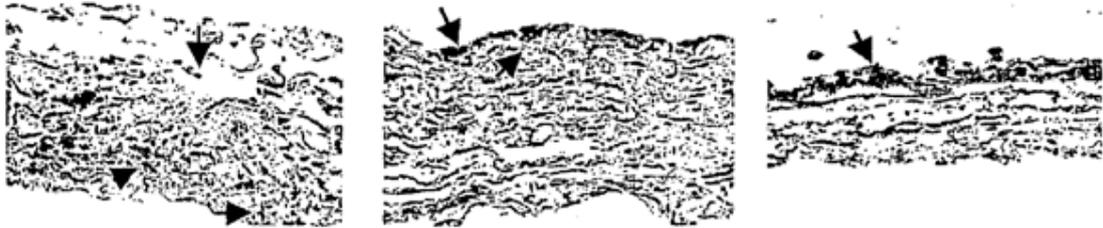


FIGURA 3

Lavado de 5 min. con borohidruro de sodio 1 mg/ml x 3



Glutaraldehído al 0,2%

Glutaraldehído al 0,4%

EDC 100 mM

FIGURA 4

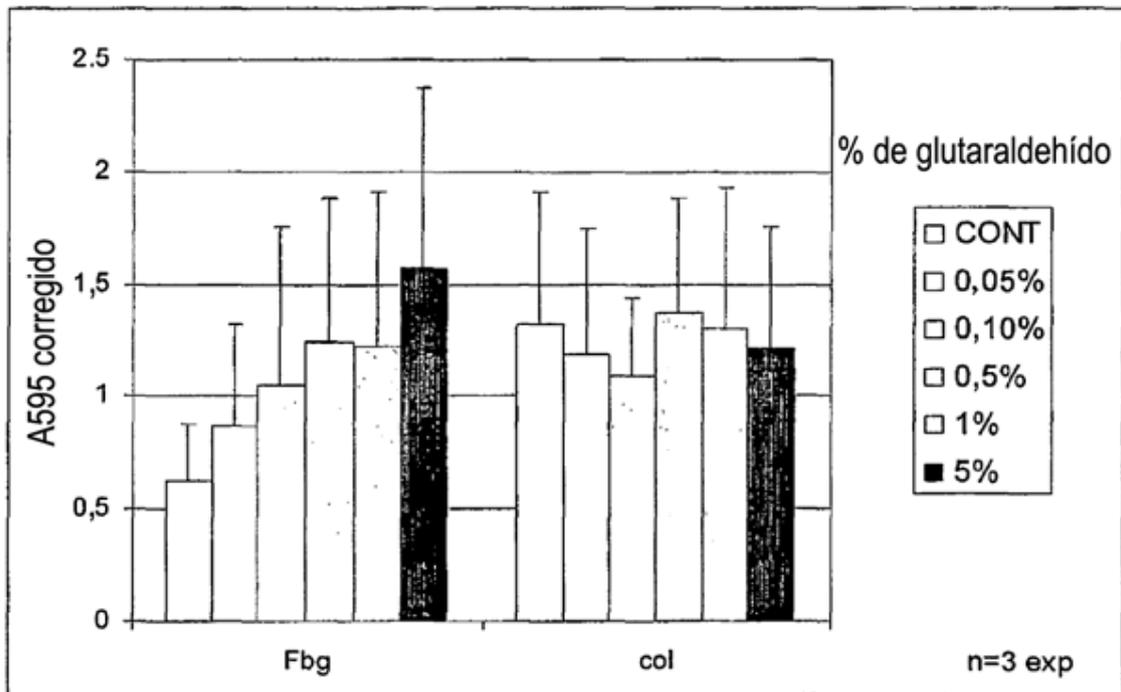


FIGURA 5

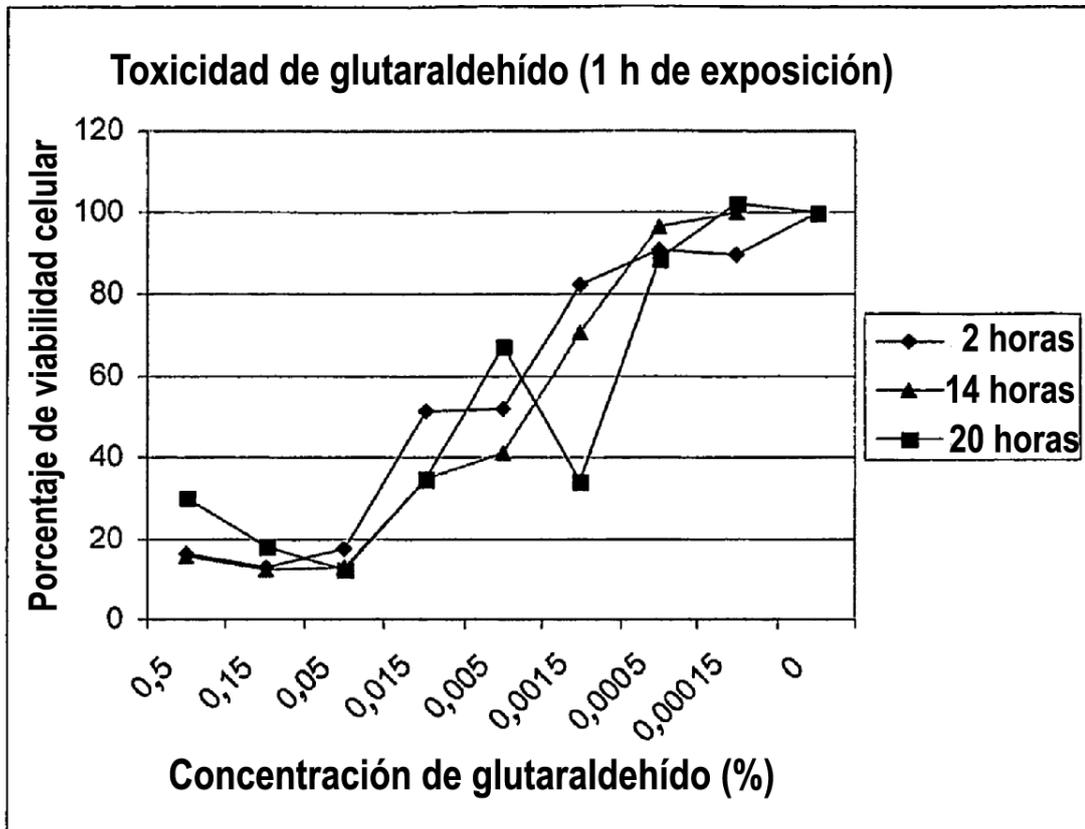


FIGURA 6

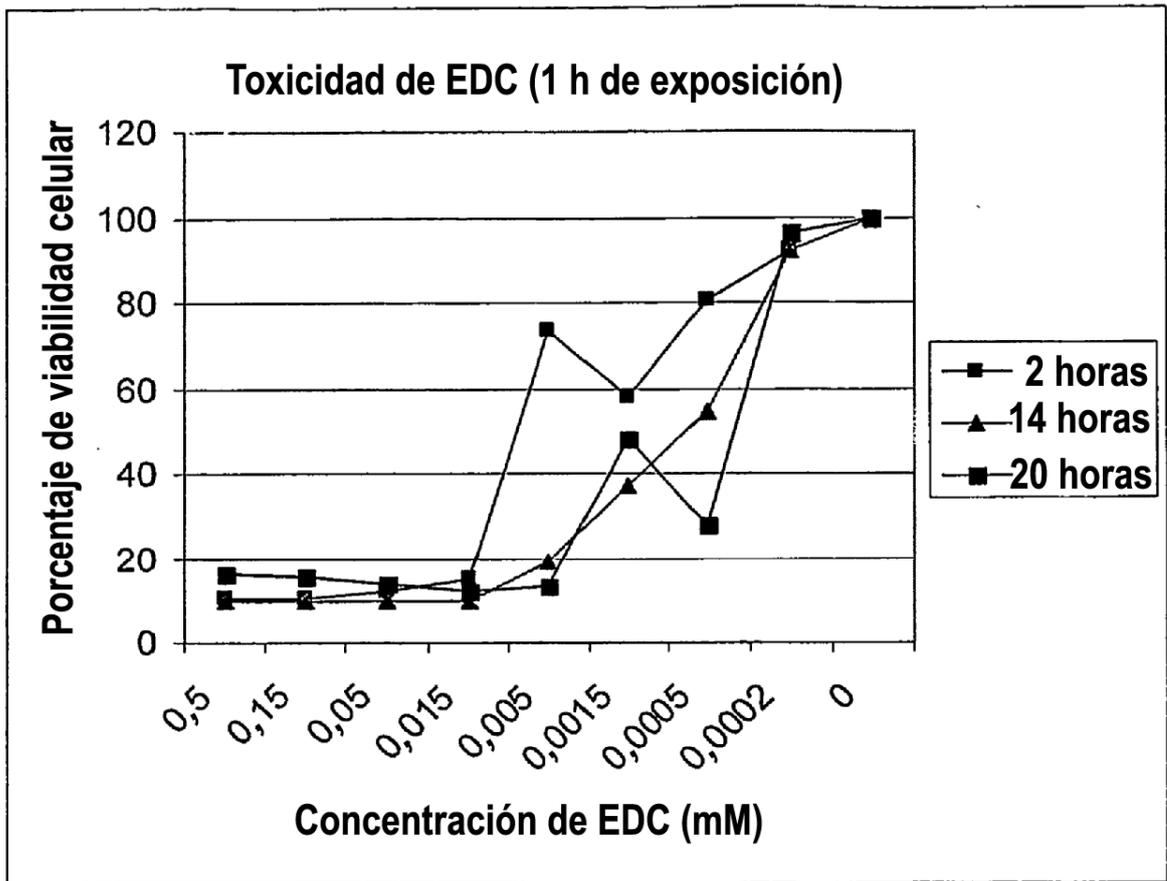


FIGURA 7

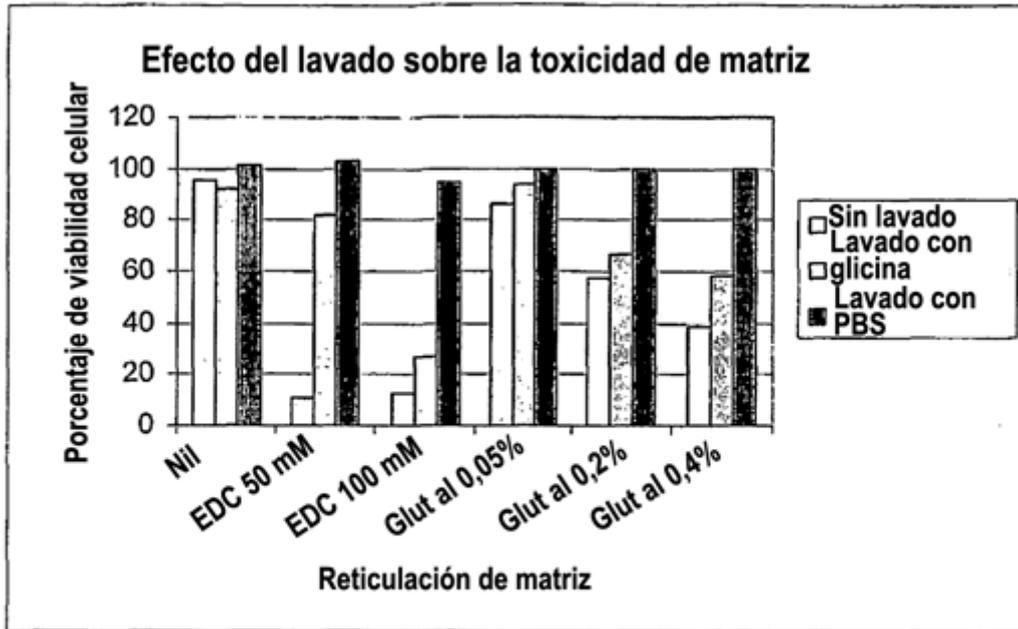


FIGURA 8

Dispersión/absorbancia óptica de disoluciones de fibrinógeno al 1%

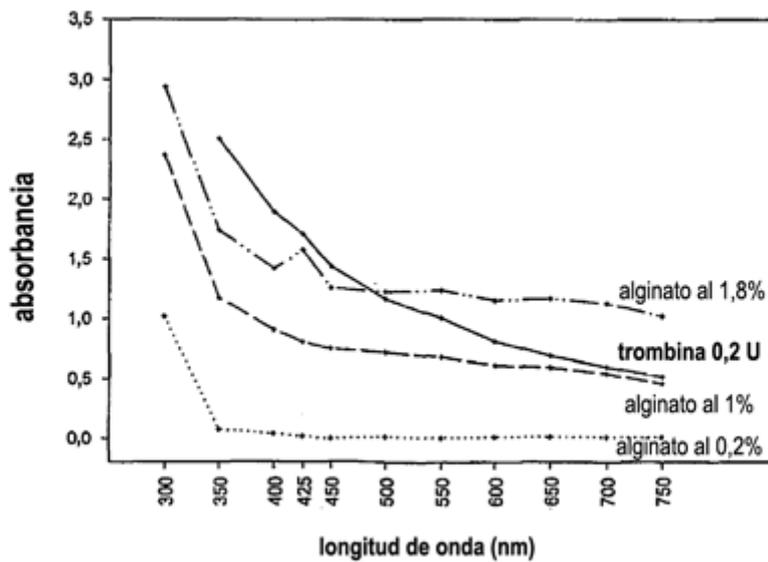


