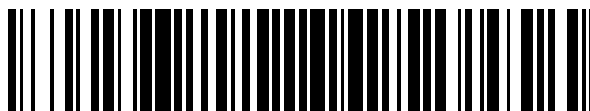


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 904**

51 Int. Cl.:

A61F 13/00 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2004** **E 04706268 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013** **EP 1592373**

54 Título: **Matrices de fibrina liofilizadas y métodos de preparación de las mismas**

30 Prioridad:

30.01.2003 IL 15420803
01.10.2003 US 507167 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.09.2013

73 Titular/es:

PROCHON BIOTECH LTD. (100.0%)
P.O. BOX 1482
76114 REHOVOT, IL

72 Inventor/es:

YAYON, AVNER;
AZACHI, MALKIT y
GLADNIKOFF, MICHA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 423 904 T3

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

DESCRIPCIÓN

Matrices de fibrina liofilizadas y métodos de preparación de las mismas

5 CAMPO TÉCNICO

10 [0001] La presente invención describe biomatrices liofilizadas compuestas de proteína plasmática sustancialmente libre de plasminógeno para aplicaciones clínicas como implantes para ingeniería tisular. Además, las biomatrices liofilizadas de proteína de plasma están sustancialmente libres de agentes antifibrinolíticos exógenos así como de agentes quelantes orgánicos. Las matrices, según la presente invención, tienen utilidad clínica, *per se* o como implantes portadores de células.

DISEÑO ANTERIOR

15 Ingeniería Tisular

20 [0002] La ingeniería de tejidos se puede definir como la técnica de reconstrucción o regeneración de tejidos en mamíferos, tanto estructural como funcionalmente (Hunziker, Osteoarth. Cart. 10:432-63,2002). La ingeniería tisular incluye, generalmente, la liberación de un soporte natural o sintético que sirve como soporte arquitectónico sobre el cual las células se pueden fijar, proliferar y sintetizar nuevos tejidos para la reconstrucción de una herida o defecto.

25 [0003] Un ejemplo de tejido propenso a sufrir daños a causa de dolencias y traumas es el cartílago articular, uno de los muchos tipos de cartílago del cuerpo, que podemos encontrar en la superficie de los huesos. Los daños en el cartílago pueden ser resultado de una enfermedad inflamatoria como la artritis reumatoide, de un proceso degenerativo como la osteoartritis o de un trauma como una fractura intraarticular o la consecutiva lesión de ligamentos. Las lesiones de cartílago están, a menudo, acompañadas de dolor y de movilidad reducida, generalmente no se curan y sin intervención médica pueden requerir la sustitución osteoarticular total.

30 [0004] Las estrategias terapéuticas actuales para reparar el cartílago dañado incluyen procedimientos que inducen una respuesta de reparación espontánea y aquellos que reconstruyen el tejido de manera estructural y funcional. Estas estrategias incluyen técnicas quirúrgicas que exponen al hueso subcondral, permitiendo así la infiltración de células progenitoras de médula ósea para iniciar la respuesta de reconstrucción. Con frecuencia, el tejido inducido es un tipo de fibrocartílago combinado sin durabilidad y cuyas mejoras clínicas son muy limitadas. La última estrategia incluye el trasplante de células o tejidos condrales u osteocondrales ya sean de origen autólogo o alogénico. El Trasplante autólogo de Condrocitos (TAC) se refiere al trasplante de condrocitos autólogos en una lesión de cartílago que ha sido aislada a partir de una biopsia del cartílago del paciente y expandida *in vitro*. De hecho, esta técnica requiere un complicado procedimiento que conlleva dos trabajos quirúrgicos y que muestra una enorme variabilidad y un éxito clínico limitado.

40 [0005] En esta disciplina, se sabe que las matrices son prácticas para la regeneración de tejidos así como para actuar como superficies biocompatibles para los mismos. Estas matrices pueden, además, ser consideradas como sustratos para el crecimiento de las células, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Las matrices para el crecimiento tisular y/o la regeneración incluyen tanto entidades biodegradables como bioestables. Entre las múltiples posibilidades que se pueden utilizar como matrices de soporte para el crecimiento o la regeneración de tejidos se encuentran los geles, las espumas, las placas y ciertas estructuras porosas de diferente forma y tamaño.

50 [0006] En el pasado se han utilizado como apósitos o implantes materiales porosos formados a partir de materiales sintéticos y/o materiales biodegradables de origen natural. Un material poroso proporciona un soporte estructural y un soporte para el crecimiento intracelular y la regeneración tisular. Preferiblemente, el material poroso se degrada de manera gradual, siendo absorbido como tejido regenerado. Los materiales bioreabsorbibles que suelen utilizarse en la fabricación de apósitos porosos o implantes incluyen polímeros y biopolímeros sintéticos como pueden ser las proteínas estructurales y los polisacáridos. Los biopolímeros pueden ser seleccionados o modificados de manera que se modifiquen sus propiedades fisicoquímicas para proporcionar mayor flexibilidad o menor vulnerabilidad a la degradación.

55 [0007] Se ha descubierto que numerosos polímeros naturales son útiles en la ingeniería tisular o de cultivos, incluyendo distintos constituyentes de la matriz extracelular como la fibronectina, algunos tipos de colágeno y laminina, como la queratina, la fibrina y el fibrinógeno, el ácido hialurónico, el heparán sulfato y el sulfato de condroitina entre otros. Las patentes US 6,425,918 y 6,334,968 describen una esponja polisacárida liofilizada bioreabsorbible y su uso como matriz o soporte para ser implantada en un paciente.

60 Fibrina

65 [0008] El fibrinógeno es una importante proteína plasmática que participa en el proceso de coagulación de la sangre. Una vez dañado el vaso sanguíneo, el fibrinógeno se convierte en fibrina insoluble que sirve como estructura para el coágulo. La coagulación de la sangre es un proceso complejo que comprende la interacción secuencial de un

número de proteínas de plasma, en particular de fibrinógeno (factor I), protrombina (factor II), factor V y factores VII-XIII. También forman parte de la formación de los coágulos sanguíneos otras proteínas plasmáticas como el factor de Von Willebrand, las inmunoglobulinas, los factores de coagulación y los componentes del complemento.

[0009] En esta disciplina, la fibrina se conoce como adhesivo tisular de uso médico eficaz para la reconstrucción de heridas y la reparación del tejido. El concentrado proteico liofilizado derivado del plasma (compuesto de fibrinógeno, factor XIII y fibronectina), en presencia de trombina e iones de calcio da lugar a un sellador biológico inyectable (goma de fibrina). La patente US 5,411,885 describe un método de incrustación y cultivo de tejidos con el uso de la goma de fibrina.

[0010] La patente US 4,642,120 explica el uso de gomas que contienen fibrinógeno en combinación con células mesenquimales autólogas o condrocíticas como método para favorecer la reparación de los defectos en cartílago y hueso. La patente US 5,260,420 describe un método para la preparación y el uso de pegamentos biológicos compuestos de proteínas plasmáticas de uso terapéutico. La patente US 6,440,427 describe un compuesto adhesivo formado en su mayor parte de componentes precursores de fibrina y de un polisacárido como el ácido hialurónico que mejora la viscosidad. Itokazu (Itokazu et al., Infection 25:359-63, 1997) describió un coágulo de fibrina liofilizada para la liberación prolongada de antibióticos.

[0011] La patente US 5,972,385 revela una matriz liofilizada de polisacárido de colágeno reticulado que se administra solo o en combinación con otros terapéuticos para la reparación de tejido. Las patentes US 5,206,023 y US 5,368,858 describen una composición de reparación de cartílago que consiste en una matriz biodegradable, una proliferación o y un factor de transformación.

[0012] En las patentes US 4,442,655 y EP 0068149 se describe una estructura de fibrinógeno liofilizado con estructura de malla que puede utilizarse para el tratamiento de heridas, como material de relleno de cavidades óseas o como soporte de sustancias activas para la liberación controlada. La estructura se prepara por la mezcla de fibrinógeno y solución de trombina, a continuación se verta en un molde, se congela y se liofiliza.

[0013] En las patentes US 6,310,267 y 6,486,377 se describe una membrana de fibrina liofilizada para la cicatrización de heridas. La preparación de esta membrana requiere una diálisis de una o varias etapas de la solución de fibrinógeno. Según esta divulgación, la diálisis de una o varias etapas de la solución de fibrinógeno cambia radicalmente su composición reduciendo la concentración de sales y aminoácidos. Esta diálisis se lleva a cabo en una solución acuosa de una sal inorgánica fisiológicamente compatible y un agente complejante orgánico.

[0014] En la patente WO 99/15209 se describe una esponja de fibrina que contiene un activador de coagulación de la sangre para hemostasis, adhesión de tejidos, cicatrización de heridas y cultivo celular. De acuerdo con esta publicación, la restauración de la humedad o el contenido de agua tras la liofilización es crucial para obtener una esponja suave, adaptable y absorbente. La esponja puede estar impregnada de aditivos tales que activadores de coagulación de la sangre, estabilizadores, conservantes y otros agentes.

[0015] Las patentes US 5,466,462 y 5,700,476 describen una esponja heteromófica bioreabsorbible compuesta de una matriz biopolimérica, al menos una subestructura y al menos un agente farmacológicamente activo. Las subestructuras permiten la incorporación de uno o más agentes activos al producto final para la liberación física. La patente US 5,443,950 está relacionada con el crecimiento de células derivadas de un tejido deseado en una matriz estromal establecida anteriormente. Además, en la patente US 5,842,477 se describe un método de reconstrucción del cartílago *in vivo* mediante la implantación de un armazón biocompatible tridimensional en combinación con tejido del periosteo/pericondral y células estromales, con o sin agentes bioactivos.

Fibrinólisis

[0016] Los actuales implantes de fibrina liofilizada destinados a la ingeniería tisular se preparan utilizando soluciones de fibrinógeno o de proteína plasmática, dando lugar a proteasas que pueden comprometer la estabilidad de ciertas proteínas plasmáticas y llevar a la degradación de la matriz. El plasminógeno es una importante proteína plasmática que se une a la fibrina durante la formación del coágulo. Dentro del coágulo o matriz, el plasminógeno es convertido enzimáticamente en plasmina, resultado de la degradación del coágulo o de la matriz, que actúa como agente fibrinolítico. Normalmente, este proceso se retrasa añadiendo agentes antifibrinolíticos a la composición, incluyendo, entre otros, aprotinina, ácido ϵ -aminocaproico o ácido tranexámico. Estos agentes pueden provocar efectos nocivos en el crecimiento, la proliferación y/o la diferenciación celular, o pueden causar reacciones adversas en pacientes. Esta disciplina no ha dado, hasta el momento, una matriz liofilizada de fibrina estable sustancialmente libre de agentes antifibrinolíticos exógenos.

[0017] La solicitud internacional de patente en tramitación WO 03/007873 realizada por algunos de los inventores de la presente invención, revela una matriz liofilizada de proteína plasmática compuesta de proteínas de plasma y, al menos, un agente antifibrinolítico, también puede estar compuesta de otros excipientes para mejorar ciertas propiedades físicas, mecánicas y biológicas de la matriz.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0019] La presente invención describe biomatrices sustancialmente libres de agentes antifibrinolíticos externos, pues se ha demostrado que son perjudiciales para células y tejidos y que pueden ocasionar reacciones adversas en pacientes. Es ahora cuando por primera vez se divulga que las matrices flexibles y resistentes, también conocidas como esponjas, que son particularmente beneficiosas como soporte para el crecimiento tridimensional de células, se puede obtener de proteínas plasmáticas libres de plasminógeno, evitando de este modo la necesidad de agentes antifibrinolíticos externos. También se describe más adelante que las biomatrices, que se obtuvieron de manera inesperada a partir de proteínas de plasma parcialmente purificadas, también evitan la necesidad de agentes antifibrinolíticos exógenos. Las composiciones y los métodos de la presente invención son efectivos en aplicaciones tanto *in vivo* como *in vitro*, incluyendo implantes biocompatibles en ingeniería tisular y en biotecnología para el cultivo y la diferenciación de células *in vitro*. Las matrices, según la presente invención, son tridimensionales (3D) y se pueden utilizar clínicamente *per se* o como implantes portadores de células. La presente invención explica todos los componentes fundamentales para la reconstrucción de tejidos, facilitando así la tarea del profesional médico y proporcionando una alternativa mejor para la reconstrucción y regeneración de tejidos del paciente.