FIGURA 9

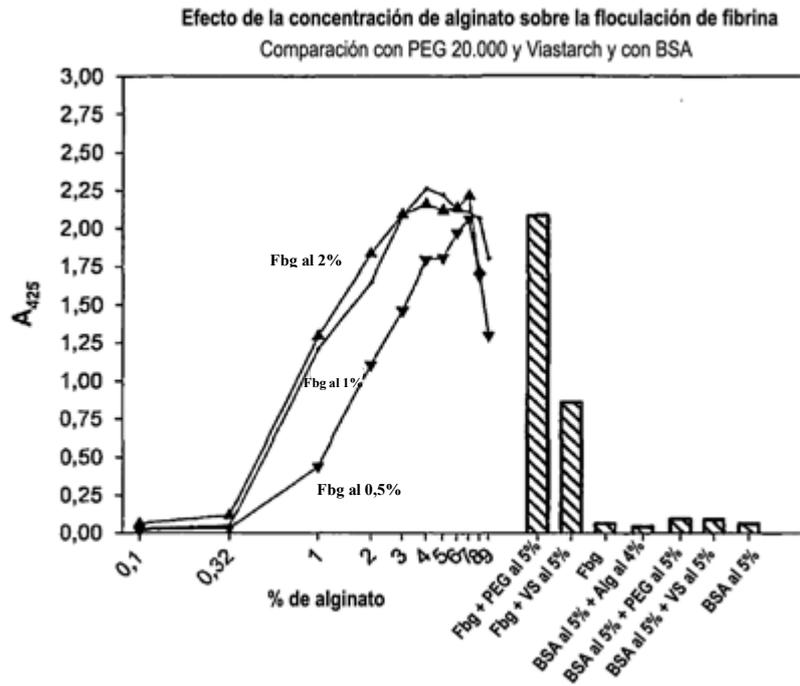


FIGURA 10

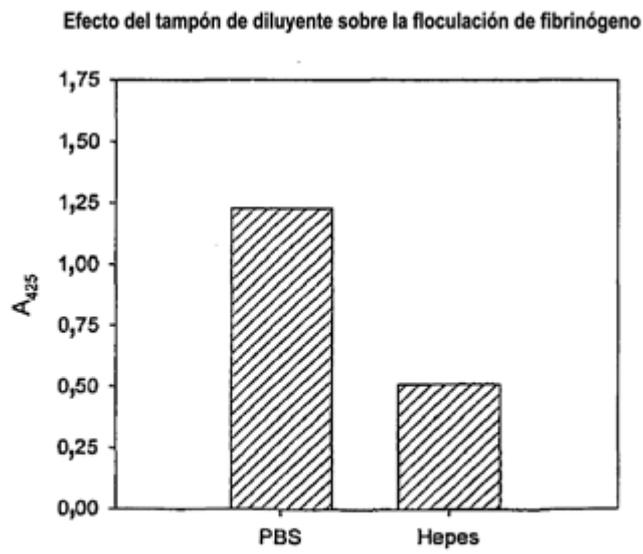


FIGURA 11

Efecto de $[Ca^{2+}]$ sobre la floculación máxima de fibrinógeno al 1%
(diluyente Heps-tampón)

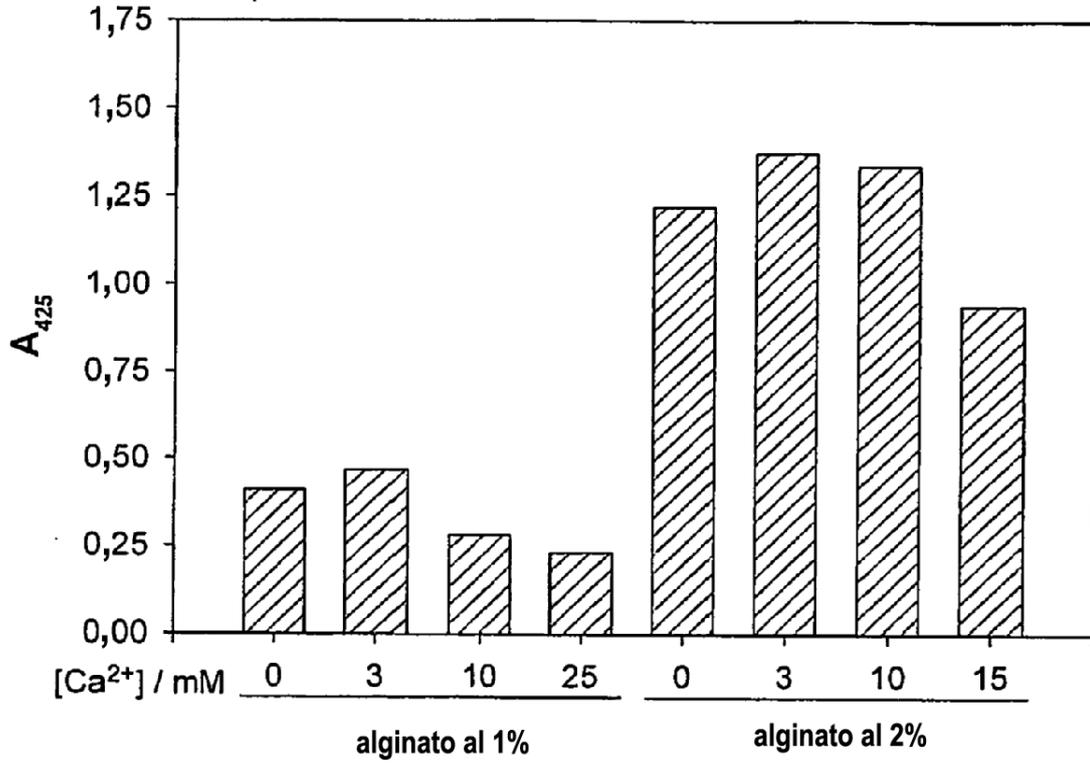
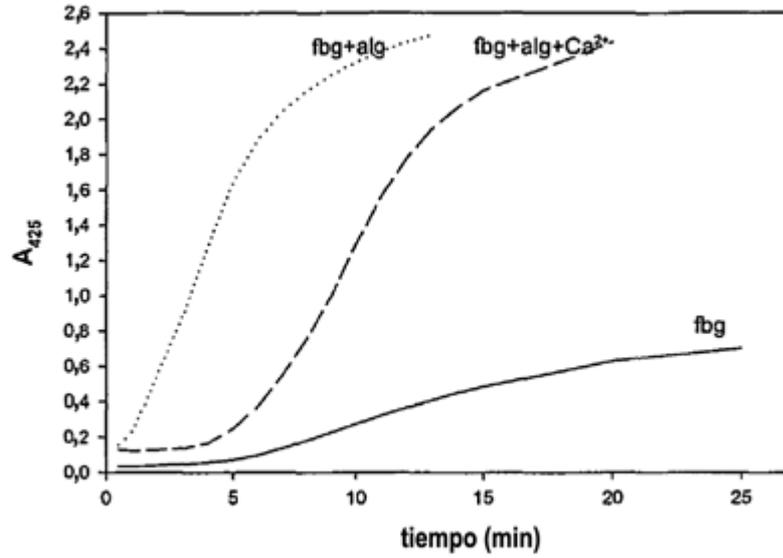


FIGURA 12

Efecto de alginato y Ca sobre la tasa de coagulación con trombina de fibrinogeno (1)



Efecto de alginato y Ca sobre la tasa de coagulación con trombina de fibrinogeno (2)

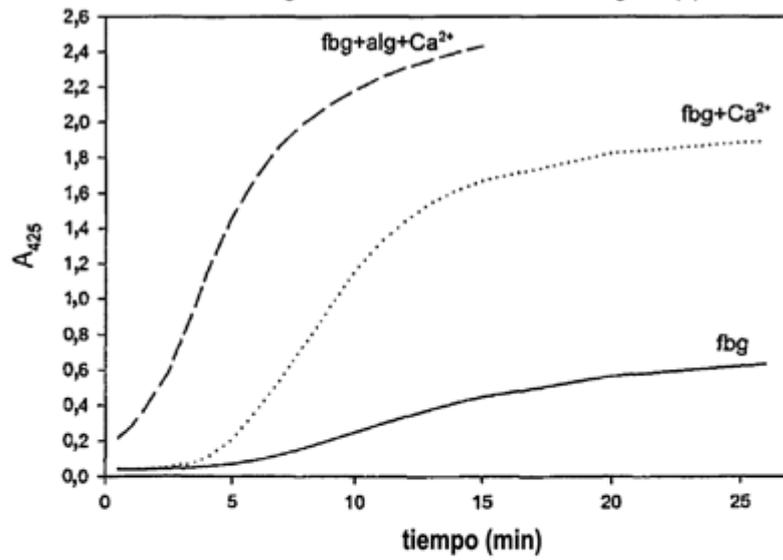


FIGURA 13

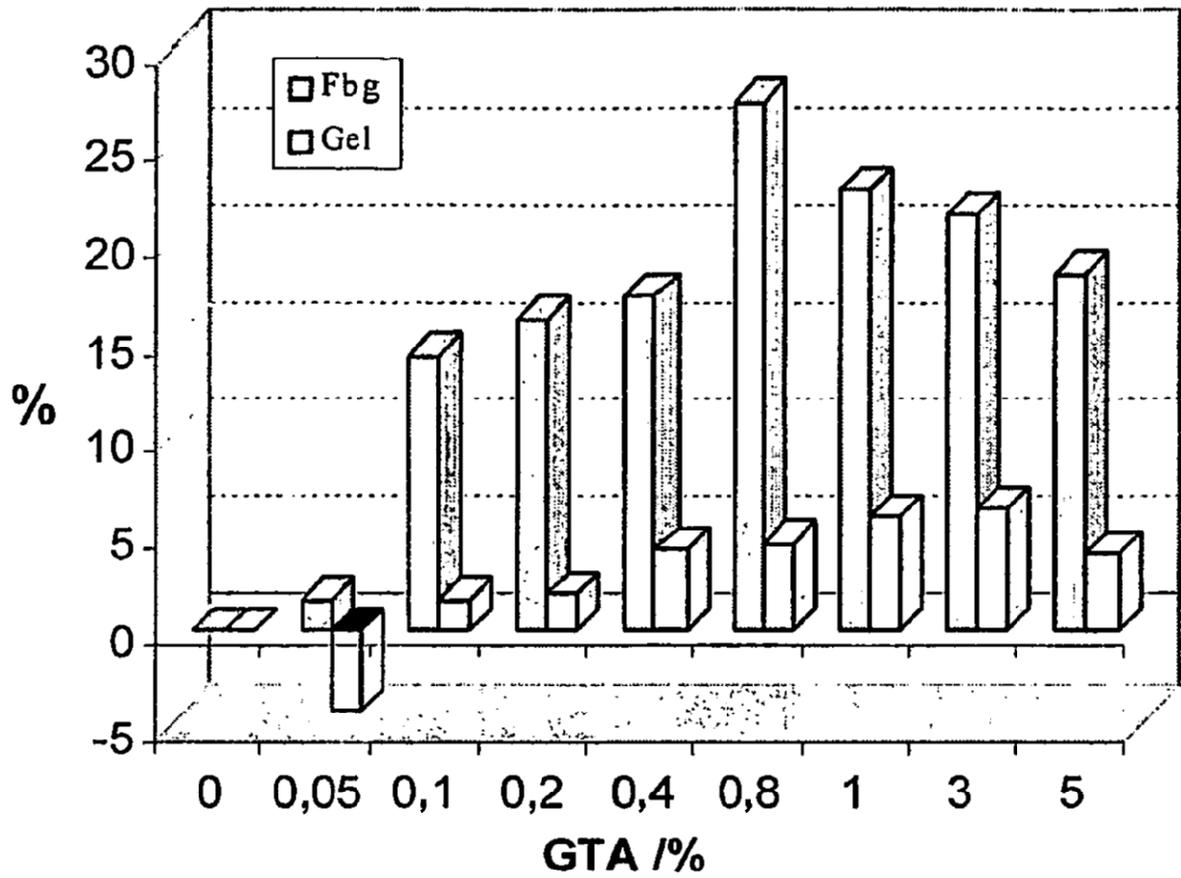


FIGURA 14

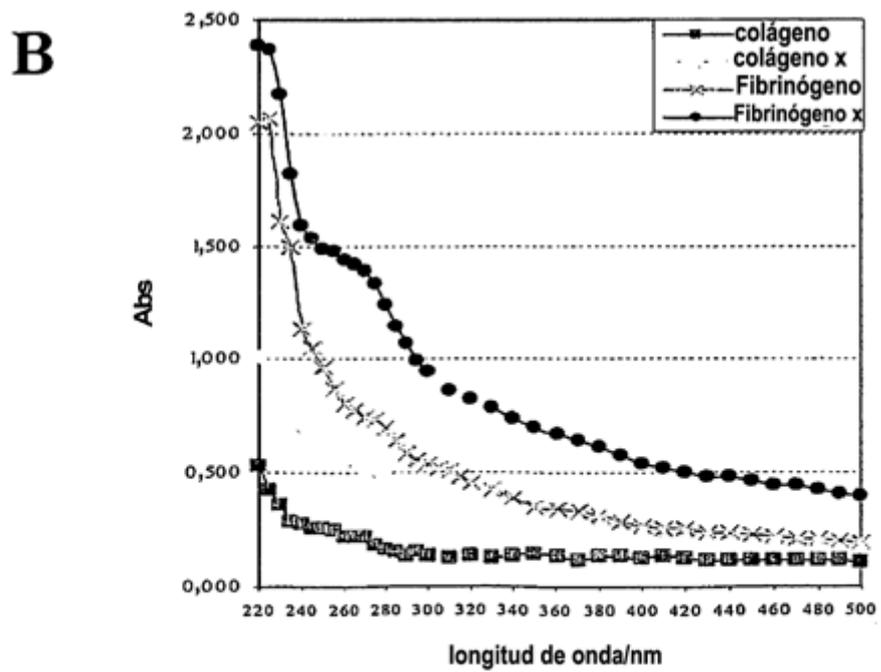
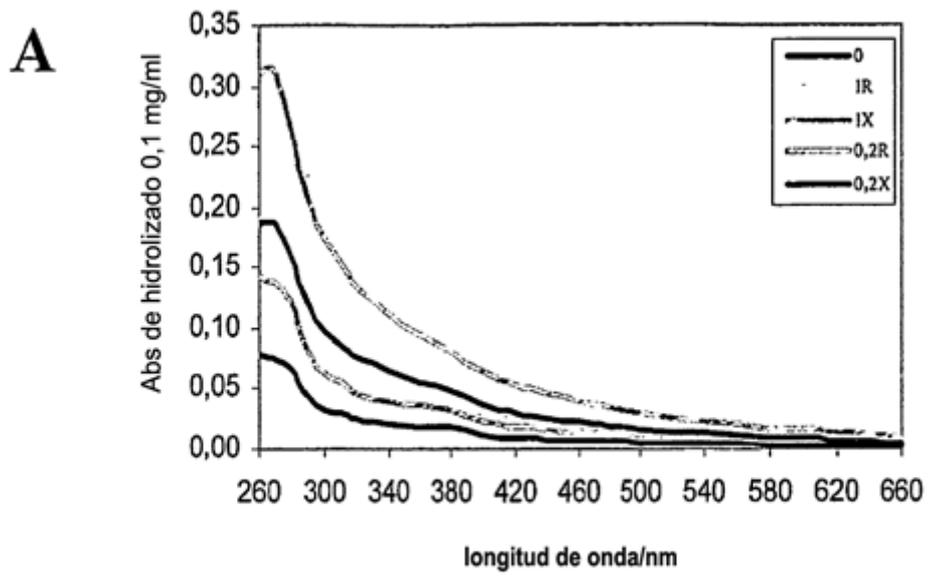
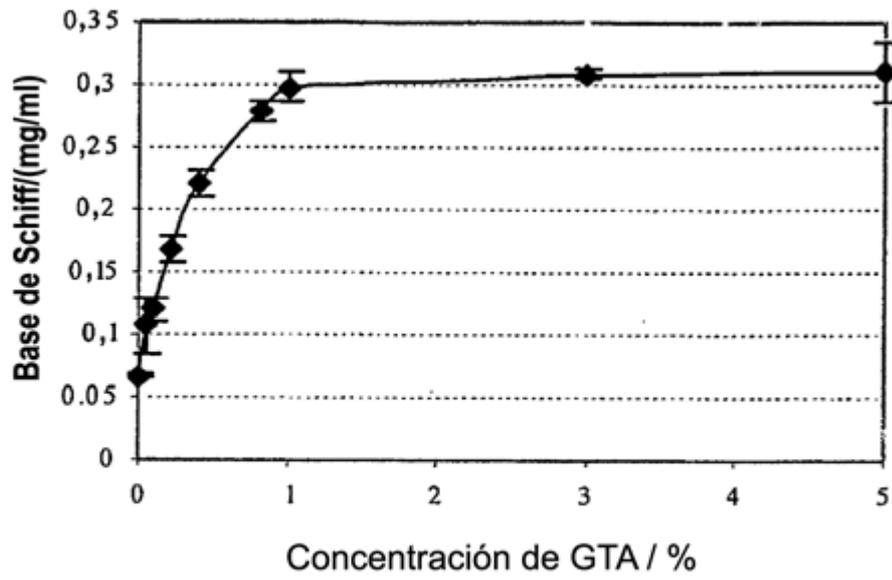