[0020] La presente invención revela una matriz de fibrina porosa liofilizada formada a partir de proteínas de plasma que incluyen fibrinógeno, trombina y Factor III. La matriz tiene menos del 10% de humedad residual y está libre de agentes antifibrinolíticos exógenos y de agentes quelantes orgánicos, mostrando así mejores características. La presente invención está basada parcialmente en el hallazgo inesperado de que una matriz compuesta de proteínas plasmáticas libre de agentes antifibrinolíticos exógenos y plasminógeno transmite más estabilidad y mejora significativamente la inoculación y dispersión de células, pero mantiene otras propiedades positivas de estas matrices. Las matrices, en particular las que están libres de plasminógeno, muestran una reabsorbibilidad reducida si se comparan con las matrices de fibrina hasta ahora conocidas, dando lugar a un implante de larga duración con estabilidad y resistencia mejoradas para el correcto desarrollo, reconstrucción y regeneración de tejidos.

[0021] La presente invención expone una matriz de fibrina porosa liofilizada formada a partir de proteínas de plasma que incluyen fibrinógeno, trombina y Factor III. La matriz tiene menos del 10% de humedad residual y está libre de agentes antifibrinolíticos exógenos, de plasminógeno y de agentes quelantes orgánicos. En una realización sustancialmente libre de plasminógeno se refiere a la solución de proteína plasmática que contiene menos del 20% del plasminógeno presente normalmente en el plasma sanguíneo, menos del 10% del plasminógeno normalmente presente en el plasma y más preferiblemente menos del 5% del plasminógeno normalmente presente en el plasma. Los inventores han descubierto que una matriz de fibrina porosa liofilizada compuesta de proteínas plasmáticas libres de plasminógeno presenta una matriz mejorada para aplicaciones clínicas y biotecnológicas. Además de eliminar la necesidad de agentes antifibrinolíticos exógenos y sus consecuentes efectos nocivos, los inventores ahora muestran que la matriz de fibrina de la presente invención es mejor como armazón para la inoculación, el crecimiento y la diferenciación celular, así como para su uso en la regeneración y reconstrucción de tejidos.

[0022] La matriz de fibrina de la invención se puede utilizar *per se*, incluyendo las proteínas plasmáticas sustancialmente libres de agentes antifibrinolíticos exógenos y de agentes quelantes, para aplicaciones clínicas y biotecnológicas. Cabe mencionar, sin embargo, aditivos que mejoran las características biológicas, físicas y mecánicas de la matriz. La presente invención incluye la incorporación en la matriz de al menos un aditivo para producir una matriz con propiedades biológicas, mecánicas y/o físicas mejoradas.

[0023] La solicitud internacional de patente en tramitación WO 03/007873 realizada por algunos solicitantes de la presente invención revelan una matriz de fibrina compuesta de proteínas de plasma y, al menos, un agente antifibrinolítico, de manera opcional también compuesta de agentes como polisacáridos, polisacáridos aniónicos, glicosaminoglicanos o polímeros sintéticos añadidos a la preparación para mejorar ciertas propiedades físicas, mecánicas y biológicas de la matriz. De esta manera, se elimina o supera la necesidad de un agente antifibrinolítico por la ausencia sustancial de plasminógeno en la matriz.

[0024] En una realización, la presente invención está relacionada con una matriz de fibrina porosa sustancialmente libre de agentes antifibrinolíticos exógenos, plasminógeno y agentes quelantes orgánicos comprendiendo, al menos, un aditivo seleccionado de un grupo consistente en polisacáridos, glicosaminoglicanos (GAGs) y polímeros sintéticos que sirve como soporte para el crecimiento y la diferenciación celular tanto *in vitro* como *in vivo*.

[0025] Según una realización, el aditivo se puede añadir *ab initio*, por ejemplo, durante la formación del coágulo. Según otras realizaciones alternativas, el aditivo se introduce en la matriz en cualquier momento tras la formación de la misma. Según diversas realizaciones llevadas a cabo durante la presente invención, la matriz se prepara usando al menos un glicosaminoglicano seleccionado del grupo consistente en ácido hialurónico reticulado, ácido hialurónico no reticulado, heparina, derivados de heparina y miméticos de heparina, condroitín sulfato, dextrán sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato y queratán sulfato.

[0026] El glicosaminoglicano se añade a la matriz como concentración final que proporciona flexibilidad y elasticidad a la matriz y descarta la necesidad de ajustar el contenido de humedad de la composición final. Según

una realización llevada a cabo durante la presente invención, el glicosaminoglicano se selecciona del ácido hialurónico reticulado y no reticulado. En una realización la concentración de ácido hialurónico no reticulado es de 0,005% a un 0,5% final (V/V) pero es preferible que sea de 0,05% a un 0,1%. En otra realización la concentración de ácido hialurónico reticulado es de 0,001% a un 0,1% y es preferible que sea de 0,05% a un 0,09% final (V/V). Según otra realización el glicosaminoglicano se selecciona de la heparina y sus derivados.

[0027] La presente invención incluye además una matriz de fibrina compuesta de al menos un agente bioactivo seleccionado del grupo consistente en proteínas terapéuticas, plaquetas y sobrenadante plaquetario, analgésicos, agentes antimicrobianos o antiinflamatorios y enzimas.

[0028] Según una realización, la presente invención proporciona una matriz porosa liofilizada compuesta de proteínas plasmáticas sustancialmente libres de agentes antifibrinolíticos exógenos, plasminógeno y agentes quelantes orgánicos, además de estar compuesta por al menos un glicosaminoglicano y al menos un agente bioactivo.

[0029] Según otra realización llevada a cabo en la presente invención, al menos un agente bioactivo es una proteína terapéutica seleccionada del grupo consistente en factores de crecimiento y sus derivados. Por un lado, el factor de crecimiento es seleccionado de un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y de sus variantes. Por otro lado, el FGF es un FGF con capacidad para inducir o mejorar la reconstrucción y regeneración de cartílago y hueso y/o la angiogénesis. Los factores de crecimiento se pueden incorporar en un amplio rango de concentraciones, dependiendo de la potencia del factor y la aplicación deseada.

[0030] Para ciertas aplicaciones, se prefiere la liberación prolongada o por fases de un agente bioactivo. En una realización, se incorpora el al menos un factor de crecimiento directamente a la matriz de fibrina, *ab initio*. En otra realización, el al menos un factor de crecimiento se une a una molécula transportadora como la heparina y se incorpora a la matriz *ab initio*. La liberación prolongada de un agente bioactivo depende de diversos factores, como la concentración del factor de crecimiento, el tipo de glicosaminoglicano que se incorpora y la concentración de fibrina y trombina.

[0031] En comparación con las actuales esponjas heteromorfas bioreabsorbibles, la presente invención descubre una esponja de fibrina liofilizada compuesta de proteínas de plasma sustancialmente libres de agentes antifibrinolíticos exógenos, plasminógeno y agentes quelantes orgánicos, que puede estar compuesta además de al menos un aditivo seleccionado del grupo consistente en polisacáridos, glicosaminoglicanos y polímeros sintéticos, además de al menos un agente bioactivo.

[0032] Según la realización, la presente invención proporciona una matriz de fibrina porosa liofilizada compuesta de proteínas plasmáticas sustancialmente libres de agentes antifibrinolíticos exógenos, plasminógeno y de agentes quelantes orgánicos, además de al menos un glicosaminoglicano y un agente bioactivo. Según otra realización llevada a cabo durante la presente invención, el, al menos, un glicosaminoglicano se selecciona de la heparina y sus derivados, el agente bioactivo es una proteína terapéutica seleccionada de la familia de factores de crecimiento FGF y sus derivados. Esta esponja proporciona una liberación gradual del FGF de la matriz y puede ser beneficiosa en ciertas aplicaciones terapéuticas.

[0033] Según otra realización, la presente invención revela una matriz de fibrina porosa liofilizada compuesta de proteínas plasmáticas sustancialmente libres de agentes antifibrinolíticos exógenos, plasminógeno y agentes quelantes orgánicos, además de ácido hialurónico, heparina y, al menos, un agente bioactivo. El ácido hialurónico es seleccionado a partir de ácido hialurónico reticulado y no reticulado. De preferencia, el ácido hialurónico y la heparina o los derivados de heparina se incorporan a la esponja *ab initio*. El agente bioactivo, como un factor de crecimiento, se puede incorporar a la esponja *per se* o junto a heparina. De preferencia, el factor de crecimiento se selecciona de la familia de moléculas terapéuticas de FGF.

[0034] Otro aspecto de la invención proporciona un método de preparación de la matriz de fibrina porosa. El método de preparación de una matriz de fibrina porosa liofilizada con menos del 10% de humedad residual y sustancialmente libre de agentes antifibrinolíticos exógenos, plasminógeno y agentes quelantes orgánicos comprende los siguientes pasos:

proporcionar una solución de trombina y una solución de proteína plasmática en la que esta está sustancialmente libre de agentes antifibrinolítico exógenos, plasminógeno y agentes quelantes orgánicos;

Introducir la solución de trombina y la solución de proteína plasmática en un soporte sólido o molde en presencia de iones de calcio;

Incubar en las condiciones apropiadas para conseguir la coagulación;

Congelar la mezcla coagulada; y

Liofilizar la mezcla coagulada, para obtener una esponja, y

de manera opcional, cultivar la esponja con las células anteriores para el implante.

[0035] Según una realización llevada a cabo durante la presente invención, las proteínas de plasma son proteínas de plasma parcialmente purificadas. Las proteínas plasmáticas están libres de plasminógeno, es decir, la solución de proteína plasmática tiene menos del 20% del plasminógeno normalmente presente en el plasma sanguíneo, de preferencia menos del 10% de plasminógeno normalmente presente en el plasma y más preferiblemente menos del 5% del plasminógeno normalmente presente en el plasma.

[0036] Según una realización llevada a cabo durante la invención, la esponja de fibrina porosa se prepara mediante la transferencia de solución de trombina a un molde o soporte sólido, añadiendo la solución de proteína plasmática para conseguir la coagulación; congelando la mezcla coagulada y liofilizándola. De manera alternativa, las proteínas de plasma se mezclan con trombina en presencia de iones de calcio en las condiciones adecuadas para conseguir la coagulación; la mezcla se funde en un soporte sólido antes de la coagulación; la mezcla coagulada es congelada y liofilizada. Cabe señalar que una vez incorporada, se añaden aditivos y agentes bioactivos de manera independiente a cada una de las soluciones de fibrina que se está realizando, es decir, las proteínas plasmáticas o la solución de trombina, antes de la formación del coágulo, se colocan en un molde o soporte sólido antes de la adición de la trombina, de manera simultánea o después.

[0037] En una realización, la invención proporciona una matriz de fibrina porosa heterogénea en la que el material en partículas se incorpora a la esponja *ab initio*. El material particulado puede incluir materiales como partículas de fosfato cálcico, astillas óseas o fibras de vidrio capaces de proporcionar ciertas propiedades mejoradas a la matriz, como fuerza, porosidad suplementaria o liberación gradual.

[0038] Según varias realizaciones de la presente invención, las proteínas plasmáticas en concentración de 10mg/ml a 50mg/ml, sustancialmente libres de agentes antifibrinolíticos, plasminógeno y agentes quelantes orgánicos, se mezclan con al menos un glicosaminoglicano como el ácido hialurónico y/o la heparina, la mezcla se incuba y se añade a la solución de trombina en el soporte sólido para conseguir la formación del coágulo. El coágulo es, posteriormente, congelado y liofilizado.

[0039] En una realización, antes del implante o de su uso con células, la esponja está considerablemente seca y contiene menos del 15% de humedad residual, preferiblemente menos del 10% de humedad residual. Sorprendentemente, se ha demostrado que esta propiedad de la esponja es particularmente beneficiosa para el cultivo y la adherencia celular.

[0040] Otro aspecto de la presente invención describe un método para el tratamiento y el uso de la matriz de fibrina liofilizada sustancialmente libre de agentes antifibrinolíticos exógenos, plasminógeno y agentes quelantes orgánicos en la regeneración y reconstrucción de tejidos dañados, enfermos o traumatizados, incluyendo defectos de cartílago y hueso y otros tipos de tejido que incluyen, pero no se limitan, al hígado, páncreas y tejido cardíaco. El método de tratamiento descrito aquí supone una ventaja ya que requiere una preparación mínima por parte del profesional médico. Otras propiedades ventajosas derivan de la ausencia de agentes antifibrinolíticos exógenos como el ácido tranexámico y la aprotinina, que pueden ser perjudiciales para el paciente y el tejido del área circundante al implante. Además, la ausencia de un agente antifibrinolítico exógeno infiere a la esponja un almacén mejorado para la adhesión, el crecimiento, la proliferación, la infiltración y la diferenciación celular, tanto *in vivo* como *in vitro*.

[0041] Según una realización, la esponja se implanta *per se*. En otra realización, la esponja se corta en al menos una sección de la forma deseada.

[0042] En una realización, la esponja está compuesta también de células. Según otra realización, las células son seleccionadas de células madre o células progenitoras. Según otra realización, las células son seleccionadas de condrocitos, osteoblastos, hepatocitos o células de tipo mesenquimal, endotelial, epitelial, urotelial, endocrino, neuronal, pancreático, renal u ocular.

[0043] Existen diversos usos *in vivo* de la matriz de fibrina porosa. La matriz de fibrina porosa puede funcionar como almacén para el cultivo *in vivo* de células o como implante *per se*, para proporcionar soporte mecánico *in situ* a un área defectuosa o dañada y/o para proporcionar una matriz en la que las células del área dañada o defectuosa puedan desarrollarse, proliferar y/o diferenciarse. La matriz es conveniente en el tratamiento de defectos del cartílago articular de cualquier tipo, incluyendo defectos condrales y subcondrales, tanto los resultantes de un trauma, como pueden ser un accidente o lesiones deportivas, hasta enfermedades tales que la osteoartritis. La matriz de fibrina porosa se puede utilizar *per se* o combinada con otras terapias. Por ejemplo, la matriz de fibrina porosa se puede utilizar para la reconstrucción de cartílago junto a otros procedimientos terapéuticos como el desbridamiento condral, la condroplastia por láser o por abrasión y técnicas de perforación o microfractura.

[0044] Otras aplicaciones ortopédicas típicas incluyen la artroplastia de articulación, reconstrucción de menisco, reconstrucción de la consolidación viciosa en fracturas, reconstrucción craneofacial o reconstrucción de disco intervertebral. Además, la matriz de fibrina porosa es conveniente como recubrimiento de material sintético u otros implantes tales que clavos o placas, por ejemplo, en la artroplastia de cadera. De este modo, la presente invención proporciona además implantes o instrumental médico con un acabado compuesto de la matriz de fibrina porosa de esta invención.

[0045] La matriz de fibrina porosa de la invención tiene utilidad *inter alia*, como soporte inesperadamente beneficioso para el crecimiento celular. La ausencia de agentes antifibrinolíticos exógenos da como resultado una matriz de fibrina totalmente compatible con el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular, tanto *in vitro* como *in vivo*. Una ventaja adicional de la matriz de fibrina de la invención es la habilidad mejorada para absorber células y mantener su viabilidad. La necesidad de hidratar o enjuagar la esponja de la invención antes del cultivo de células queda descartado por la ausencia de agentes antifibrinolíticos exógenos, consiguiendo así una esponja con una capacidad de incorporación celular superior.

[0046] La matriz de fibrina porosa de la invención, al ser un armazón efectivo de soporte para el crecimiento celular, se puede utilizar en la reconstrucción quirúrgica *in vivo*, por ejemplo como matriz para la regeneración de tejidos compuestos de células neuronales, hepáticas, uroteliales, osteoblastos, tejido cardiovascular y tejido mamario o cualquier otra clase de células que se deseen cultivar en un soporte tridimensional. De este modo, la matriz de esta invención se puede utilizar para elaborar tejido equivalente a tejido vivo de, entre otros muchos, hígado, páncreas, nervios, glándulas, tendones, piel, vasos sanguíneos, hueso y ligamentos.

[0047] Según una realización de la presente invención, la matriz es una esponja o armazón capaz de soportar la proliferación en una gran variedad de tipos celulares. De hecho, la esponja es inoculada con células y las células pueden proliferarse *in vitro* antes de la implantación *in vivo*. De manera alternativa, la esponja se cultiva con células que han sido cultivadas o extraídas y la esponja, células incluidas, se implanta *in situ*. En una realización, el uso de la matriz de fibrina porosa como implante para trasplante se compone de proteínas plasmáticas autólogas y condrocitos autólogos.

[0048] Según una realización, la presente invención expone un método para el tratamiento o la reconstrucción de tejido dañado, enfermo o traumatizado. El método comprende la implantación en el área del tejido dañado, enfermo o traumatizado de una esponja de fibrina porosa liofilizada formada a partir de proteínas de plasma compuestas de fibrinógeno, trombina y Factor III. La matriz tiene menos del 10% de agua residual y está sustancialmente libre de agentes antifibrinolíticos exógenos, plasminógeno y agentes quelantes orgánicos. El tejido es seleccionado de tejido cartilaginoso, óseo, hepático, mesenquimal, endotelial, epitelial, urotelial, endocrino, neuronal, pancreático, renal y ocular.

[0049] En la invención se presenta también el uso de un implante para el tratamiento o la reconstrucción de tejido dañado, enfermo o traumatizado. Esta utilización comprende la implantación de una matriz de la presente invención en el área del tejido dañado, enfermo o traumatizado. El tejido es seleccionado de tejido cartilaginoso, óseo, hepático, mesenquimal, endotelial, epitelial, urotelial, endocrino, neuronal, pancreático, renal y ocular.

[0050] A continuación se aclaran esta y otras realizaciones mediante figuras, descripciones detalladas y ejemplos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0051] La presente invención será mejor comprendida y apreciada en su totalidad gracias a la siguiente descripción detallada y a las figuras que la acompañan:

La Figura 1A muestra un gráfico de la viabilidad de condrocitos porcinos en la matriz sustancialmente libre de plasminógeno comparada con una esponja estándar compuesta de un agente antifibrinolítico exógeno. La Figura 1B muestra la viabilidad de condrocitos humanos en una matriz sustancialmente libre de plasminógeno comparada a una esponja estándar compuesta de agentes antifibrinolíticos exógenos. La Figura 1C muestra la viabilidad de condrocitos humanos cultivados en matrices sustancialmente libres de plasminógeno, con o sin ácido hialurónico. Las figuras 1D y 1E muestran fotografías de las matrices de la invención, secas y cultivadas con células, respectivamente.

Las figuras 2A, 2B y 2C muestran secciones histológicas de la distribución de condrocitos en esponjas de fibrina sustancialmente libres de plasminógeno, en cultivos de una semana.

Las figuras 3A y 3B muestran el índice de degradación de la esponja sustancialmente libre de plasminógeno comparada a la esponja compuesta de ácido tranexámico, en urea o colagenasa.

Las figuras 4A y 4B representan la liberación de FGF de las matrices de fibrina sustancialmente libres de plasminógeno compuestas al 0,08% de ácido hialurónico reticulado y distintas cantidades de heparina preparada de dos formas diferentes. La Figura 4C muestra un gráfico de barras de la liberación de FGF de las

matrices de proteína plasmática compuestas de ácido tranexámico (comercial) y la matriz de proteína plasmática humana compuesta de proteínas de plasma parcialmente purificadas y un 0,024% de ácido hialurónico, FGF y heparina, añadidos *ab initio*. La Figura 4D muestra el patrón de liberación de FGF de las matrices de proteína plasmática sustancialmente libres de agentes antifibrinolíticos exógenos, compuestas de diversas concentraciones de trombina y heparina. La Figura 4E representa la liberación de FGF de las esponjas comerciales y de proteína plasmática compuestas de FGF, *ab initio*.

Las figuras 5A, 5B, 5C y 5D muestran secciones histoquímicas de una proteína plasmática compuesta de proteínas plasmáticas humanas parcialmente purificadas cultivadas con condrocitos porcinos.

La Figura 6A muestra hepatocitos primarios de rata incubados durante tres días en una matriz de proteína plasmática porosa liofilizada, sustancialmente libre de plasminógeno. Las figuras 6B y 6C muestran las líneas de células CHO y L8 incubadas durante tres días en una matriz de proteína plasmática porosa liofilizada sustancialmente libre de plasminógeno.

La Figura 7A muestra la inserción de una matriz de proteína plasmática porosa liofilizada portadora de células sustancialmente libre de plasminógeno en el bolsillo subcutáneo de un ratón desnudo. La Figura 7B muestra el neocartilago que desarrolló.

Las figuras 8A, 8B y 8C muestran secciones histológicas cruzadas de un nódulo de neocartilago. La Figura 8A muestra la matriz celular formada tras una semana, como las teñidas con azul de toluidina y rojo rápido. Las figuras 8B y 8C muestran secciones histológicas del nódulo de neocartilago teñido con H&E, con aumentos de 200x y 400x respectivamente.

Las figuras 9A y 9B muestran secciones histológicas cruzadas del nódulo de neocartilago teñido con H&E, con aumentos de 10x y 100x.

La Figura 10 representa la viabilidad celular en esponjas de proteína plasmática preparadas bien mezclando previamente las soluciones de proteína plasmática y de trombina o bien mezclando las soluciones durante la fundición. Las figuras 10B y 10C muestran secciones histológicas cruzadas de esponjas portadoras de células sustancialmente libres de plasminógeno preparadas mezclando previamente las soluciones de proteína plasmática y de trombina (10B) o mezclando las soluciones de proteína plasmática y trombina durante la etapa de fundición.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0052] Aunque ya se conocen en la disciplina a la que pertenece la presente invención numerosas biomatrices compuestas de proteínas plasmáticas o tisulares, ninguna ha demostrado completa y satisfactoriamente el cumplimiento de los criterios exigidos para el éxito en la ingeniería y la reconstrucción tisular. La presente invención describe una matriz de fibrina porosa, también llamada esponja, compuesta de proteínas plasmáticas sustancialmente libres de plasminógeno y de agentes quelantes orgánicos. La ausencia de plasminógeno en la matriz evita la necesidad de agentes antifibrinolíticos externos. Se describe además que, inesperadamente, las biomatrices compuestas de proteínas plasmáticas parcialmente purificadas también evitan la necesidad de añadir agentes antifibrinolíticos exógenos. Las composiciones y métodos de la presente invención son efectivas tanto *in vitro* como *in vivo* en aplicaciones como los implantes portadores de células en ingeniería y reconstrucción tisular.

[0053] La fibrina resultante, o esponja de proteína plasmática, tiene propiedades que la hacen particularmente beneficiosa para estimular y facilitar el crecimiento celular tanto *in vivo* como *in vitro*. El plasminógeno es una proteína de plasma convertida enzimáticamente en una serinoproteasa activa, la plasmina, que tiene actividad fibrinolítica. Esta actividad es resultado de la degradación rápida de fibrina en goma de fibrina y matrices. Los agentes antifibrinolíticos como el ácido tranexámico y la aprotinina son incorporados a la goma de fibrina, a las esponjas y a las matrices para mantener la integridad del sustrato. Las esponjas de la presente invención son estables y muestran una bioreabsorbibilidad reducida, evitando la necesidad de añadir agentes antifibrinolíticos exógenos.

[0054] Entre las propiedades beneficiosas de las matrices de la invención:

Las matrices de fibrina muestran mejores propiedades biológicas incluyendo una biodegradabilidad reducida, ausencia de inmunogenicidad u otras reacciones adversas, la capacidad de mantener y fomentar tasas elevadas de crecimiento celular, proliferación, diferenciación y migración y liberación controlada de agentes bioactivos.

[0055] Las matrices tienen mejores propiedades mecánicas, controladas al variar los aditivos usados en la composición. Las propiedades deseables incluyen flexibilidad, elasticidad y durabilidad.

[0056] Las matrices tienen mejores propiedades físicas, controladas al variar los aditivos usados en la composición. Las propiedades deseables incluyen textura, tamaño del poro y canales de interconexión, hidrofiliidad, adhesión, mojabilidad, adherencia y textura.

5 **[0057]** Las proteínas de plasma se pueden recuperar de material autólogo o recombinante, evitando así la necesidad de extraerlo del concentrado sanguíneo, pues conlleva riesgos para la salud.

10 **[0058]** Las matrices de la invención presentan todos los componentes fundamentales para la reconstrucción tisular, facilitando así el trabajo del profesional médico. Además, la composición de la esponja la hace apta para una cirugía mínima invasiva del cartílago articular. La esponja se puede implantar durante una miniartrotomía o una artroscopia, evitando así la cirugía múltiple y la artrotomía total utilizadas para el ACT.

Definiciones

15 **[0059]** A continuación se describen y aclaran ciertos términos, ejemplos y enunciados utilizados en la especificación.

20 **[0060]** El término “plasma” aquí utilizado se refiere a la parte líquida y sin células de la sangre humana o animal en su estado anterior a la coagulación.

25 **[0061]** El término “proteína plasmática” aquí utilizado se refiere a las proteínas solubles que se encuentran en el plasma de un ser humano o un animal común. Estas incluyen, pero no se limitan, proteínas coagulantes, albúmina, lipoproteínas y proteínas de complemento. La proteína plasmática más importante es el fibrinógeno, que tras la división por trombina en presencia de iones de calcio y Factor XIII se convierte en fibrina. Una matriz de fibrina se puede intercambiar por una matriz de proteína plasmática.

30 **[0062]** El término “plasminógeno” aquí utilizado se refiere a plasminógeno y plasmina. Las expresiones “Sustancialmente libre de plasminógeno” o “sin plasminógeno” se refieren a proteínas plasmáticas con menos del 20% del plasminógeno presente normalmente en el plasma, preferiblemente menos del 10% del plasminógeno presente normalmente en el plasma y preferiblemente menos del 5% del plasminógeno normalmente presente en el plasma. El plasma suele estar compuesto de aproximadamente 200mg de plasminógeno por litro de plasma fresco (aproximadamente 2 μ mol/litro). El plasminógeno es el precursor de la enzima plasmina activa.