FIGURA 15

A



B

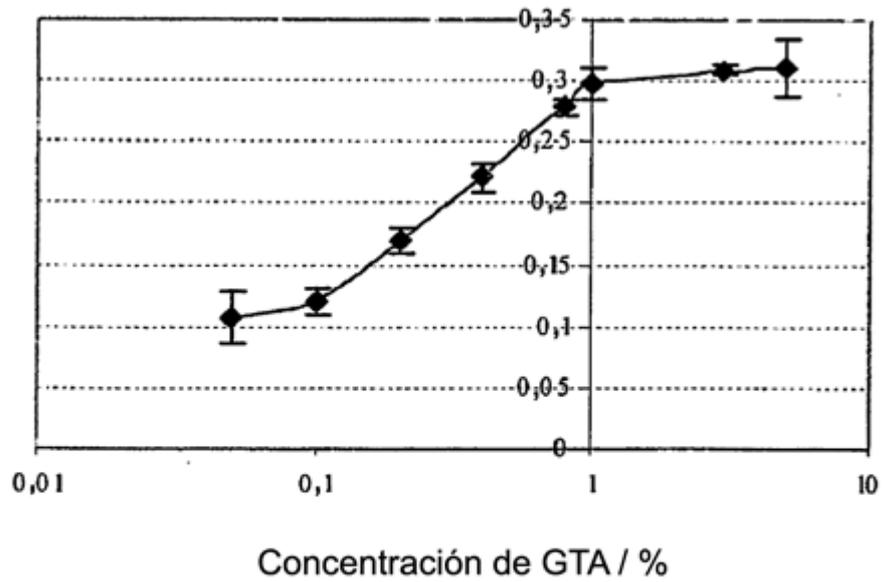


FIGURA 16

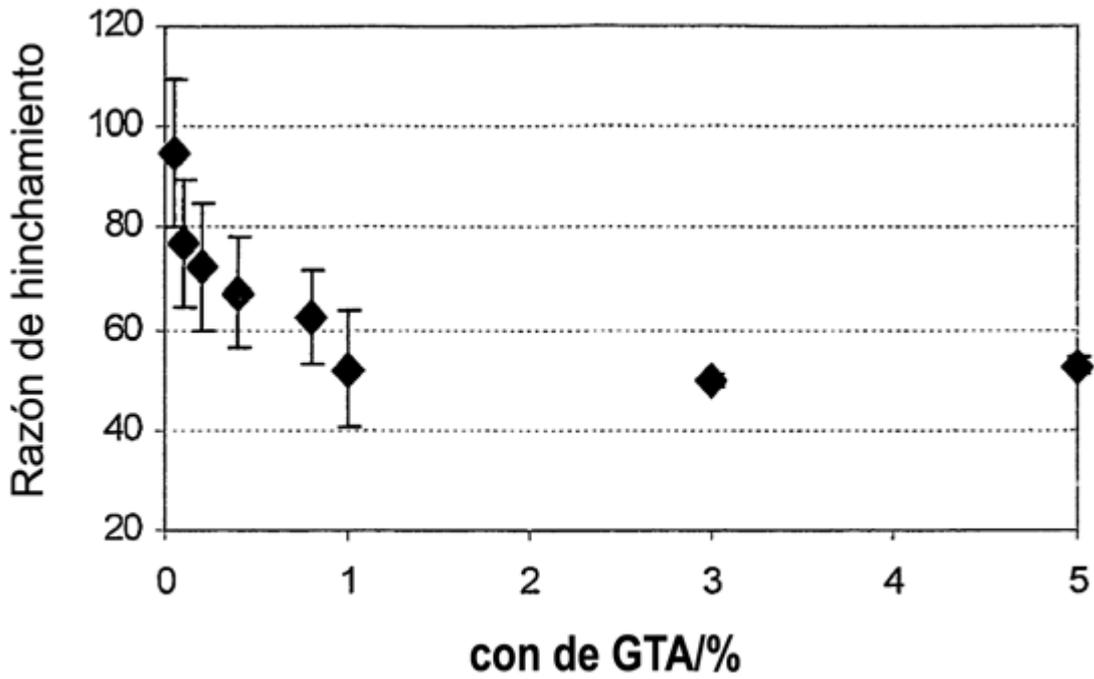


FIGURA 17

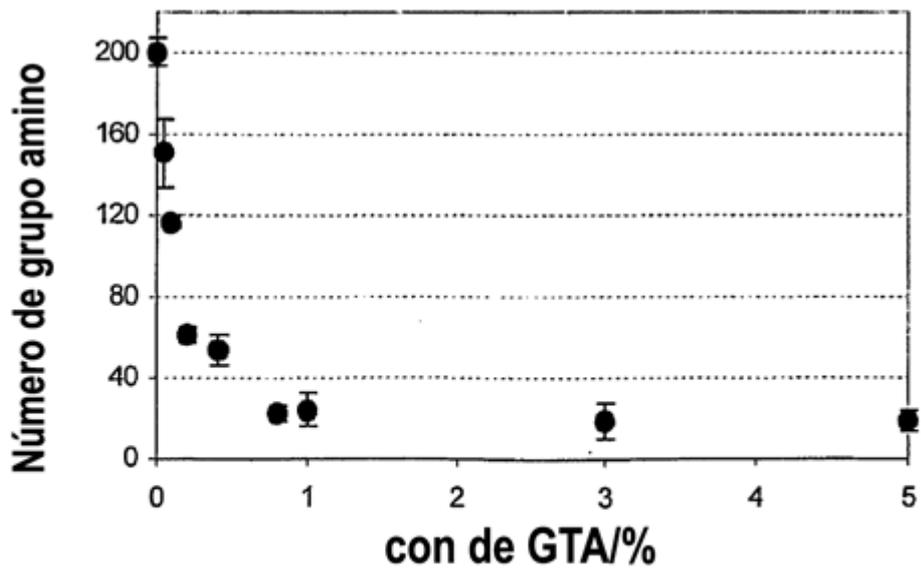


FIGURA 18

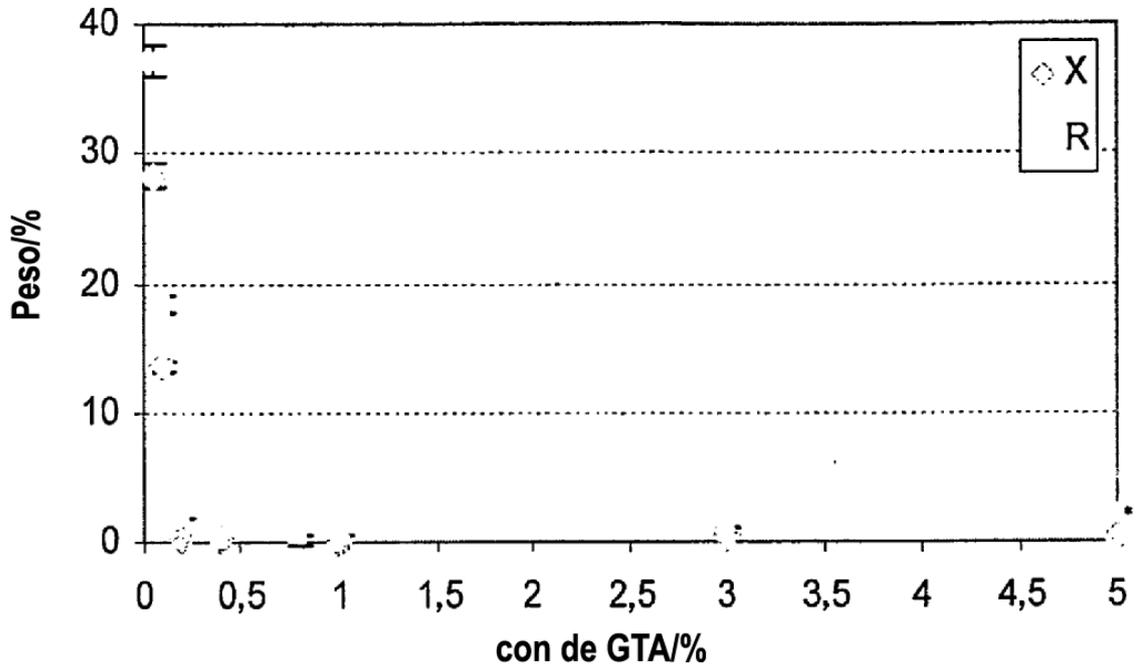


FIGURA 19

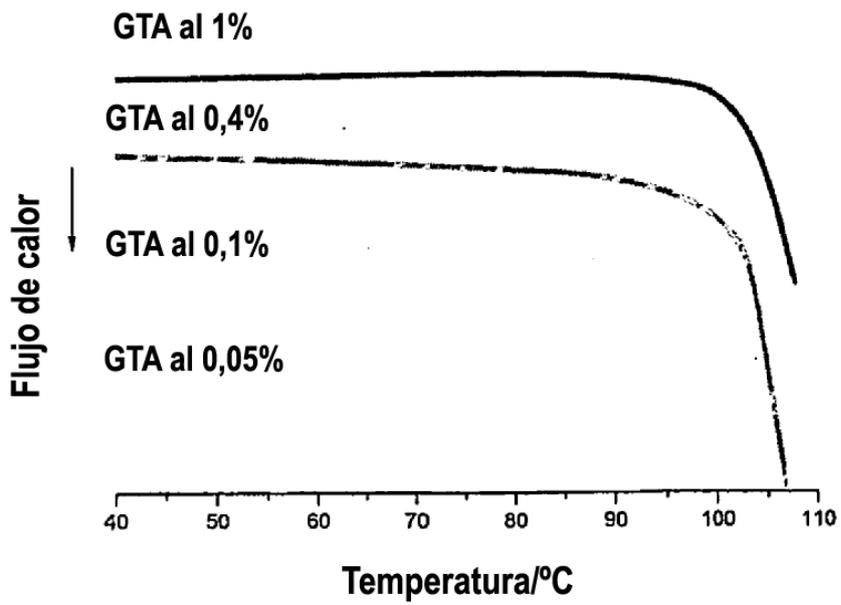


FIGURA 20

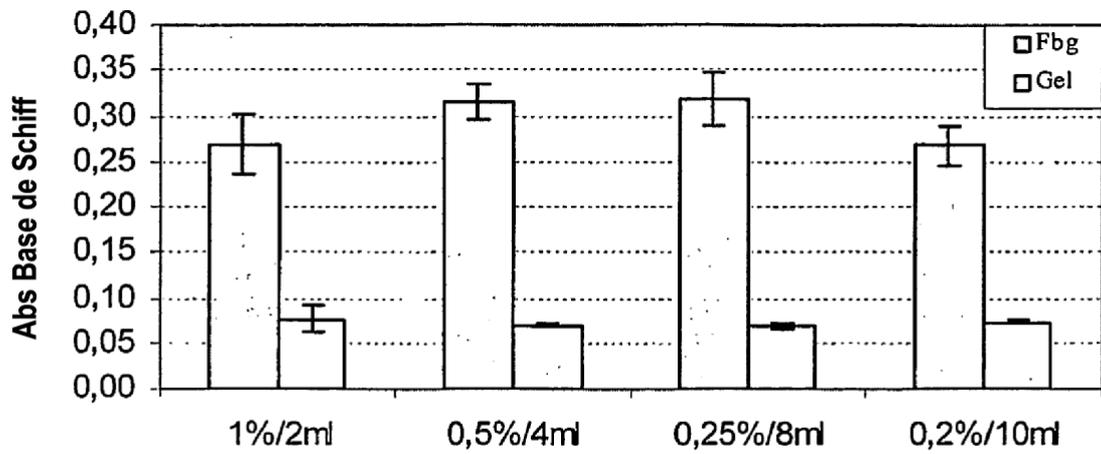


FIGURA 21

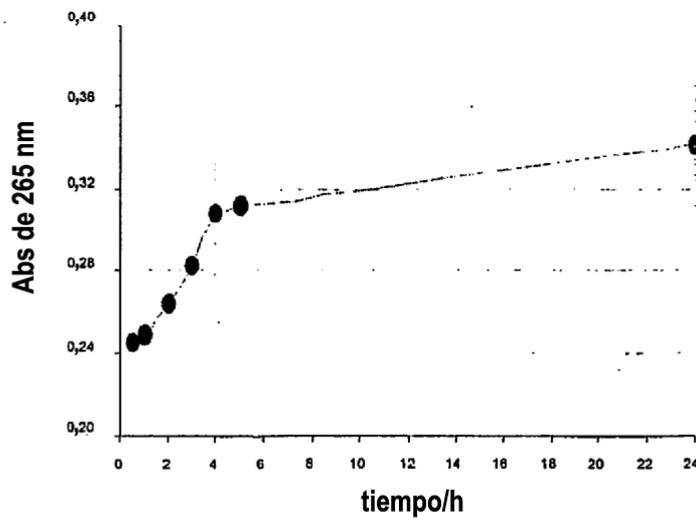


FIGURA 22