35 **[0063]** La expresión “ausencia sustancial de agentes quelantes orgánicos” o “sustancialmente libre de agentes antifibrinolíticos externos” aquí utilizadas se refieren a una concentración de menos de 1mm de un agente quelante coránico como el EDTA u otros agentes quelantes orgánicos conocidos en la disciplina.

40 **[0064]** La expresión “sustancialmente libres de agentes antifibrinolíticos exógenos” o “sustancialmente libre de agentes antifibrinolíticos externos” aquí utilizadas se refieren a una solución de proteínas plasmáticas o de fibrinógeno a las que no se han añadido ningún agente antifibrinolítico. Entre los muchos ejemplos de agentes antifibrinolíticos se incluyen el ácido tranexámico (TEA), la aprotinina y el ácido -aminocaproico (EACA). Cabe destacar que la pequeña cantidad de agentes antifibrinolíticos exógenos se puede presentar en las proteínas plasmáticas debido a los métodos de procesarlo.

45 **[0065]** Los términos “plasma rico en plaquetas” o “PRP” aquí utilizados se refieren a plasma compuesto de plaquetas. Un extracto de plaquetas simple, derivado o un sobrenadante plaquetario se puede añadir exogenamente. De manera alternativa, el plasma rico en plaquetas se puede preparar a partir de métodos ya conocidos en la disciplina, incluyendo los presentados en las patentes US 6,475,175 y US 6,398,972.

50 **[0066]** La “matriz” aquí utilizada se refiere a una sustancia de estructura porosa, sólida o semisólida y biodegradable con poros y de canales de interconexión lo suficientemente anchos como para permitir a las células colonizar o invadir la matriz. La matriz de fibrina de la invención puede tener poros irregulares o sustancialmente regulares. Según se utiliza aquí, la expresión “poros sustancialmente regulares” significa que la mayoría de los poros o más preferiblemente sustancialmente todos los poros están en el mismo rango de tamaño. Los materiales que forman la matriz requieren la adición de un agente polimerizante para formar la matriz, como la adición de trombina en presencia de iones bivalentes de calcio a una solución compuesta de fibrinógeno para formar un coágulo. A continuación, el coágulo es liofilizado produciendo una matriz de fibrina porosa. La matriz de fibrina de la presente invención puede ser denominada aquí como armazón, biomatriz o esponja, para su uso como implante *per se*, para el cultivo de células o como implante de tejido portador de células. Aunque los ejemplos aquí presentados se refieren al uso de la matriz para la reconstrucción de cartílago, debe entenderse que la matriz se puede utilizar para la reconstrucción y regeneración de otros muchos tejidos como el óseo, el mamario, el epitelial, el neuronal, el hepático y el endotelial.

65 **[0067]** El término “células madre” aquí utilizado se refiere a una célula indiferenciada capaz de proliferarse. Las células madre son capaces de producir tanto nuevas células madre como células llamadas “progenitoras” que se diferencian para producir las células especializadas encontradas en los tejidos y órganos de los mamíferos.

[0068] El término “biocompatible” aquí utilizado se refiere a los materiales que tienen baja toxicidad, niveles clínicamente aceptables de reacción a cuerpos extraños en el cuerpo vivo y afinidad con el tejido vivo.

[0069] El término “líoofilizado” aquí utilizado se refiere a la preparación de una composición en seco formada por la congelación rápida y el descongelamiento en estado congelado (a veces referido como sublimación). Este proceso puede hacerse al vacío a una presión de aire reducida resultante de secar a una temperatura más baja que la requerida a máxima presión.

[0070] El término “humedad residual” aquí utilizado se refiere a la cantidad de humedad restante en la muestra secada. Se establece como un porcentaje del peso de la muestra. De hecho, las matrices de fibrina de la invención han dejado menos del 15% de humedad residual, preferiblemente menos del 10% de humedad residual.

[0071] El término “portador de células” aquí utilizado se refiere a la capacidad de la matriz para permitir que las células se puedan mantener dentro de su estructura. De hecho, las células son capaces de invadir los poros o canales de la matriz y pueden someterse a proliferación y/o diferenciación.

[0072] El término “implantación” aquí utilizado se refiere a la inserción en un paciente de una esponja de la invención a través de la cual el implante sirve para remplazar, total o parcialmente, tejido dañado, enfermo o tejido que ha sido eliminado.

[0073] Los “biológicamente activos” o “agentes bioactivos” incorporados a la esponja, por ejemplo, los factores de crecimiento, plaquetas y extracto de plaquetas y factores angionénicos entre otros, estimulan el crecimiento rápido o la diferenciación de células en el implante, así como una vascularización más rápida del mismo. Tal y como se ha mostrado, los factores son efectivamente conservados en la esponja y forman una fuente, o depósito, de agente bioactivo para la liberación prolongada. Otros agentes bioactivos incluyen antibióticos, enzimas, proteínas plasmáticas adicionales o combinaciones de estas.

[0074] El “tamaño del poro” de un poro de una esponja de proteína plasmática es determinado gracias a la ecuación: $P=(L \times H)^{1/2}$ en la que L y H son, respectivamente, la longitud y altura media de los poros, como determinan los análisis microscópicos de diversas esponjas.

[0075] El término “polisacáridos” aquí utilizado se refiere a los carbohidratos complejos hechos de más de un sacárido. En la definición se incluyen polisacáridos aniónicos, incluyendo los no modificados, como los derivados químicos de los mismos, tales que sal de potasio o sodio, sal de metal alcalinotérrea, como las sales de calcio o magnesio. Entre los muchos ejemplos de polisacáridos aniónicos se incluyen la pectina, el alginato, los galactanos, los galactomananos, los glucomananos y los ácidos poliurónicos.

[0076] Un “glicosaminoglicano” o “GAG” se refiere a polisacáridos largos no ramificados que se encuentran en la superficie celular o en la matriz extracelular. Entre los muchos ejemplos de glicosaminoglicano se incluyen la heparina, el condroitín sulfato, el dextrán sulfato, el dermatán sulfato, el heparán sulfato, el queratán sulfato, ácido hialurónico reticulado y no reticulado, sulfato de hexuronil-hexosaminoglucano y hexasulfato de inositol. En la invención también se incluyen los derivados, miméticos y sales de los anteriormente mencionados, incluyendo la heparina de bajo peso molecular. Aunque no es deseable estar condicionado por una teoría en particular, la presencia de GAGs, en particular de la heparina, colabora en la inmovilización de los factores de crecimiento, en particular uniendo factores de crecimiento como los de la familia del Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF).

[0077] El término “cartílago” aquí utilizado se refiere a un tipo especializado de tejido conectivo que contiene condrocitos incrustados en una matriz extracelular. La composición bioquímica del cartílago es diferente según el tipo, pero en general está compuesto de colágeno, principalmente colágeno tipo II, entre otros que están en menor cantidad, como por ejemplo los tipos IX y XI, proteoglicanos, otras proteínas y agua. En esta disciplina se conocen numerosos tipos de cartílago, incluyendo, por ejemplo, cartílago hialino, articular, costal, fibroso (fibrocartílago), meniscal, elástico, auricular y amarillo. La producción de cualquier tipo de cartílago entra dentro del alcance de la invención. El término “condrocitos” aquí utilizado se refiere a células capaces de producir componentes del tejido cartilaginoso.

[0078] El término “variante” aquí utilizado se refiere a una secuencia polipeptídica que posee ciertas propiedades estructurales modificadas de la proteína matriz o en estado salvaje. Por ejemplo, la variante puede estar truncada bien el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal o en ambos extremos terminales o pueden tener aminoácidos eliminados, insertados o sustituidos. La variante puede tener actividad similar o alterada si se compara con la de la proteína en estado salvaje.

Realizaciones de la Invención

[0079] La presente invención se refiere a las matrices de fibrina porosa liofilizada compuestas de proteínas plasmáticas sustancialmente libres de agentes antifibrinolíticos exógenos que funcionan como soporte para el crecimiento celular. La presente invención se refiere al inesperado descubrimiento de que una matriz de fibrina

porosa liofilizada compuesta de proteínas plasmáticas sustancialmente libres de plasminógeno muestra características biológicas superiores, en particular la viabilidad y la proliferación celular. El plasminógeno es una proteína plasmática que se convierte enzimáticamente en una serinproteasa activa, la plasmina, con actividad fibrinolítica. Esta actividad es resultado de la rápida degradación de la fibrina en coágulos y matrices. Los agentes antifibrinolíticos se suelen incorporar a las matrices y coágulos de fibrina para conservar la integridad del sustrato. Las matrices de la presente invención carecen de plasminógeno, obviando así la necesidad de agentes antifibrinolíticos exógenos, que se han descubierto dañinos para células y tejido y que pueden desentrañar reacciones adversas en los pacientes. Se ha revelado ahora que las matrices compuestas de proteínas plasmáticas parcialmente purificadas también obvian la necesidad de agentes antifibrinolíticos exógenos. Las composiciones y metodologías de la siguiente invención son efectivas tanto en aplicaciones *in vivo* como *in vitro*, incluyendo los implantes biocompatibles en ingeniería tisular y en biotecnología. Las matrices, según la presente invención, se pueden usar clínicamente, *per se* o como implantes portadores de células. Son verdaderas estructuras tridimensionales capaces de proporcionar soporte y conservación en el crecimiento y la diferenciación celular.

[0080] De hecho, la presente invención describe una matriz de fibrina liofilizada compuesta de proteínas plasmáticas sustancialmente libres de agentes antifibrinolíticos exógenos, plasminógeno y agentes quelantes orgánicos. Sustancialmente libre de plasminógeno se refiere a las proteínas plasmáticas compuestas por menos del 25% de plasmina o plasminógeno normalmente presente en el plasma, preferiblemente menos del 10% de plasminógeno normalmente presente en el plasma y más preferiblemente menos del 5% de plasminógeno normalmente presente en el plasma.

[0081] Los inventores han descubierto que una matriz de fibrina liofilizada compuesta de proteínas plasmáticas sustancialmente libres de agentes antifibrinolíticos exógenos, plasminógeno y agentes quelantes orgánicos da como resultado una matriz mejorada para uso clínico y biotecnológico. Además de eliminar la necesidad de agentes antifibrinolíticos exógenos y sus consecuentes efectos nocivos, los inventores muestran ahora que la matriz de fibrina de la presente invención funciona mejor como armazón para el cultivo, el crecimiento y la diferenciación celular, así como en la reconstrucción y la regeneración tisular.

[0082] Según una realización de la presente invención, la matriz de fibrina se compone de proteínas plasmáticas, siendo la fibrina la proteína principal. La fibrina se obtiene por la interacción de fibrinógeno (Factor I) y trombina en presencia de iones de calcio (Ca^{+2}) y Factor XIII u otro factor estabilizador de fibrina, para formar un coágulo de fibrina. La proteína plasmática utilizada en la presente invención puede ser purificada si proviene de concentrado de plasma o puede utilizarse de un concentrado comercial, incluyendo proteínas nativas o recombinantes, con una ausencia sustancial de agentes quelantes orgánicos. La sangre total, las fracciones sanguíneas, los derivados sanguíneos, los crioprecipitados, las proteínas recombinantes, el plasma o las fracciones plasmáticas pueden servir como fuente de proteína plasmática para la esponja de fibrina de la presente invención. El concentrado de plasma puede ser alogénico o autólogo. Otra fuente de proteína plasmática, específicamente de fibrinógeno, incluye las variantes de fibrinógeno, como las variantes de alto peso molecular (HMW), las de bajo peso molecular (LMW) y las derivadas de LMW (LMW'), como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente PCT WO 03/087160.

[0083] Las proteínas plasmáticas están sustancialmente libres de plasminógeno. El plasminógeno se puede eliminar del plasma mediante métodos ya conocidos en la disciplina. Entre los muchos ejemplos, el plasminógeno se elimina del plasma mediante purificación por afinidad. Los ligandos de ácido Epsilon aminocaproico (EACA), al igual que la resina lisina, se usan para purificar el plasminógeno del plasma. En la solicitud de patente PCT WO 02/095019 se describe un método para eliminar específicamente el plasminógeno y la plasmina en presencia de fibrinógeno a partir de una mezcla como la sangre o el crioprecipitado. El método requiere el contacto de la mezcla compuesta de plasminógeno con un ácido amino duro, como el ácido tranexámico, en el que el grupo amino y el grupo carboxílico están, aproximadamente, a 7 angstroms de distancia y el ácido amino duro está unido mediante un enlace covalente al soporte a través del grupo amino. En la solicitud de patente PCT WO 95/25748 se describe un complejo tóxico de fibrinógeno esencialmente libre de plasminógeno en el que el plasminógeno se eliminó utilizando Sepharosa® C-lisina. Alternativamente, algunas o todas las proteínas plasmáticas pueden ser recombinantes y libres de plasminógeno, como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente PCT WO 99/56797.