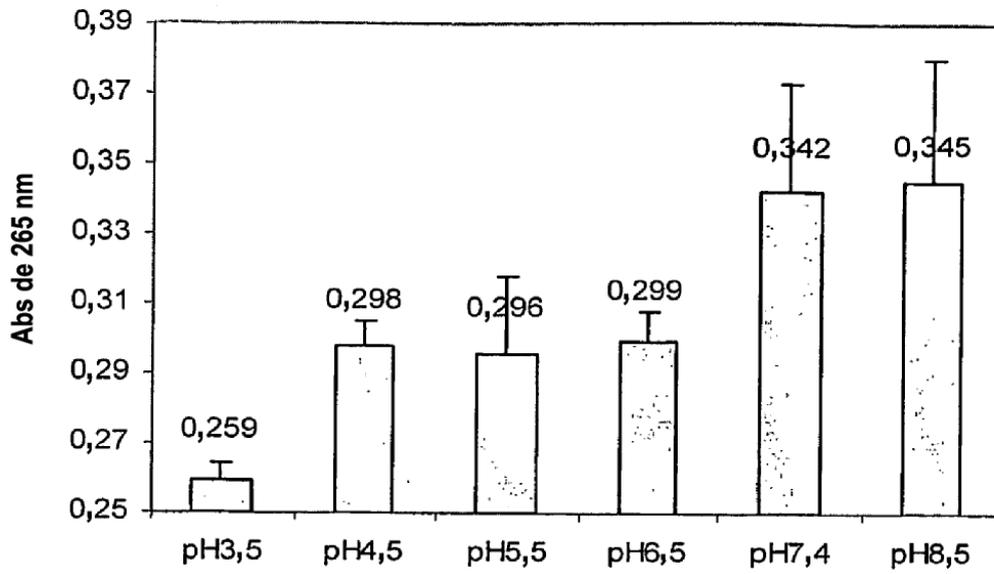


FIGURA 23

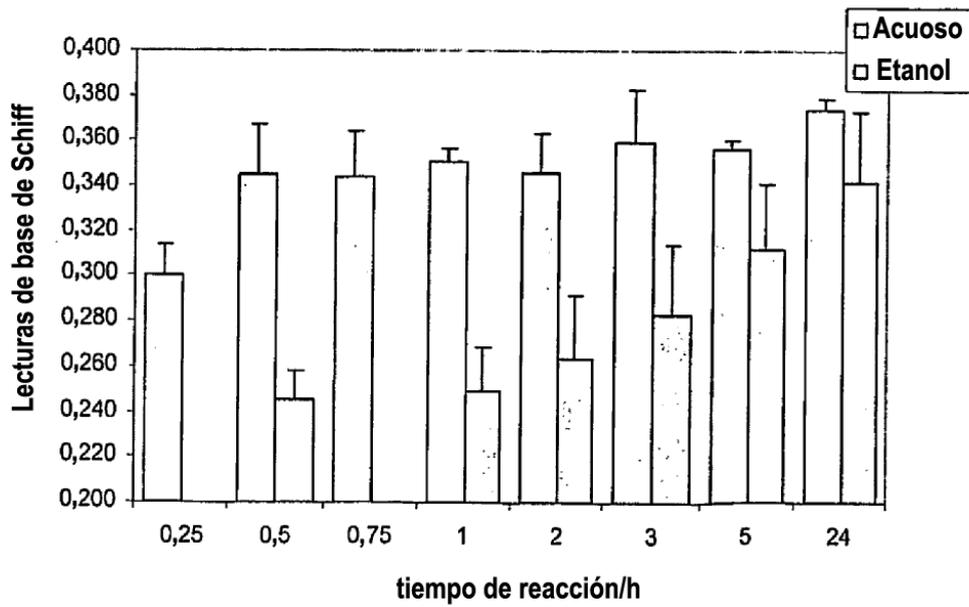


FIGURA 24

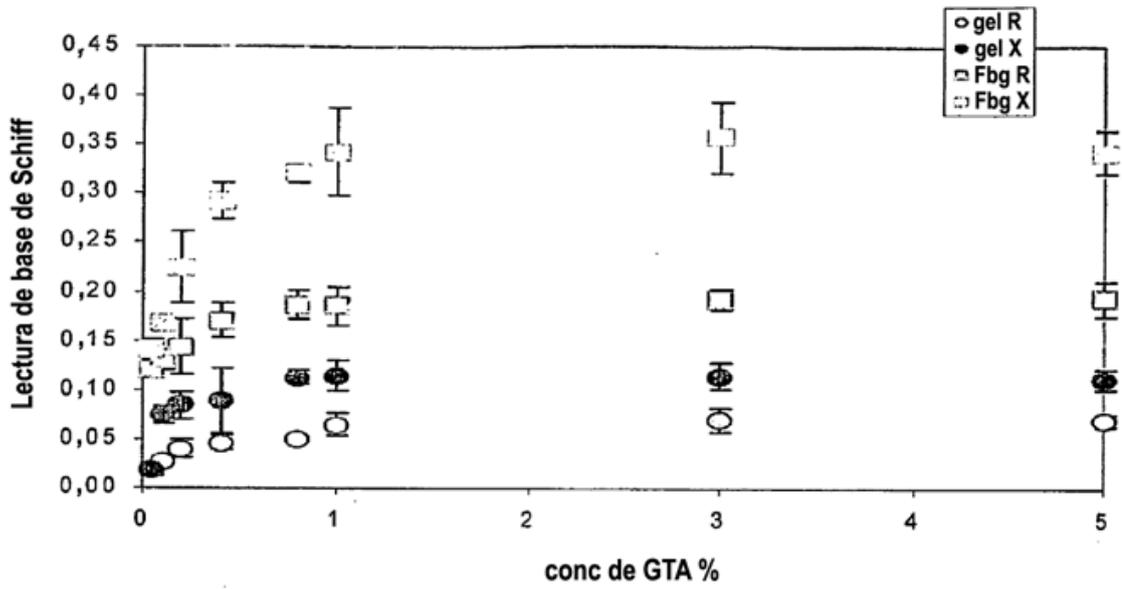


FIGURA 25

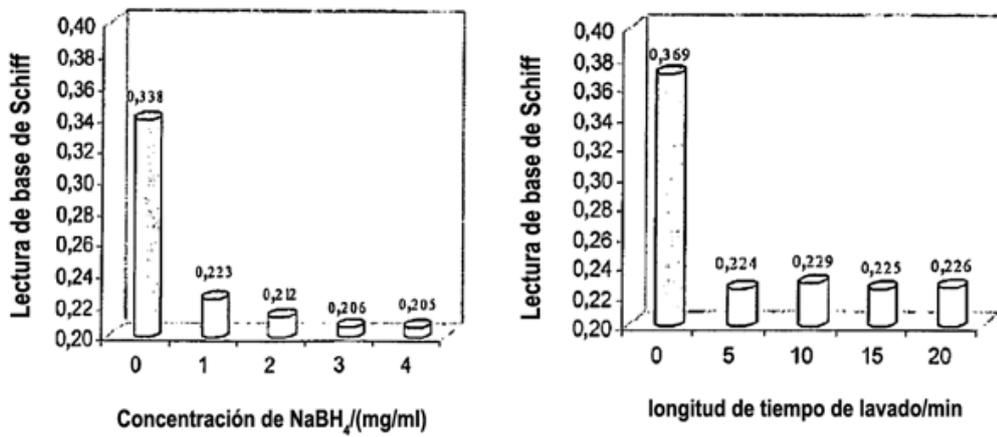


FIGURA 26

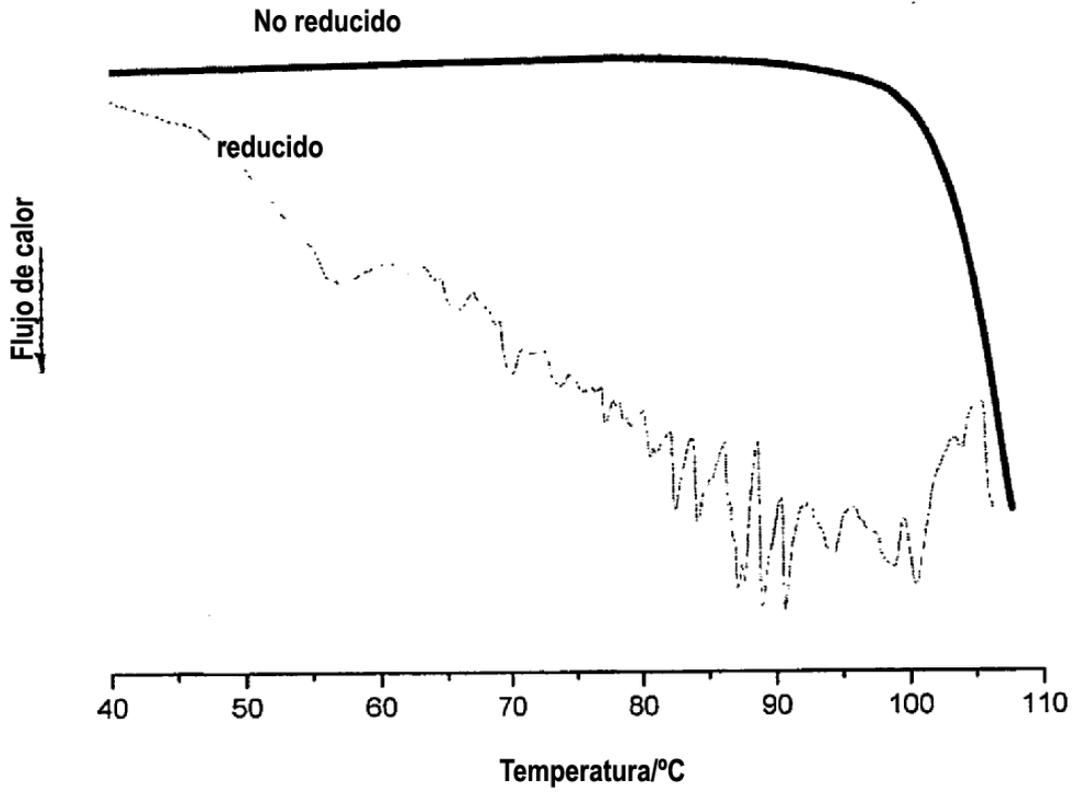


FIGURA 27

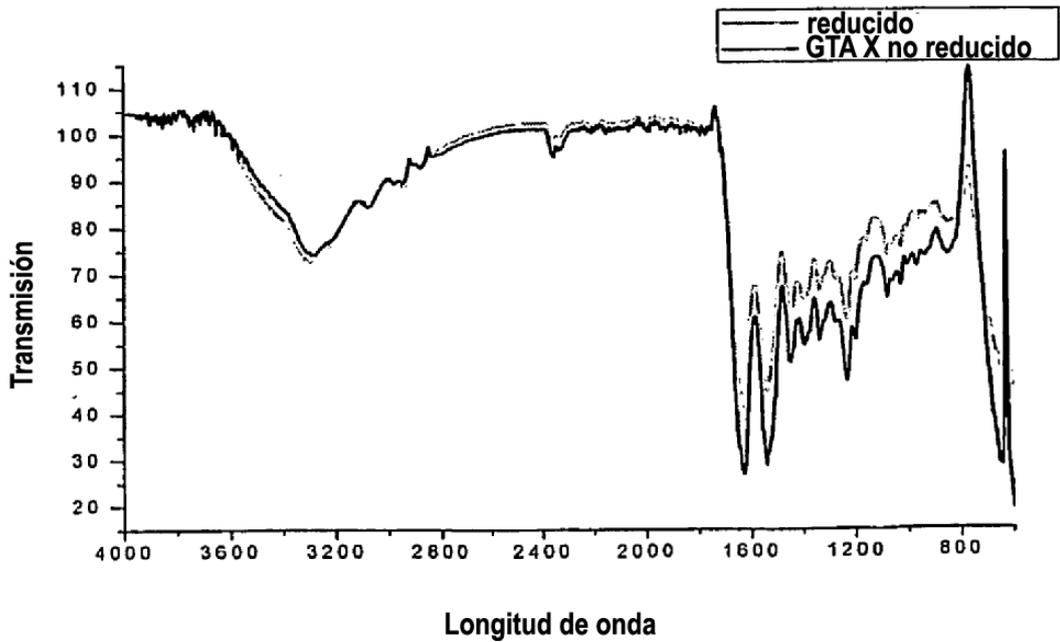


FIGURA 28

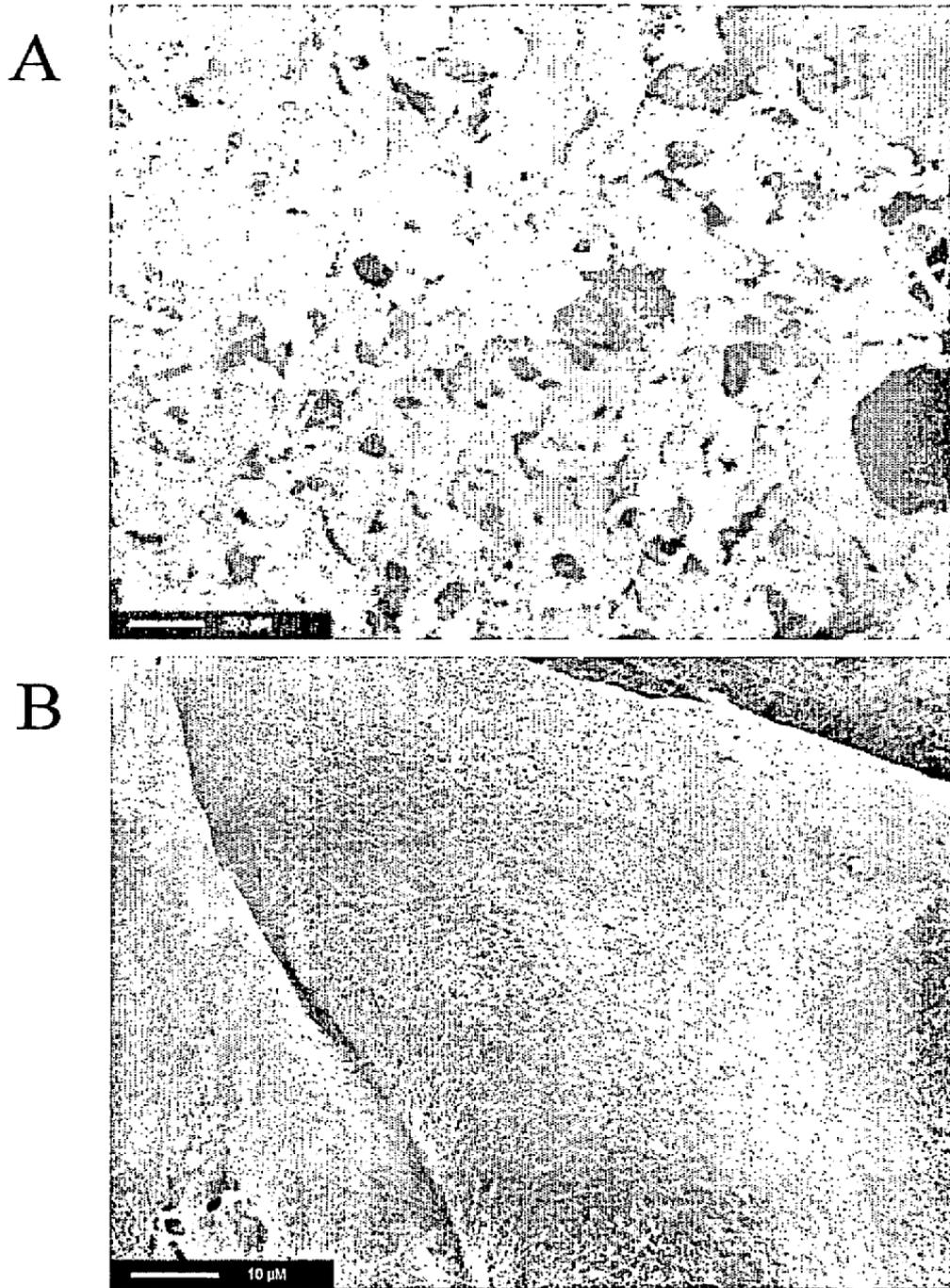
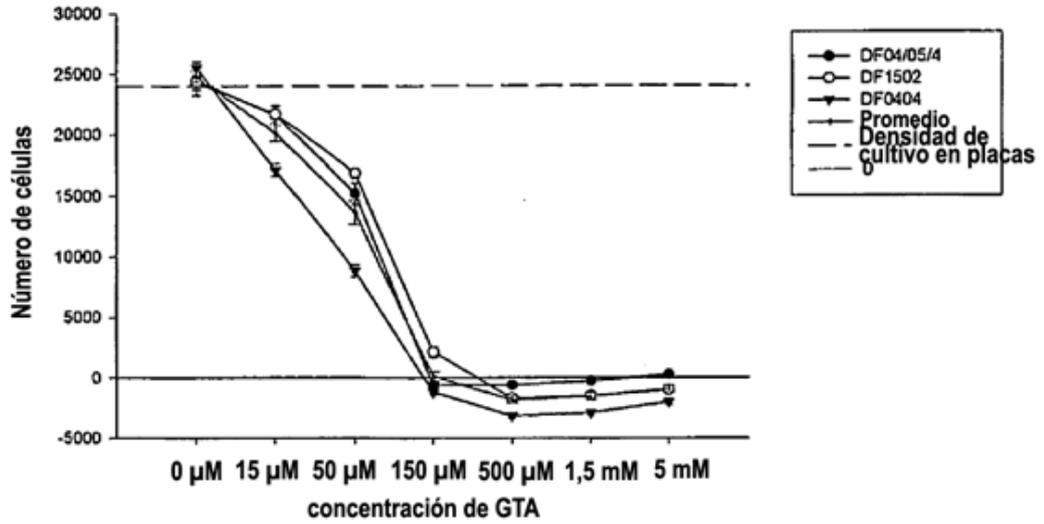