[0084] Las proteínas plasmáticas están también libres de agentes antifibrinolíticos exógenos, que se ha demostrado que son perjudiciales para el crecimiento celular y que pueden conllevar reacciones adversas en el paciente. Sorprendentemente, una matriz compuesta de proteínas de plasma parcialmente purificadas también evita la necesidad de agentes antifibrinolíticos exógenos.

[0085] La matriz de fibrina de la invención compuesta de proteínas de plasma sustancialmente libres de agentes antifibrinolíticos exógenos, plasminógeno y agentes quelantes orgánicos, puede utilizarse *per se*, para uso clínico y biotecnológico. Puede, además, estar compuesta de aditivos que añaden otras ventajas biológicas, físicas y mecánicas a la matriz. La solicitud internacional de patente en tramitación WO 03/007873 realizada por algunos solicitantes de la presente invención revela una matriz de fibrina compuesta de proteínas plasmáticas y al menos un agente antifibrinolítico, también, de manera opcional, compuesta de agentes como polisacáridos, polisacáridos aniónicos, glicosaminoglicanos, o polímeros sintéticos que se añaden a la preparación para mejorar ciertas

propiedades físicas, mecánicas y biológicas de la matriz. La incorporación de al menos uno de estos agentes demostró mejorar características como la elasticidad y el tamaño regular de los poros de la esponja.

[0086] En una realización, la presente invención está relacionada con una matriz de fibrina porosa sustancialmente libre de agentes antifibrinolíticos exógenos, plasminógeno y agentes quelantes orgánicos compuesta, además, de al menos un suplemento seleccionado del grupo consistente en polisacáridos, glicosaminoglicanos y polímeros sintéticos que actúa como soporte para el cultivo o crecimiento de células, tanto *in vitro* como *in vivo*. La incorporación de al menos un aditivo a los materiales que forman la matriz tiene como resultado una esponja con ciertas propiedades físicas, mecánicas y/o biológicas mejoradas. La incorporación de al menos un glicosaminoglicano se ha comprobado que confiere mejores características, entre ellas la elasticidad de la esponja. Las esponjas resultantes son sustancialmente homogéneas y no tienen partículas o subestructuras más allá de los poros y los canales de interconexión.

[0087] En una realización el aditivo puede ser añadido *ab initio*, durante la formación del coágulo. En otra realización el aditivo puede ser introducido en la matriz en cualquier momento tras la formación de la esponja. Según varias realizaciones llevadas a cabo durante la presente invención, la matriz se prepara utilizando al menos un glicosaminoglicano seleccionado del grupo formado por ácido hialurónico reticulado y no reticulado, heparina, derivados y miméticos de heparina, condroitín sulfato, dextrán sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato y queratán sulfato. De hecho, el glicosaminoglicano se incorpora a la matriz durante la formación inicial del coágulo. En una realización el glicosaminoglicano es ácido hialurónico. El glicosaminoglicano es añadido a una concentración final que otorga flexibilidad y elasticidad a la esponja y descarta la necesidad de añadir humedad a la composición final. El ácido hialurónico puede ser reticulado o no reticulado y tienen una variedad de diferentes pesos moleculares y pueden ser de origen animal o de una fuente recombinante. Según una realización, la concentración de ácido hialurónico no reticulado es de 0,005% al 0,5% final (v/v), más preferiblemente de 0,05% a 0,1%. En otra realización la concentración de ácido hialurónico reticulado es de 0,001% a 0,1% y más preferiblemente de 0,05% a 0,09% de concentración final. Según una realización el glicosaminoglicano es seleccionado de la heparina y sus derivados.

[0088] Según otra realización, la presente invención puede, además, incluir la incorporación de un polímero sintético o natural adicional antes de la formación del coágulo que puede modificar ciertas propiedades físicas, mecánicas y/o biológicas de la esponja. Estas pueden otorgar a la esponja características mejores incluyendo elasticidad, tamaño regular de los poros y fuerza. Entre los muchos ejemplos de polímeros naturales se incluyen la celulosa, la pectina, los ácidos poliurónicos, el sulfato de hexuronil-hexosaminoglucano y hexasulfato de inositol.

[0089] Los polímeros sintéticos utilizados en la presente invención pueden ser biodegradables o no biodegradables. Ejemplos de materiales no biodegradables incluyen el politetrafluoroetileno, polímeros perfluorados como el etileno propileno fluorado, polipropileno, polietileno, tereftalato de polietileno, silicona, goma de silicona, polisulfona, poliuretano, policarboxilato no degradable, policarbonato no degradable, poliéster no degradable, poliacrílico, polihidroximetacrilato, polimetilmetacrilato, poliamidas como la poliesteramida y copolímeros, copolímeros en bloque y combinaciones de todos estos materiales.

[0090] Algunos ejemplos de materiales degradables incluyen poliésteres hidrofílicos como el ácido poliláctico y el ácido poliortoéster, policarboxilatos degradables, policarbonatos degradables, policaprolactonas degradables, polianhídridos y copolímeros, copolímeros en bloque y combinaciones de todos estos materiales. Otros componentes incluyen surfactantes como la lecitina.

Agentes Bioactivos

[0092] En una realización, la matriz de la invención se compone además de al menos un agente bioactivo, como la citoquina, un factor de crecimiento y sus activadores, plaquetas, un péptido bioactivo, etc. Aunque no es deseable estar condicionado por ninguna teoría en particular, la incorporación de tales agentes a la esponja de la presente invención proporciona un mecanismo de liberación lenta o controlada. Cuando la matriz se degrada *in vivo*, los agentes bioactivos son liberados en el entorno circundante. Por ejemplo, los factores de crecimiento, las proteínas estructurales o las citoquinas son aditivos usados en la matriz de la presente invención, mejorando la secuencia temporal de cicatrización de heridas, la angiogénesis, alterando el índice de proliferación o incrementando la síntesis metabólica de la matriz de proteínas extracelular. Las proteínas bioactivas de la invención son polipéptidos o derivados o variantes de estos, de origen natural, sintético o recombinante, que muestran la habilidad para estimular síntesis DNA y la división o diferenciación celular de una variedad de células, incluyendo fibroblastos primarios, células madre embrionarias (ESC), células madre adultas, condrocitos, células vasculares y corneales endoteliales, osteoblastos, mioblastos, músculos lisos y células neuronales. Las proteínas representativas incluyen factores de crecimiento óseo (BMPs, IGF) y genes del factor de crecimiento de cartílago (CGF, TGF- β) para la curación del mismo, genes del factor de crecimiento nervioso (PDGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento insulínico (IGF-1), factor de crecimiento queratinocítico (KGF), suplemento para el factor de crecimiento derivado del endotelio (EDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y otras proteínas que pueden mejorar la acción de los factores de crecimiento incluyendo los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs) y sus miméticos como el dextrán sulfato, el octasulfato de sucrosa o heparina y fragmentos de estos. Se ha comprobado que otros factores que actúan en las células en la formación ósea, cartilaginosa o de otro tipo de tejido conectivo incluyen

retinoides, la hormona del crecimiento (GH) y la transferrina. Las proteínas específicas para la reconstrucción de cartílago incluyen el factor de crecimiento de cartílago (CGF), los FGFs y el TGF- β .

[0093] Otros agentes biológicamente activos que pueden estar incluidos en la matriz incluyen plaquetas sanguíneas, sobrenadante o extracto plaquetario y proteínas derivadas de las plaquetas, hormonas, analgésicos, agentes antiinflamatorios, antimicrobianos o enzimas. Los agentes bioactivos compuestos de plaquetas, extracto o sobrenadante plaquetario promueven la proliferación y diferenciación de células óseas incluyendo condrocitos y osteoblastos, así como otros tipos de células incluidos, entre otros, hepatocitos y células endoteliales. Los agentes bioactivos pertenecientes a la clase de agentes antimicrobianos o antiinflamatorios pueden acelerar el proceso de curación minimizando la infección y la inflamación. Enzimas como la condroitinasa o la matriz de metaloproteinasas (MMPs) pueden incorporarse para ayudar a la degradación del cartílago, estimulando así la liberación de células en la matriz y el área circundante. Entre otros muchos ejemplos, el al menos un agente bioactivo, añadido *ab initio* o en cualquier otra etapa de la preparación, puede ser seleccionado para mejorar el proceso de curación de tejidos dañados o enfermos.

[0094] Según una realización llevada a cabo durante la presente invención, el al menos un agente bioactivo es una proteína terapéutica seleccionada del grupo formado por los factores de crecimiento y sus variantes. En una realización, el factor de crecimiento es un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o una proteína ósea morfogenética (BMP) o una variante de esta. En otra realización, el FGF es un FGF o una variante que tiene capacidad de provocar la reconstrucción, regeneración o angiogénesis de hueso y cartílago. Los factores de crecimiento se pueden añadir a un amplio rango de concentraciones, dependiendo de su uso. Para ciertos usos, es preferible la liberación prolongada del agente bioactivo. La liberación prolongada de un agente bioactivo puede depender de diversos factores como pueden ser la concentración del factor de crecimiento, el tipo de glicosaminoglicano incorporado y la concentración de trombina.

[0095] En contraste con la esponja bioreabsorbible heteromorfa ya conocida en la disciplina, los actuales inventores revelan ahora una esponja de fibrina homogénea liofilizada compuesta de proteínas plasmáticas sustancialmente libres de plasminógeno y agentes quelantes orgánicos, compuesta además de al menos un aditivo seleccionado del grupo consistente en polisacáridos, glicosaminoglicanos y polímeros sintéticos y al menos un agente bioactivo siempre que la liberación de dicho agente bioactivo sea gradual.

[0096] Según varias realizaciones específicas de la presente invención, la matriz de fibrina porosa compuesta de proteínas plasmáticas sustancialmente libres de agentes antifibrinolíticos y plasminógeno, comprende además al menos un glicosaminoglicano y al menos un agente bioactivo en el que el agente bioactivo es una proteína terapéutica perteneciente a la familia de los factores de crecimiento FGF. En una realización, una matriz de fibrina porosa compuesta de proteínas plasmáticas sustancialmente libre de plasminógeno y de agentes quelantes orgánicos, se compone además de ácido hialurónico, heparina y un FGF. El ácido hialurónico y la heparina o sus miméticos se incorporan a la esponja *ab initio*.

[0097] Según uno de los múltiples ejemplos, la invención presenta una matriz de fibrina porosa liofilizada homogénea compuesta de proteínas plasmáticas sustancialmente libres de plasminógeno y agentes quelantes orgánicos, se compone además de al menos un glicosaminoglicano y al menos un agente bioactivo, en el que el al menos un glicosaminoglicano es heparina y el al menos un agente bioactivo es una proteína terapéutica perteneciente a la familia de los factores de crecimiento FGF o una de sus variantes. Esta esponja presenta una liberación gradual del FGF de la matriz y puede ser beneficiosa en ciertas aplicaciones terapéuticas. De manera opcional, al menos un agente bioactivo puede añadirse a la célula durante el cultivo para, por ejemplo, mejorar un efecto terapéutico.

[0098] Además, las células genéticamente producidas para extraer las ya mencionadas proteínas se incluyen en la presente invención. Las células periosteales, las células madre mesenquimales o los condrocitos se utilizan *per se* o mediante transfección con los genes del factor de crecimiento de cartílago seleccionados de un grupo compuesto por TGF- β , algunos FGFs o CGF para la reconstrucción y regeneración de cartílago; para la reparación ósea perióstica se utilizan otras células madre mesenquimales u osteoblastos *per se* o transferidos con genes de factor de crecimiento óseo seleccionados de un grupo compuesto por proteína morfogenética ósea (BMP), genes familiares o genes de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos; para la reparación nerviosa se utilizan células neuronales y de soporte neuronal *per se* o transferidas con genes seleccionados de un grupo compuesto por el gen de los factores de crecimiento nervioso (NGF) o FGFs específicos.

[0099] Además, las enzimas específicas se pueden incorporar a la esponja de la invención para mejorar la degradación de los proteoglicanos y/o las proteínas presentes en el cartílago. Los condrocitos del cartílago se incrustan en la matriz extracelular gruesa (ECM) de la articulación. Aunque no es deseable estar condicionado por ninguna teoría en particular, las enzimas conocidas en la disciplina, incluyendo colagenasa, tripsina, cimetripsina y controitnasa de varios tipos, son capaces de degradar la ECM de la superficie de la articulación, liberando así condrocitos capaces de invadir la esponja de la invención para mejorar la regeneración del cartílago.

[0100] La matriz de la invención, en ciertas realizaciones, puede también incluir uno o más antisépticos, como el azul de metileno y/o uno o más fármacos incluyendo antimicrobianos como agentes antibióticos y antivirales; agentes quimioterapéuticos; agentes antirechazo, analgésicos y combinados de estos; agentes antiinflamatorios; proteínas de adhesión como la fibronectina o fragmentos de esta, y hormonas como los esteroides.