FIGURA 29

Efecto de GTA sobre la viabilidad a corto plazo de fibroblastos



Efecto de GTA sobre la proliferación de fibroblastos

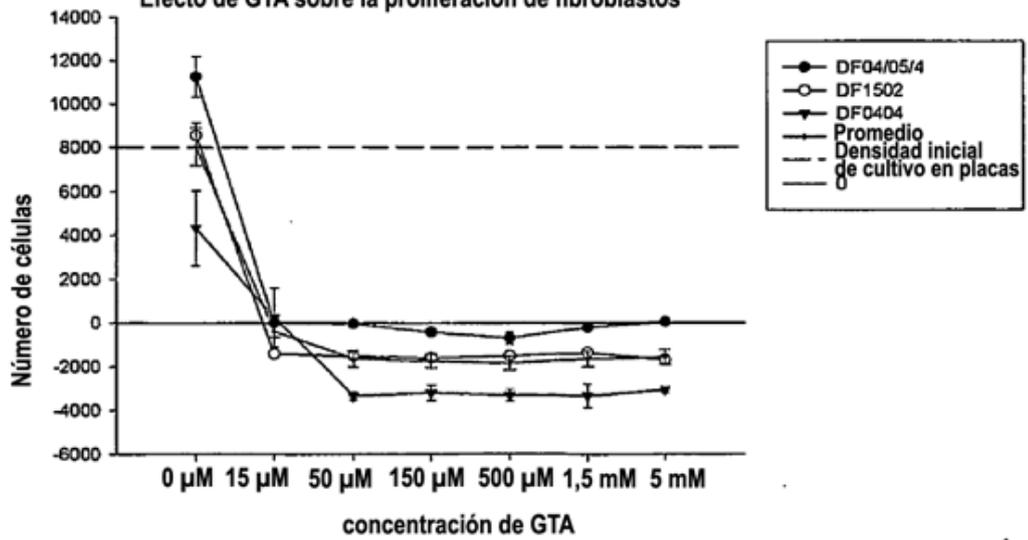
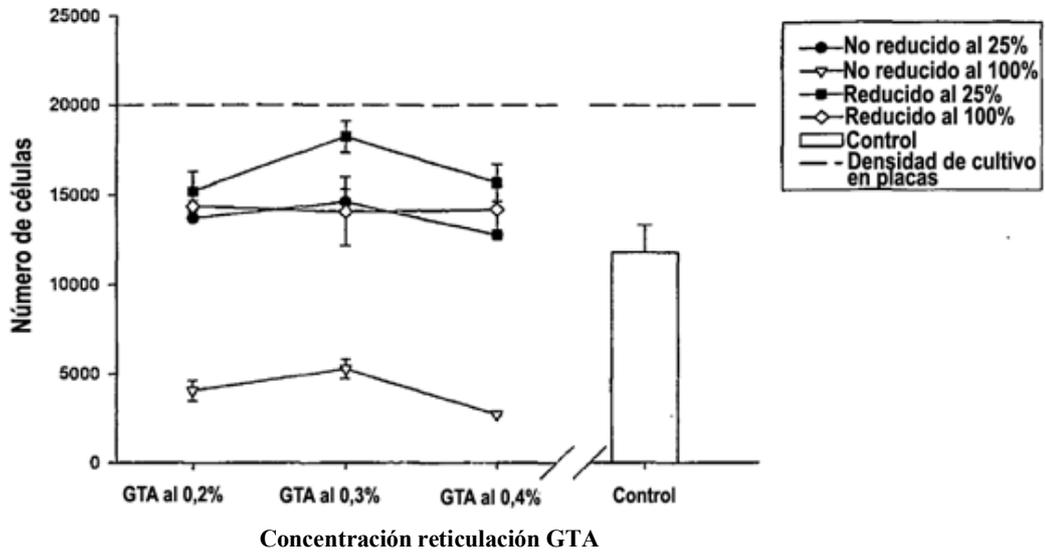


FIGURA 30

Efecto de factores solubles de matriz sobre la viabilidad a corto plazo de DF1502



Efecto de factores solubles de matriz sobre la proliferación de DF1502

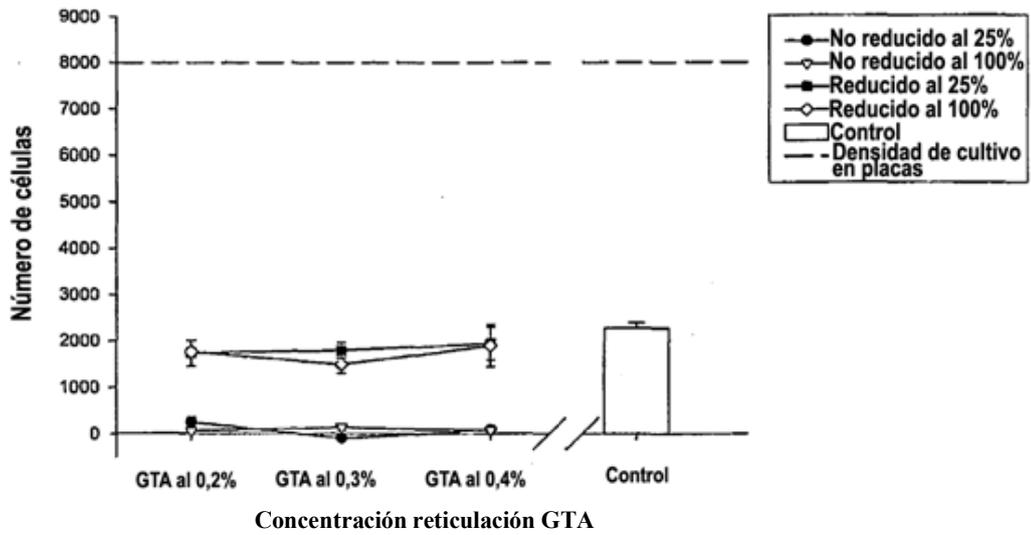


FIGURA 31

Efecto de hidrolizado de película de fibrinógeno de pH neutro sobre la viabilidad a corto plazo de fibroblastos DF06/05/4

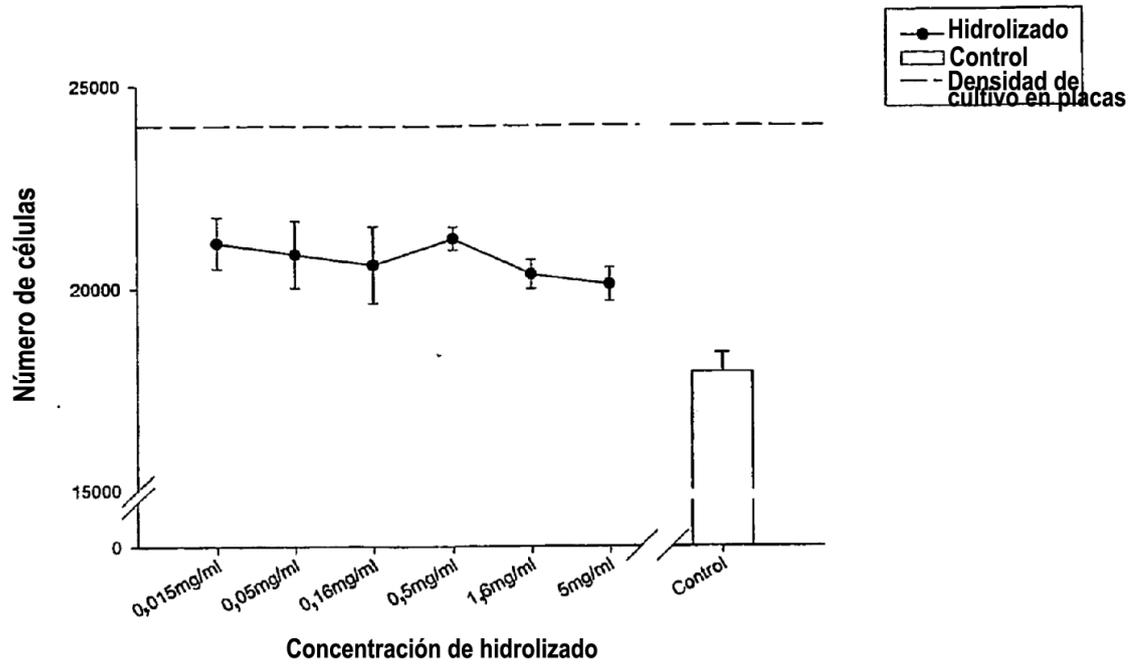
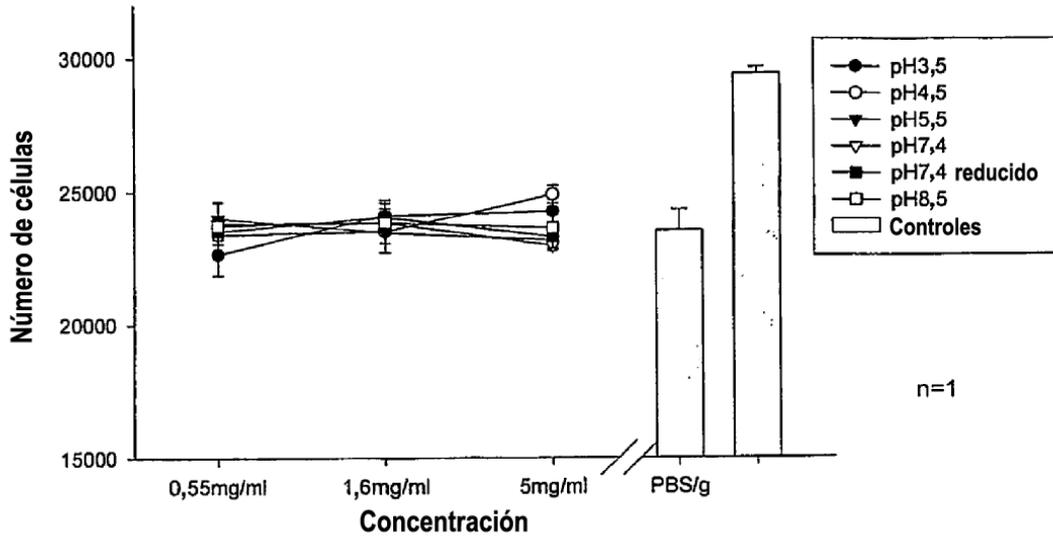