[0101] Según una realización el al menos un agente bioactivo son plaquetas o sobrenadante plaquetario. Las plaquetas pueden estar presentes en el concentrado de proteína plasmática o se pueden añadir de manera exógena. Una fuente exógena de plaquetas se añade durante el proceso de formación del coágulo a una concentración final del 0,1% al 30% del volumen final de la esponja, más preferiblemente del 5% al 25% del volumen final de la esponja. Una fuente exógena de sobrenadante plaquetario se añade durante el proceso de formación del coágulo a una concentración final del 0,1% al 30% del volumen final de la esponja, más preferiblemente del 1% al 15% del volumen final de la esponja.

Aplicaciones

[0102] La matriz de fibrina porosa homogénea de la invención es útil tanto para uso como almacén en ingeniería tisular. La ausencia de plasminógeno evita la necesidad de agentes antifibrinolíticos externos, dando como resultado una esponja totalmente biocompatible. La presencia opcional de agentes bioactivos junto al glicosaminoglicano proporciona un inesperado y ventajoso soporte para el crecimiento celular *in vitro* e *in vivo*.

[0103] Los usos *in vivo* de la matriz de plasma son múltiples. El almacén de fibrina se puede utilizar como implante *per se* o para proporcionar soporte mecánico a una zona defectuosa o dañada *in situ* y/o una matriz en la que las células de una zona defectuosa o dañada se proliferen y diferencien. Las células pueden ser células madre, células progenitoras o células especializadas como condrocitos, osteoblastos, hepatocitos o células de tipo mesenquimal, endotelial, epitelial, urotelial, endocrino, neuronal pancreático, renal u ocular.

[0104] La matriz de fibrina porosa homogénea de la presente invención se puede utilizar en cirugía como método de reconstrucción y/o reparación de tejidos que han sido dañados, por ejemplo, en un trauma, en una enfermedad o en procedimientos quirúrgicos. La invención presenta una matriz que se puede utilizar como almacén implantable *per se* o para la regeneración tisular. Según un aspecto de la invención, la matriz sirve tanto como soporte físico que como sustrato adhesivo para el crecimiento celular *in vivo*. Cuando la población crece y las células funcionan con normalidad, comienzan a secretar su propio soporte de matriz extracelular (ECM).

[0105] Los usos como almacén incluyen la regeneración de tejidos como el neuronal, musculoesquelético, cartilaginoso, tendinoso, hepático, pancreático, renal, ocular, arteriovenoso, urinario o cualquier otro tipo de tejido que forme órganos duros o huesos. Algunos usos ortopédicos típicos incluyen la artroplastia de articulación, reconstrucción de menisco, reconstrucción de la consolidación viciosa en fracturas, reconstrucción craneofacial o reconstrucción de disco intervertebral.

[0106] La matriz de fibrina porosa de la invención es útil, *inter alia*, como inesperado soporte ventajoso para el crecimiento celular. La ausencia de agentes antifibrinolíticos exógenos da como resultado una matriz de fibrina totalmente compatible con el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular *in vivo* e *in vitro*. Una ventaja adicional de la matriz de fibrina de la invención es la demostrada habilidad de absorber o retener células. La necesidad de humedecer o lavar la esponja de la invención antes del cultivo celular queda descartada por la ausencia de agentes antifibrinolíticos exógenos. En una realización, la matriz de la invención sirve como almacén para el crecimiento, la proliferación y/ la diferenciación celular, incluyendo las células madre, las células progenitoras u otro tipo de células incluyendo condrocitos, osteoblastos, hepatocitos, células de tipo mesenquimal, epitelial, urotelial, neuronal, pancreático, renal u otro tipo de células convenientes para su cultivo en un soporte tridimensional.

[0107] En cierta realización de la presente invención las células pueden ser cultivadas en la matriz para su consiguiente implantación. Las células madre derivadas de cualquier tejido o producidas para diferenciarse en un tipo de tejido específico también se pueden utilizar. Preferiblemente las células derivadas de tejido autólogo. Por ejemplo, para el cultivo de cartílago, los condrocitos o células madre mesenquimales pueden ser cultivadas en la matriz. En realizaciones específicas de la invención, los condrocitos o las células progenitoras de condrocitos se pueden cultivar en la matriz antes de la implantación o en el área de implantación *in vivo*. La esponja es útil para la liberación de células *in situ* en una zona específica del cuerpo, como las células productoras de dopamina en pacientes de Parkinson.

[0108] Adicionalmente, la célula de interés puede ser producida para expresar un producto genético que ejercería efecto terapéutico, por ejemplo péptidos o proteínas antiinflamatorias, factores de crecimiento con efecto angiogénico, quimiotáctico, osteogénico o proliferativo. En la patente US 3,698,816 se revelan un gran número de ejemplos de células genéticamente producidas para mejorar la curación.

[0109] Según ciertas realizaciones de la invención, la matriz de fibrina se utiliza como soporte para el crecimiento de condrocitos y como almacén para la formación de nuevos cartílagos. Sin embargo, la matriz de plasma de la invención se puede utilizar como superficie útil para el cultivo tisular de cualquier célula, como las mesenquimales u

otras células formadoras de tejido a diferentes niveles de potencia. Por ejemplo, pueden desarrollarse en la matriz de la invención las células típicamente llamadas “células madre” o “células madre mesenquimales”, que son pluripotentes o células independientes, con una capacidad potencial ilimitada para dividirse mitóticamente o para renovarse o producir células progenitoras capaces de diferenciarse en cualquier tipo de célula. Además, pueden desarrollarse en la matriz de la invención células responsables del linaje. Una célula responsable del linaje se considera normalmente incapaz de dividirse mitóticamente de manera ilimitada y se diferenciará solo a un tipo celular específico. Dichos tipos incluyen condrocitos, osteoblastos, hepatocitos o células mesenquimales, endoteliales, epiteliales, uroteliales, endocrinas, neuronales, pancreáticas, renales u oculares.

[0110] En otra realización de la invención, la matriz de fibrina porosa homogénea liofilizada se puede utilizar como recubrimiento de material sintético, implantes o material médico. La matriz de la invención puede aplicarse a prótesis como clavos o placas mediante recubrimiento o adhesión, métodos ya conocidos por los expertos en la disciplina. El recubrimiento de la matriz, que es capaz de soportar y facilitar el crecimiento celular, puede así ser útil para presentar un entorno favorable para el implante o la prótesis.

[0111] Una persona experta en la disciplina puede adaptar los procedimientos ejemplificados a continuación según las exigencias específicas del tejido. Por ejemplo, para la reconstrucción de cartílago, la matriz de fibrina porosa homogénea liofilizada de la invención se puede utilizar junto a otros procedimientos terapéuticos como el desbridamiento condral, la condroplastia por láser o por abrasión y técnicas de perforación o microfractura.

[0112] Preferiblemente, la esponja de fibrina se implanta *per se* y sirve como armazón para el crecimiento celular *in situ*. De manera alternativa, la matriz es cultivada con las células deseadas, que proliferan, y la esponja que contiene estas células es implantada en el área que necesita la reconstrucción o regeneración tisular. La matriz de fibrina y glicosaminoglicano enriquecido homogéneo, en su estado seco, se adhiere excepcionalmente bien a la superficie tisular. Según una realización de la presente invención, una esponja seca de la invención, u otro tipo de matriz bioreabsorbible, se sitúa en el área en la que se busca la regeneración tisular. Una segunda esponja, en la que han sido cultivadas células particulares, se sitúa encima de la esponja seca. La esponja húmeda de la invención se adhiere bien a la esponja seca de la invención o a otra matriz. Durante el proceso de curación, las células de la esponja en la que las células originariamente cultivadas migran hacia la matriz, adhiriéndose directamente al área de regeneración tisular.

[0113] En la reconstrucción de tejidos estructurales como el cartílago y el hueso, la forma del tejido es esencial en la función, requiriendo un moldeado de la matriz en productos de configuración tridimensional de diversa forma y grosor. En consecuencia, la forma queda determinada por la forma de un molde, receptáculo o soporte que puede estar hecho de cualquier material inerte y puede estar en contacto con la matriz por todos sus lados, ya sea esfera o cubo, con un número limitado de caras o como una lámina. La matriz puede tener forma de órgano del cuerpo o partes de una prótesis. Eliminando porciones de la matriz con tijeras, escalpelo, láser u otros instrumentos cortantes, se puede crear cualquier detalle que exija la estructura tridimensional.

[0114] La matriz, según varias realizaciones de la invención, puede utilizarse como matriz para el crecimiento celular o para el cultivo de tejido *in vitro*. Las matrices de la invención presentan una superficie relativamente ancha para el crecimiento celular y un armazón mecánicamente mejorado para su implantación.

[0115] Los métodos para el cultivo de células en la matriz son numerosos. Entre los muchos ejemplos, las células son absorbidas al situar las células en una superficie de la matriz o absorbidas por la matriz al situar la esponja en una solución compuesta por células. La matriz puede ser cultivada con las células deseadas mediante cultivo superficial, a una densidad de aproximadamente 10^4 células por cm^3 , más preferiblemente unas 10^5 células por cm^3 .

[0116] Se apreciará que la matriz de la invención pueda soportar el crecimiento y/o la implantación de cualquier tipo de cartílago o tejido. Además, aunque la invención está predominantemente dirigida a los métodos para el crecimiento y/o la implantación de tejidos en humanos, la invención puede también incluir métodos para el crecimiento y/o implantación de tejidos en otros mamíferos.

[0117] Además, la esponja de la presente invención puede utilizarse como componente de un material bifásico o multifásico para la reconstrucción de tejidos como se ha visto en los defectos osteocondrales. Entre los muchos ejemplos, una capa puede contener material de fosfato cálcico pese a que una capa suplementaria puede contener la esponja de la invención. Gao et al. (Tissue engin. 8:827-837, 2002) describe un método de reconstrucción de defectos osteocondrales en las rodillas de un conejo usando un material compuesto formado por fosfato cálcico inyectable y una esponja de ácido hialurónico.

Método de preparación de una matriz

[0118] La presente invención presenta un método para la preparación de una matriz de fibrina porosa homogénea. Las soluciones de formación de una matriz incluyen una solución de trombina y una solución de proteína plasmática. La solución de trombina aquí utilizada se compone de una cantidad suficiente de trombina para escindir fibrinógeno y producir una matriz de fibrina en presencia de iones de calcio (Ca^{+2}). Las proteínas plasmáticas pueden derivar de

una fuente comercial, xenogénica, alogénica o autóloga comprendiendo fibrinógeno y factor XIII sustancialmente libre de plasminógeno y en ausencia considerable de agentes quelantes orgánicos. La solución de proteína plasmática puede contener derivados de fibrinógeno tales como las variantes de alto peso molecular o las de bajo peso molecular.

[0119] Según una realización llevada a cabo durante la presente invención, la esponja de fibrina porosa homogénea se prepara por transferencia de la solución de trombina a un molde, adicionando solución de proteína plasmática, congelando y liofilizando la mezcla coagulada. Alternativamente, las proteínas plasmáticas se mezclan con trombina en presencia de iones de calcio en condiciones apropiadas para lograr la coagulación, la mezcla se funde en un molde o soporte sólido antes de la coagulación, la mezcla coagulada se congela y se liofiliza. Hay que tener en cuenta que una vez incorporada la mezcla, se añaden aditivos y agentes bioactivos de manera independiente a cada una de las soluciones de formación de la matriz, es decir, las proteínas plasmáticas o la solución de trombina, antes de la formación del coágulo, se colocan en un molde o soporte sólido antes de la adición de la trombina, de manera simultánea o después.

[0120] Un método para la preparación de una matriz de fibrina porosa liofilizada formada a partir de proteínas plasmáticas que tienen menos del 10% de humedad residual y que está sustancialmente libres de agentes antifibrinolíticos exógenos, plasminógeno y agentes quelantes orgánicos, comprende los siguientes pasos:

proporcionar una solución de trombina y una solución de proteína plasmática donde la solución de proteína plasmática está sustancialmente libre de agentes antifibrinolíticos exógenos, plasminógeno y agentes quelantes orgánicos.

Introducir la solución de trombina y la solución de proteína plasmática en un soporte sólido o molde en presencia de iones de calcio.

Incubar en condiciones apropiadas para conseguir la coagulación.

Congelar la mezcla coagulada.

Liofilizar la mezcla coagulada para obtener una esponja.

[0121] Según una realización llevada a cabo durante la presente invención, las proteínas plasmáticas son proteínas plasmáticas parcialmente purificadas. Las proteínas plasmáticas están libres de plasminógeno, es decir, la solución de proteína plasmática incluye menos del 20% de plasminógeno normalmente presente en el plasma sanguíneo, preferiblemente menos del 10% de plasminógeno normalmente presente en el plasma y más preferiblemente menos del 5% de plasminógeno normalmente presente en el plasma.