FIGURA 32

Efecto de hidrolizado sobre la viabilidad a corto plazo de fibroblasto



Efecto de hidrolizado sobre la proliferación de fibroblasto

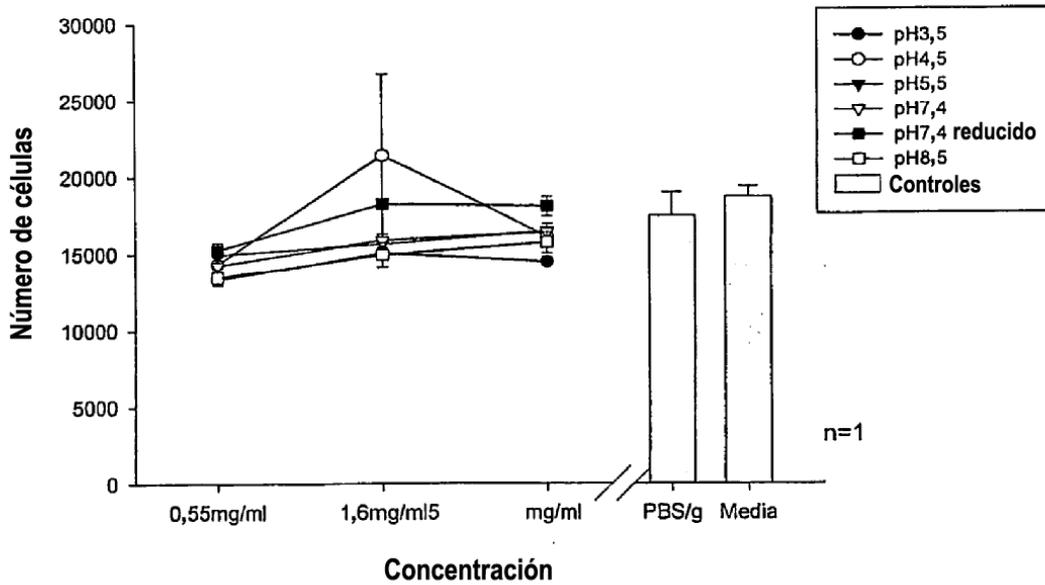
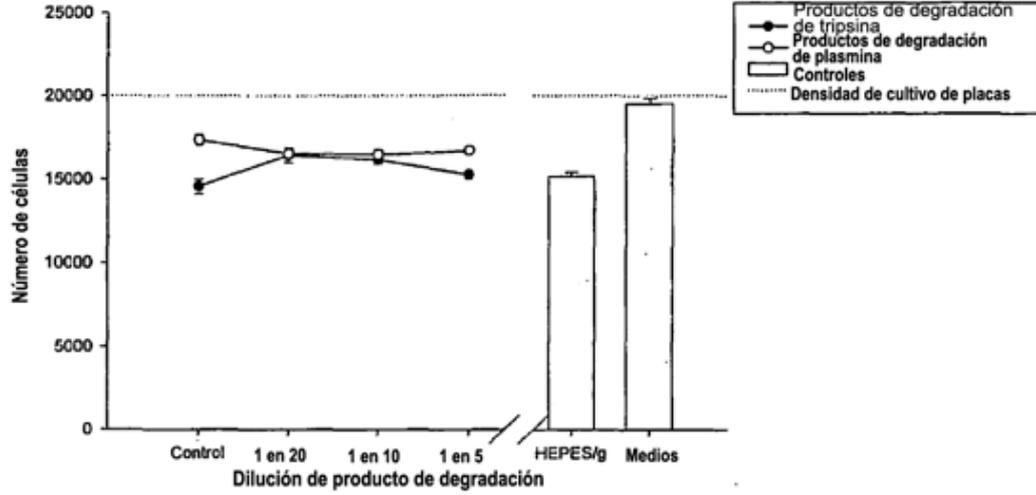


FIGURA 33

Efecto de productos de degradación de coágulo de fibrina a partir de tratamiento con plasmina y tripsina sobre la viabilidad de fibroblastos a corto plazo



Efecto de productos de degradación de coágulo de fibrina a partir de tratamiento con plasmina y tripsina sobre la proliferación de fibroblastos

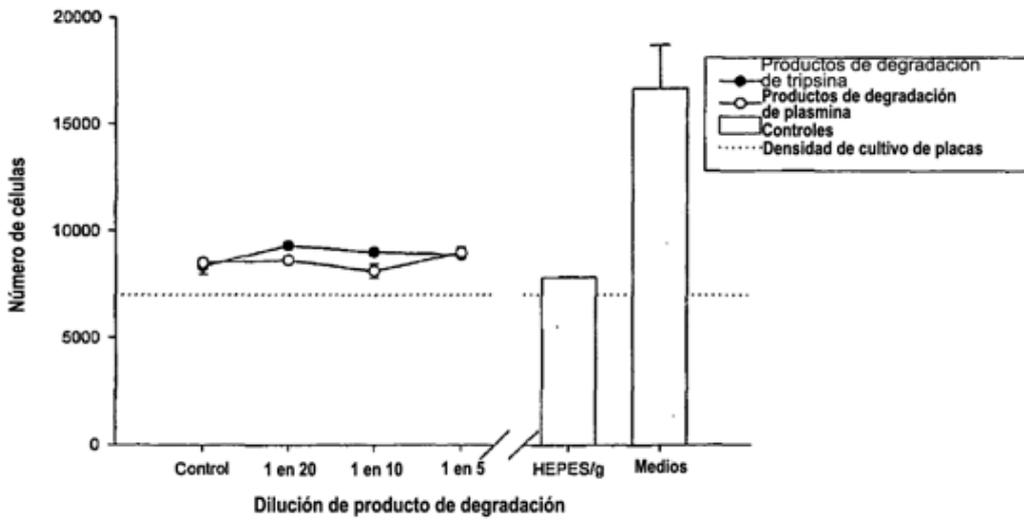
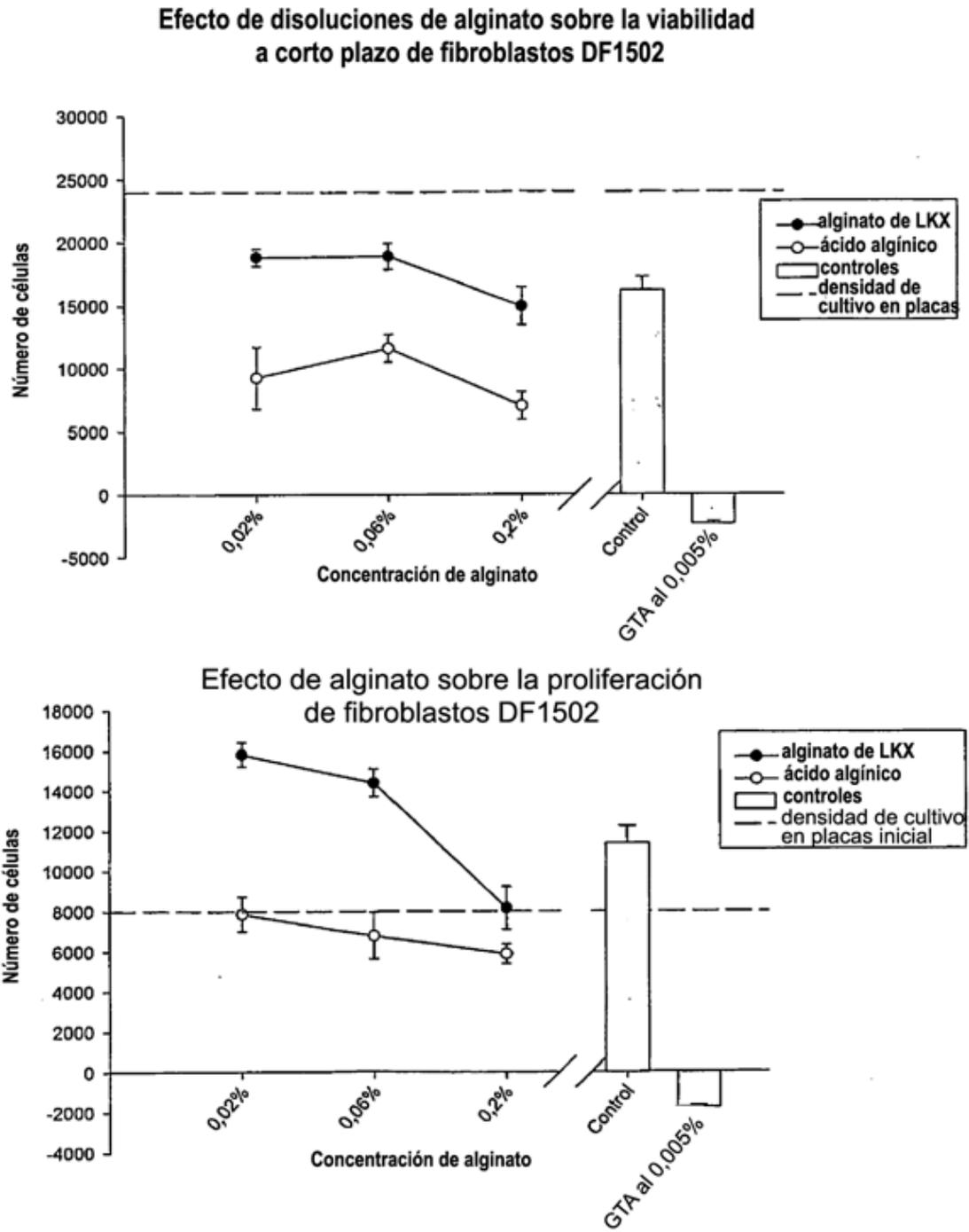


Figura 34



Respuesta de activación de neutrófilos para glutaraldehído

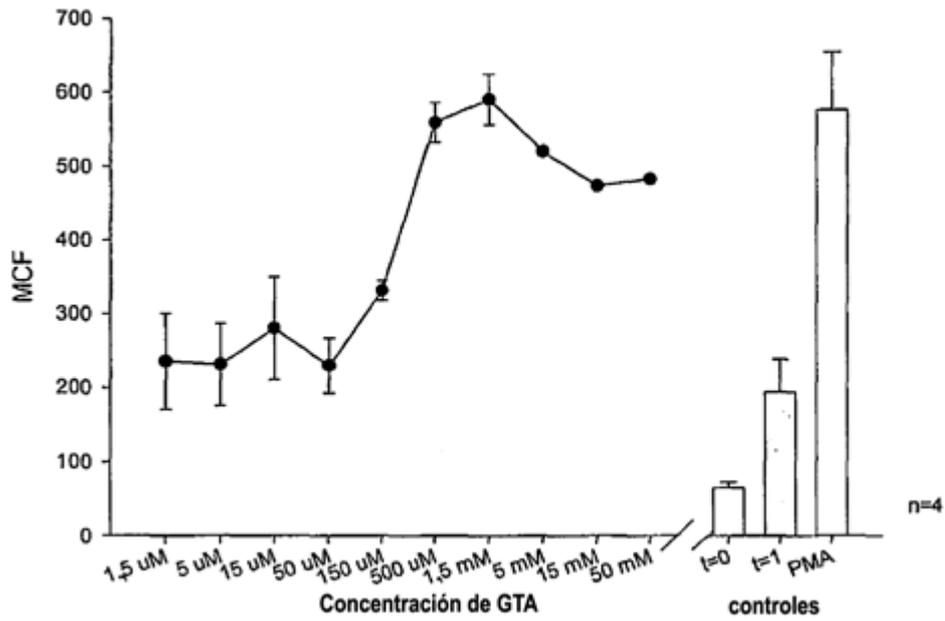


FIGURA 36

Efecto promedio de factores solubles de matriz sobre la activación de neutrófilos

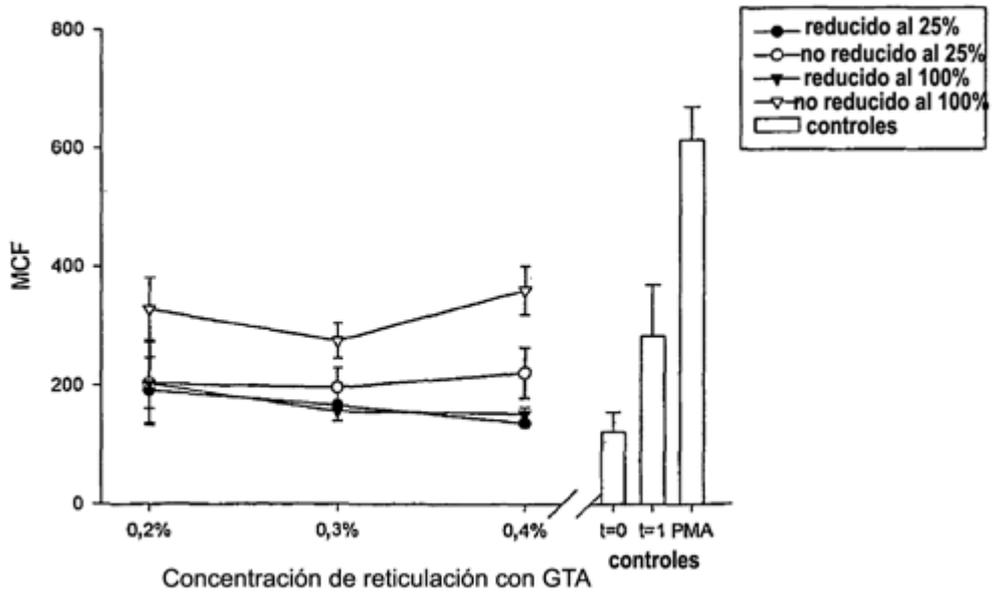


FIGURA 37

Activación de neutrófilos promedio en respuesta a hidrolizados ácidos de fibrina reticulada hidrolizada a pH diferente

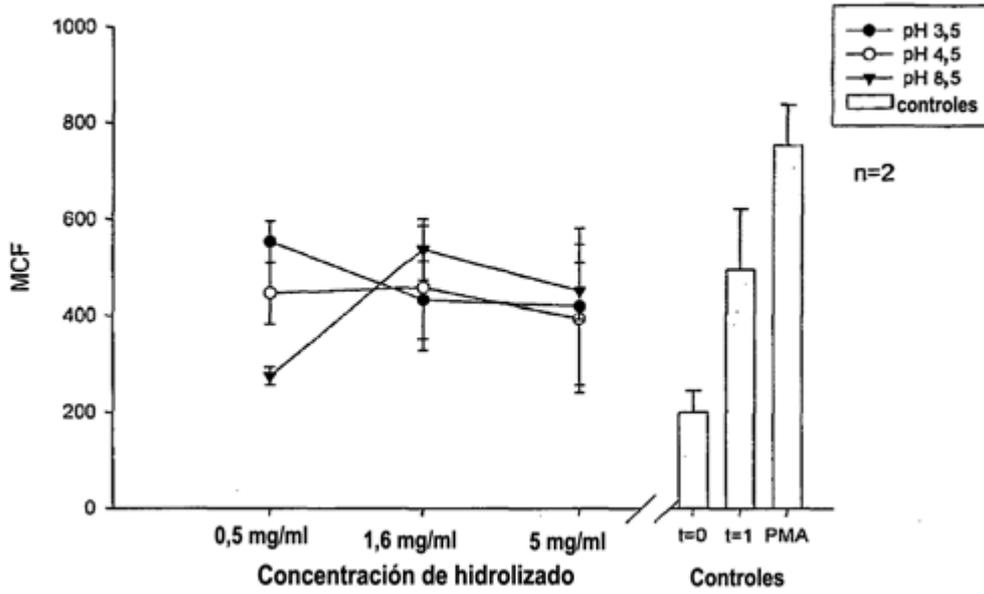


FIGURA 38

Activación de neutrófilos con hidrolizados reducidos y no reducidos

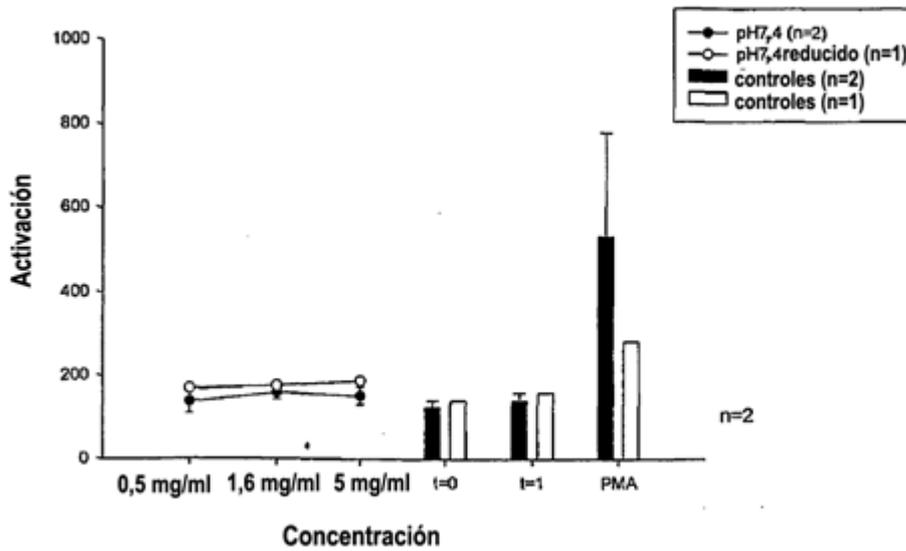


FIGURA 39

Efecto de fibrinógeno humano y bovino y fragmento de fibrina E sobre la activación de neutrófilos humanos

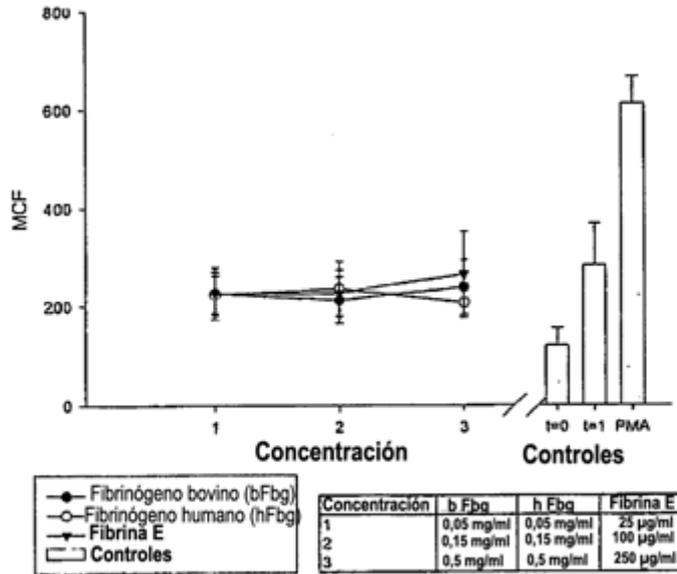


FIGURA 40

Activación de neutrófilos en respuesta a disoluciones de alginato

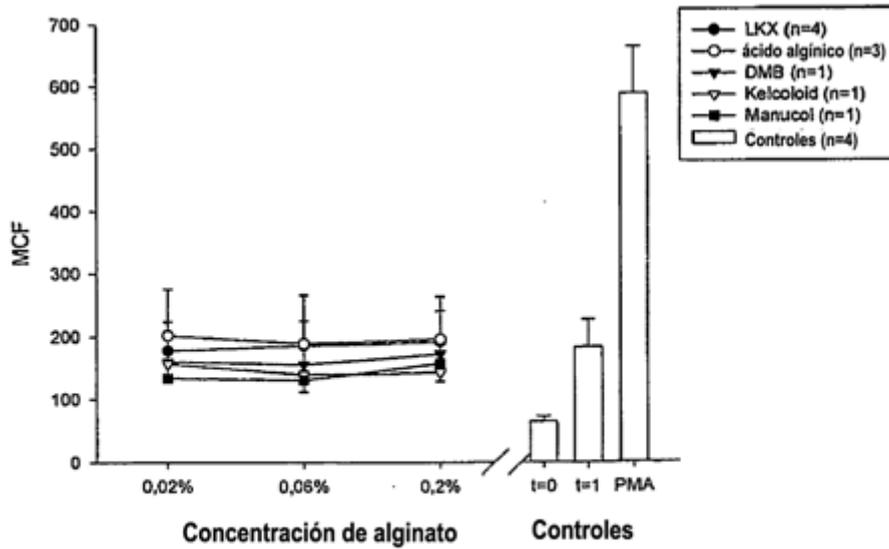


FIGURA 41

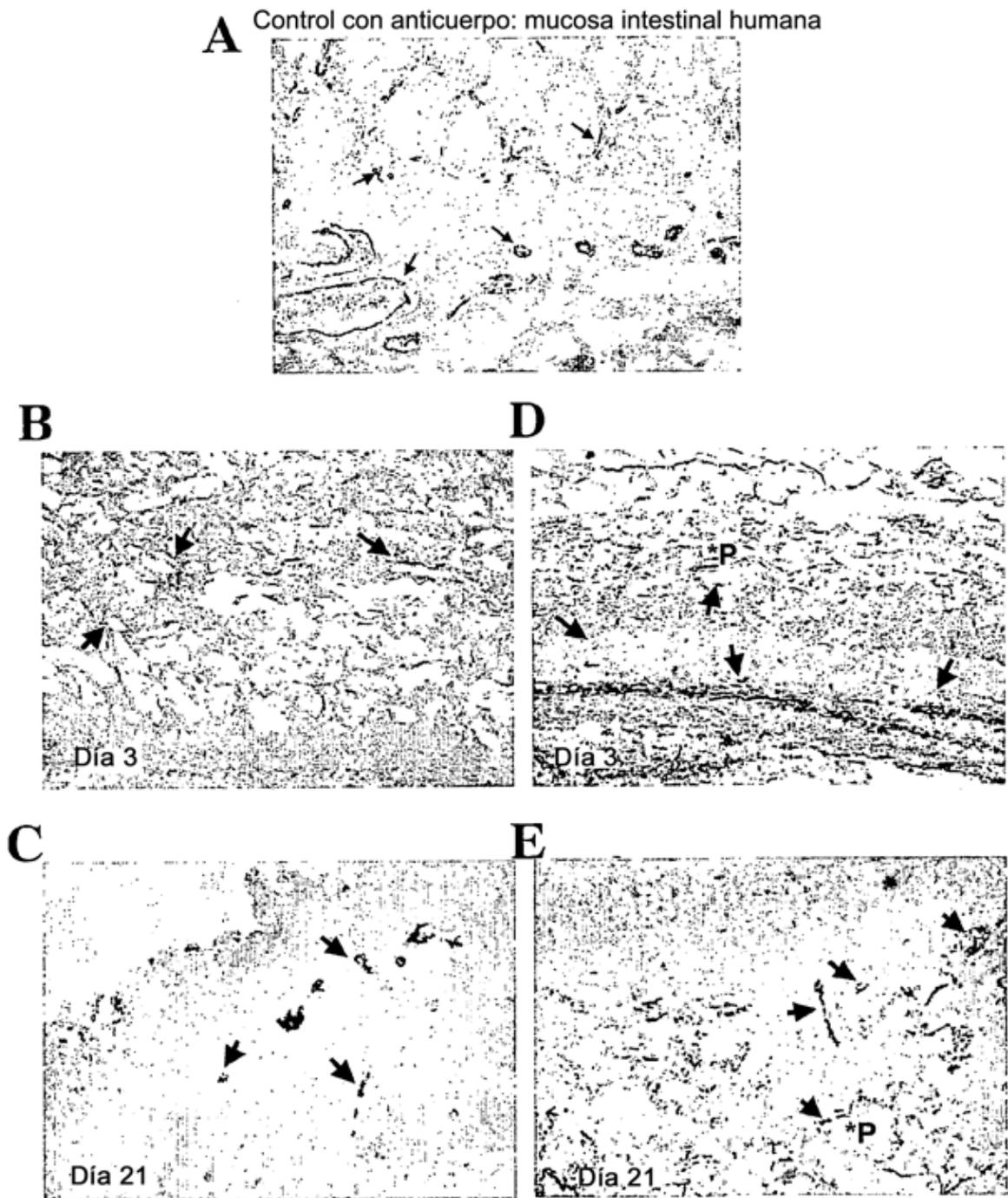


FIGURA 42