[0122] Según una realización llevada a cabo durante la presente invención, la matriz puede prepararse por introducción secuencial de solución de trombina y solución de proteína plasmática en un molde o soporte sólido. Cualquiera de las dos soluciones se puede verter en primer lugar. Según otras realizaciones llevadas a cabo durante la presente invención, la solución de trombina y la solución de proteína plasmática se mezclan juntas y posteriormente se introducen en un molde. Las esponjas resultantes son diferentes en cuanto a porosidad y dispersión celular.

[0123] Un método para la preparación de una matriz de fibrina porosa liofilizada con menos del 10% de humedad residual y sustancialmente libre de agentes antifibrinolíticos exógenos, plasminógeno y agentes quelantes orgánicos y que contiene al menos un aditivo seleccionado del grupo formado por polisacáridos, glicosaminoglicanos y polímeros sintéticos, comprende los siguientes pasos:

Presentar una solución plasmática sustancialmente libre de agentes antifibrinolíticos exógenos, plasminógeno y agentes quelantes orgánicos, una solución de trombina y donde al menos la solución de proteína plasmática o la solución de trombina contenga al menos un aditivo seleccionado del grupo que conste de polisacáridos, glicosaminoglicanos y polímeros sintéticos.

Introducir la solución de trombina y la solución de proteína plasmática en un soporte sólido o molde.

Incubar en condiciones apropiadas para conseguir la coagulación.

Congelar la mezcla coagulada.

Liofilizar la mezcla coagulada para obtener una esponja.

[0124] La esponja puede componerse de al menos un agente bioactivo, añadido *ab initio* bien a la solución de trombina o bien a la solución de proteína plasmática.

[0125] Según una realización llevada a cabo durante la presente invención, las proteínas plasmáticas son proteínas plasmáticas parcialmente purificadas. Las proteínas plasmáticas están libres de plasminógeno, es decir, la solución de proteína plasmática contiene menos del 20% de plasminógeno presente normalmente en el plasma sanguíneo, preferiblemente menos del 10% de plasminógeno presente normalmente en el plasma.

[0126] Según otras realizaciones llevadas a cabo durante la presente invención, las proteínas plasmáticas sustancialmente libres de agentes antifibrinolíticos exógenos, plasminógeno y agentes quelantes orgánicos, en una concentración de 20 mg / ml a 50 mg / ml, se mezcla con ácido hialurónico y / o heparina y la mezcla se añade a la solución de trombina en el soporte sólido para la formación de un coágulo. El coágulo es congelado y liofilizado.

[0127] La concentración final de trombina puede ser variada con el fin de producir esponjas con distintas características biológicas, físicas y mecánicas útiles para diferentes aplicaciones. Las concentraciones de trombina de 0,5 UI / ml a 2 UI / ml produce esponjas con propiedades similares en cuanto a viabilidad y crecimiento celular. Otras concentraciones tan bajas como 0,15 UI / ml pueden ser también útiles, dependiendo de la aplicación.

[0128] En su forma final antes del uso con células, la esponja está sustancialmente seca y contiene menos del 15% de humedad residual, más preferiblemente menos del 10% de humedad residual.

[0129] Sin embargo, otro aspecto de la presente invención presenta métodos de tratamiento y uso de la matriz de fibrina de la invención para el tratamiento de tejido dañado o traumatizado, incluyendo el cartílago y defectos óseos. El método de tratamiento descrito en este documento proporciona una ventaja, ya que requiere una preparación mínima por parte del profesional médico para su uso. Los usos *in vivo* de la matriz de fibrina porosa son múltiples. La matriz de fibrina porosa puede funcionar como un armazón y puede ser utilizada como un implante *per se*, proporcionando un soporte mecánico a una zona defectuosa o dañada *in situ* y / o proporcionando una matriz dentro de la cual se proliferen y se diferencien células del área dañada y defectuosa. Por ejemplo, la matriz de fibrina porosa se puede utilizar para la reconstrucción de cartílago junto a otros procedimientos terapéuticos como el desbridamiento condral, la condroplastia por láser o por abrasión y técnicas de perforación o microfractura.

[0130] Siendo un eficaz armazón que soporta el crecimiento celular, la matriz de fibrina porosa de la invención, puede además ser utilizada en la cirugía reconstructiva *in vivo*, por ejemplo, como matriz para la regeneración de células y tejidos, incluyendo células neuronales, tejido cardiovascular, células uroteliales y tejido mamario. Otras aplicaciones ortopédicas típicas incluyen la artroplastia de articulación, reconstrucción de menisco, reconstrucción de la consolidación viciosa en fracturas, reconstrucción craneofacial o reconstrucción de disco intervertebra. La matriz de fibrina de la invención puede servir para el tratamiento de defectos resultantes de enfermedades como la osteoartritis. Los componentes de la matriz se funden en un molde diseñado específicamente para una lesión o defecto diferente. Entre los muchos ejemplos, el molde puede prepararse por diseño asistido por ordenador. En otros casos, el médico tendrá que cortar o practicar un corte fino en la esponja para reconstruir una lesión o defecto particular. La matriz de la invención es particularmente beneficiosa cirugía mínima invasiva, como la miniartrotomía o artroscopia y evita la necesidad de cirugía abierta articular.

[0131] Además, la matriz de fibrina porosa es conveniente como recubrimiento de material sintético u otros implantes tales que clavos o placas, por ejemplo, en la artroplastia de cadera. De este modo, la presente invención proporciona además implantes o instrumental médico con un acabado compuesto de la matriz de fibrina porosa de la invención.

[0132] Por otra parte, la esponja de la presente invención puede ser utilizada como componente de un material bifásico o multifásico para la reconstrucción de tejido, tal y como se comprueba en los defectos osteocondrales. Entre los muchos ejemplos, una capa puede contener material de fosfato cálcico pese a que una capa suplementaria puede contener la esponja de la invención.

[0133] La solución de proteína plasmática puede provenir de una fuente comercial, de proteínas naturales o recombinantes, o puede ser preparada a partir de plasma. Según una realización llevada a cabo durante la presente invención, la solución de proteína plasmática deriva de plasma alogénico. Según otra realización llevada a cabo durante la presente invención, al menos uno de los componentes, preferiblemente las proteínas plasmáticas, se utilizan para la preparación de la matriz procede del plasma autólogo o de las proteínas recombinantes. Según otra realización llevada a cabo durante la presente invención, todos los componentes del plasma utilizados en la preparación de la matriz son autólogos. Las proteínas plasmáticas se pueden aislar siguiendo una variedad de métodos, conocidos en la disciplina y ejemplificados más adelante, dando como resultado una matriz de fibrina con propiedades sustancialmente similares, medidas por las capacidades del tamaño del poro, la elasticidad, la compresión y las capacidades de los portadores celulares. Un componente de trombina estable puede aislarse a partir de plasma autólogo, según los métodos conocidos en la disciplina, por ejemplo los descritos en la patente US N ° 6.274.090 y Haisch et al (Med. Biol. Eng. Comput 38:686-9,2000).

[0134] La matriz de fibrina resultante muestra propiedades ventajosas incluyendo biocompatibilidad, tamaño de poro compatible con la invasión y proliferación celular y la capacidad de ser moldeada o fundida para lograr una determinada forma.

[0135] De hecho, la sangre se extrae de un paciente según la necesidad de reconstrucción o regeneración del tejido, las proteínas plasmáticas son aisladas del plasma autólogo y de una matriz preparada de la misma. Las plaquetas son opcionalmente aisladas y devueltas al plasma. La matriz de la presente invención puede servir como implante para uso como armazón *per se* o como un armazón portador de células para la implantación *in vivo*.

[0136] Según una realización llevada a cabo durante la presente invención, una esponja de fibrina porosa producida a partir de una solución de fibrinógeno, donde la solución de fibrinógeno se somete a diálisis con una solución que no requiere de un agente complejante, sirve como armazón para el crecimiento de las células *in vitro* e *in vivo*. Según otra realización, la esponja de fibrina se forma por la acción de una solución de trombina en la solución dializada de fibrinógeno y, posteriormente, se somete a liofilización.

[0137] Aunque no es deseable estar condicionado por ninguna teoría en particular, la ausencia sustancial de agentes complejantes orgánicos, puede proporcionar a la matriz de la presente invención propiedades beneficiosas para la proliferación y el metabolismo de varios tipos celulares. Como se muestra en los ejemplos de este documento, la matriz de la presente invención mantiene la proliferación de sistemas celulares del cartílago tanto *in vivo* como *in vitro*.

[0138] La presencia de ciertos agentes complejantes orgánicos en un intervalo de 1 a 20 mM, necesario para la producción de una red de fibrina flexible, según se describe en el documento US 6.310.267 para la curación de heridas, puede en sí misma tener un efecto perjudicial en la proliferación de ciertos tipos de células. No se ha revelado el uso de una red de fibrina para el crecimiento celular y la proliferación *in vivo* o *in vitro*, sin embargo, puede ser posible para ciertos cultivos de diferentes tipos celulares usando las redes de la patente anteriormente mencionada.

[0139] Según una realización llevada a cabo durante la presente invención, la heparina se incorpora a la matriz con una concentración final de 0,1 ug / ml a 1 mg / ml. En otra realización, la concentración de heparina es de 1 ug/ml a 50 ug / ml. Como se indica en este documento ug / ml se refiere a un microgramo por mililitro.

[0140] Según otra realización llevada a cabo durante la presente invención, el ácido hialurónico reticulado se incorpora a la matriz con una concentración final de 0,001% a 0,1%, más preferiblemente de 0,05% a 0,09%.

[0141] Según otra realización llevada a cabo durante la presente invención, el ácido hialurónico no reticulado se incorpora a la matriz con una concentración final de 0,005% a 0,5%, más preferiblemente de 0,05% a 0,1%.

[0142] Según otra realización llevada a cabo durante la presente invención, tanto la heparina como el ácido hialurónico se incorporan a la matriz en respectivos intervalos de concentración.

[0143] Para sorpresa, en vista de la función conocida de la heparina como anticoagulante, se ha revelado ahora que la incorporación de heparina a la matriz no interfiere ni en la formación de la matriz ni en los beneficios terapéuticos de la misma. Sin desear estar condicionado por la teoría, la heparina tiene como función principal unir FGF u otras proteínas terapéuticas y crear un depósito para la liberación prolongada de dichas proteínas. Además, los fragmentos de bajo peso molecular de la heparina liberada de la matriz pueden funcionar como agentes antiinflamatorios y colaborar en el proceso de curación del tejido enfermo o traumatizado (patentes US 5474987; 5686431; 5908837).

[0144] Los siguientes ejemplos pretenden ser de naturaleza meramente ilustrativa y no deben interpretarse de una manera limitativa.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de una matriz de fibrina

[0145] Aunque se dan de forma detallada los métodos para la preparación de la proteína plasmática, se debe entender que se conocen en la disciplina otros métodos de preparación de proteínas plasmáticas útiles en la preparación de la matriz de la presente invención. Uno de los muchos ejemplos de protocolo para la preparación de una solución enriquecida de fibrinógeno, ha sido descrito por Sims, et al. (Plastic & Recon. Surg. 101:1580-85, 1998). Se puede utilizar cualquier fuente de proteínas plasmáticas, siempre y cuando las proteínas plasmáticas se procesen para estar sustancialmente libres de agentes antifibrinolíticos, plasminógeno y de agentes quelantes orgánicos. Véanse a continuación los ejemplos 2 y 3 de los métodos de preparación de la proteína plasmática.

Materiales y métodos:

[0146] Fuente de proteínas plasmáticas, por ejemplo, fibrinógeno libre de plasminógeno (Omrix, IL) aproximadamente 50-65 mg / ml de solución madre.

Cloruro de calcio 5 mM

Trombina (1.000 unidades internacionales / ml, Omrix, IL).

[0147] Opcional: Ácido hialurónico, reticulado (Hylan (Synvisc), aprox. MW 6×10^6 , Genzyme, US) o no reticulado (aprox. MW 8×10^5 , MTF, US; aprox. MW 3.6×10^6 , BTG, IL).

[0148] La concentración de trombina determina el tiempo de reacción para la polimerización de los monómeros de fibrina y contribuye al tamaño del poro y al grosor de las fibras de la esponja final. Una concentración de 0,15 UI a 15 UI de trombina / mg de proteínas plasmáticas produjo una esponja con buenas propiedades físicas y biológicas. Se eligieron concentraciones de 1 UI a 1,5 UI de trombina /mg de proteínas plasmáticas pues dio lugar a una reacción rápida, pero permite tener tiempo suficiente para verter las dos soluciones (la proteína plasmática y la trombina) antes de que se complete la reacción. Cabe destacar que otras concentraciones son aceptables para la obtención de una matriz con propiedades sustancialmente similares. Para simplificar, tal como se muestra en este documento 1,5 UI de trombina / mg de proteína total equivalen a 30 UI de trombina / ml.

[0149] La solución de proteína plasmática y la solución de trombina se mezclan juntas en proporción de 2:1 (por ejemplo 210 μ l de proteína plasmática y 90 μ l de solución de trombina) en el siguiente orden: Una placa de 48 pocillos de ELISA se recubrió con 90 μ l de solución de trombina, y se añadió la solución de proteína plasmática. Por otra parte, a una placa de 96 pocillos de ELISA, se le añadieron alrededor de 19,5 μ l de solución de trombina, adicionando 45,5 μ l de proteína plasmática, o para una matriz ligeramente más gruesa se adicionan unas 24 μ l de solución de trombina y 51 μ l de proteínas plasmáticas. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ \text{C}$) durante aproximadamente 10 minutos o hasta la formación del coágulo, congelándolo con una oscilación de entre -60°C y -90°C varios días durante 30 minutos. Las esponjas de las placas de 48 pocillos fueron liofilizadas durante 5 horas mientras que las esponjas de las placas de 96 pocillos fueron liofilizadas durante 4 horas. La placa de 96 pocillos produjo esponjas de unos 5 mm de diámetro y las placas de 48 pocillos produjeron aproximadamente 10 mm (1 cm) de diámetro (unos $0,8 \text{ cm}^2$).

[0150] Se preparó una esponja de 35 mm de diámetro para la reconstrucción de defectos más grandes, como los que pueden desarrollarse en la osteoartritis. Una esponja de 35 mm ($9,5 \text{ cm}^2$, o de unos 2 a unos $2,5 \text{ cm}^3$) se preparó mezclando 2 ml de solución de proteína plasmática con 1 ml de trombina, fundida en un molde apropiado, como una placa de petri de 35 mm o una placa de cultivo celular de 6 pocillos, siendo congelada y liofilizada a -40°C durante 12 horas. Las esponjas de fibrina fueron preparadas en condiciones asépticas. Cabe destacar que las soluciones se pueden fundir en un molde en la forma que se desee. La esponja resultante fue una matriz con estructura de malla.

[0151] Según otra realización llevada a cabo durante la presente invención, la matriz se preparó con ciertos aditivos que incluyen polisacáridos, glicosaminoglicanos y polímeros sintéticos. Se ha demostrado que los parámetros biológicos, mecánicos y físicos se pueden controlar mediante la incorporación de los aditivos. Todos los aditivos se filtraron ($0,2 \mu\text{m}$) y se añadieron a la solución de proteína plasmática. Cuando se incorporó el ácido hialurónico a la matriz, la solución de proteína plasmática y la solución de ácido hialurónico, se incubaron juntas antes de la fundición o del moldeado. A continuación se muestran varios ejemplos de aditivos y concentraciones testadas en la Tabla 1:

Tabla 1

Aditivo	% concentración final
Glicerol	0.005; 0.01; 0.05; 0.1; 0.5; 1
AH Reticulado (X-linked)	0.0024; 0.012; 0.024; 0.05; 0.10; 0.5
AH Non-X-linked	0.002; 0.02; 0.05; 0.07; 0.08; 0.09; 0.1; 0.11; 0.13
Heparina	0.05; 0.1; 0.5; 1.0; 2.5; 10 $\mu\text{g/ml}$ final
Heparina + AH Reticulado	Combinaciones arriba indicadas
Heparina + AH Non-X-linked	Combinaciones arriba indicadas
Glicerol +AH	Combinaciones arriba indicadas
Nota: non-X-linked se refiere al ácido hialurónico no reticulado.	

[0152] Una proteína terapéutica, el FGF (esponja de 1 a 10 $\mu\text{g}/0.2 \text{ cm}^2$) se añadió o bien a la solución de proteína plasmática o bien se mezcló con heparina y después se añadió a las soluciones de proteína plasmática o de trombina. Se han realizado experimentos para determinar la concentración óptima de los aditivos en cuanto a flexibilidad de la matriz, elasticidad, tamaño del poro, liberación prolongada de agentes bioactivos y capacidad de crecimiento celular. Los aditivos confieren propiedades beneficiosas, incluyendo propiedades superficiales, mecánicas y / o biológicas a la esponja durante su preparación. La optimización se realiza también con respecto a la concentración de los agentes bioactivos. En una realización, los agentes bioactivos incluyen factores de crecimiento, sobrenadante de plaquetas, plaquetas nativas, membranas plaquetarias y otros materiales. Según una realización

llevada a cabo durante la presente invención, esta presenta una matriz compuesta de heparina o un derivado de la misma y ácido hialurónico compuesto, además de FGF o variantes de FGF. Más adelante, se muestran los ejemplos.

5 Ejemplo 2: Aislamiento de proteínas plasmáticas purificadas parcialmente de plasma entero

[0153] La proteína plasmática puede ser preparada a partir de diferentes fuentes, tales como plasma fresco, plasma fresco congelado, proteínas recombinantes y xenogénicas y sangre alogénica o autóloga. El plasma congelado fresco fue recibido del banco de sangre (Tel-Hashomer, Israel). El plasma (220 ml) fue descongelado en una incubadora a 4°C durante la noche, seguido de una centrifugación a 4°C y 1900g durante 30 min. El pellet fue resuspendido en 2,5ml de PBS con un movimiento vibratorio suave hasta que se vio una solución homogeneizada. La concentración de proteína total fue aproximadamente de 42-50 mg/ml según el ensayo de Bradford y el SDS-PAGE (en comparación con un estándar). El plasma puede además ser tratado para eliminar plasminógeno, usando métodos conocidos en la disciplina. En las patentes PCT WO 02/095019 y WO 95/25748 se describen numerosos ejemplos de métodos útiles para la eliminación de plasminógeno a partir de la sangre o derivados de la misma tales como el plasma o crioprecipitado.

[0154] Se debe entender que la fuente de proteína plasmática puede ser sangre xenogénica, alogénica o autóloga. Preferiblemente, la fuente de proteína plasmática es alogénica o autóloga. En la patente US 6475175 se describe uno de los muchos ejemplos para el aislamiento de plasma rico en plaquetas.

[0155] Otra realización llevada a cabo durante la presente invención, presenta una esponja de proteína plasmática que incorpora al menos un aditivo y plaquetas de sangre o sobrenadante de plaquetas. Las esponjas se componen de un 0,024% o un 0,08% de la concentración final de ácido hialurónico y un 1% o un 10% se prepara con la concentración final de sobrenadante plaquetario liberado o con el conjunto de plaquetas. El sobrenadante de plaquetas se hizo mediante la exposición de las plaquetas aisladas (obtenidas del banco de sangre de Israel) a la trombina (Gruber et al., Clin Oral Implantes Res. 13:529-535, 2002), recogiendo el sobrenadante y añadiéndolo a la solución de proteína plasmática antes de la formación de la esponja. Las esponjas que contienen plaquetas fueron preparadas añadiendo directamente plaquetas a las proteínas de plasma de la siguiente manera: se añadieron a las proteínas de plasma 73 ul de plaquetas y aditivos (ácido hialurónico de 0,024% o un 0,08% de concentración final) (30 mg de proteína total/ml) y la solución se llevó a un volumen final de 210 ul. La esponja fue realizada como se ha descrito anteriormente utilizando proteínas plasmáticas parcialmente purificadas.

35 Ejemplo 3: Extracción de fracciones de proteína plasmática de sangre alogénica o autóloga

Materiales:

[0156]

- 1) Citrato de sodio al 3,8% o cualquier otro anticoagulante farmacéuticamente aceptable
- 2) Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, saturado (500g/l)
- 3) Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, al 25%
- 4) Solución reguladora de EDTA-fosfato: fosfato 50 mM, EDTA 10 mM, pH 6.6
- 5) Solución reguladora de Tris-NaCl: Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4
- 6) Etanol, absoluto 4°C
- 7) Sangre total (Banco de Sangre de Israel, Hospital Tel Hashomer o del paciente)

Métodos:

[0157] Este método puede ser utilizado para producir proteínas plasmáticas que puedan ser tratadas para la eliminación de plasminógeno por métodos conocidos en la disciplina, incluyendo cromatografía de afinidad. Las proteínas plasmáticas se aíslan según los métodos estándares. A una bolsa de sangre de 450 ml procedente del banco de sangre que contenía citrato de sodio se le adicionaron 50 ml de una solución de citrato de sodio al 3,8% y la solución se mezcló suavemente.

[0158] La sangre-citrato de sodio se centrifugó a 2100 g durante 20 min. El sobrenadante de plasma se recogió y se volvió a centrifugar a 5000 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante de plasma se colocó en hielo, y se le adicionó solución de sulfato de amonio saturado a una proporción de un volumen de sulfato de amonio por 3 volúmenes de sobrenadante (proporción de volumen 1:3). La solución se conservó a 4°C durante 1,5 horas con oscilación moderada ocasional (la agitación magnética no se permite). El sobrenadante de plasma se centrifugó a 5000 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y cada pellet se lavó con 10 ml de solución de sulfato de amonio al 25% (el pellet no se disuelve). Cada pellet se disolvió en 6-7 ml de solución reguladora de EDTA-fosfato. Como ejemplo, 100 ml de la solución se conservó para hacer un SDS-PAGE y un análisis de coagulación. Los pellets disueltos fueron mezclados y el precipitado de sulfato de amonio se repitió añadiendo sulfato de amonio saturado a la muestra de plasma para lograr una proporción de volumen 1:3 (generalmente, 25 ml de sulfato de amonio con 75

ml de plasma). La solución se conservó a 4°C durante 1,5 horas con oscilación moderada ocasional, y se centrifugó a 5000g durante 15 min. El sobrenadante se descartó y los pellets se disolvieron en un volumen de solución reguladora de Tris-NaCl, que fue igual a o menor al volumen de solución reguladora de EDTA-fosfato utilizada anteriormente. Una cantidad total típica fue aproximadamente de 45 ml.

[0159] La muestra puede ser dializada (tubos de diálisis SnakeSkin™, valor de corte 3.5 kD, Pierce) unas 3 o 4 horas o durante la noche a 4°C en 1,5 litros de solución reguladora de Tris-NaCl. La muestra dializada fue centrifugada en tubos resistentes a alta velocidad a 21.000g durante 15 min a 4°C, para eliminar cualquier resto de material insoluble. El sobrenadante fue recolectado y conservado en hielo.

[0160] El sobrenadante se precipitó con etanol a una concentración final del 7% y se conservó en hielo durante 30 min. La solución se centrifugó a 5000g durante 15 min, el sobrenadante se descartó y el pellet se disolvió en el mismo volumen de solución reguladora de Tris-NaCl (generalmente una cantidad de 45 ml). La solución fue dializada durante la noche a 4°C en 1,5 litros de solución reguladora de Tris-NaCl. La solución dializada se centrifugó a 21.000g a 4°C durante 15 min para eliminar cualquier rastro de material insoluble.

[0161] Las concentraciones de proteína fueron determinadas utilizando el método estándar de Bradford. Las producciones de proteína oscilan entre 0,2 y 0,6 mg por ml de sangre entera, con resultados típicos de 0,4 a 0,5 mg/ml. La capacidad de formación del coágulo se determinó al añadir 30 µl de trombina (100 U/ml; Omrix) a 70 µl de producto de plasma (10 mg/ml); la coagulación debería ocurrir en 30 segundos. La pureza de la proteína se determinó mediante el análisis electroforético de 50 µg de la muestra en un gel de SDS-poliacrilamida al 5% y realizó una tinción de azul de Coomassie. El resto del sobrenadante fue recolectado, congelado y liofilizado hasta el secado, es decir, 48 horas.

Ejemplo 4: Presencia de plasmina y de plasminógeno en la muestra de proteínas de plasma.

[0162] Las proteínas plasmáticas sustancialmente libres de plasminógeno, están compuestas de 9 a 10 ug de plasmina y de plasminógeno por cada mililitro de proteína total, identificados por el anticuerpo policlonal que detecta tanto al plasminógeno como a la plasmina. El plasma humano generalmente contiene 200 mg de plasminógeno por litro o unos 200 ug/ml.

[0163] Este experimento fue diseñado para determinar la concentración de plasmina que puede ser soportada en un coágulo de proteína plasmática. El mismo diseño experimental es utilizado para probar la resistencia del plasminógeno. El plasminógeno es el precursor de la plasmina serinproteasa activa, capaz de degradar fibrina.

[0164] Dos concentraciones de plasmina (ICN Biomedical, 194.198, solución de 20 mg / ml), 0,09 mg / ml, 0,045 mg/ml, se añadieron a las proteínas plasmáticas sustancialmente libres de plasminógeno (Omrix) antes de la disposición de las soluciones. La concentración de plasmina de 0,09 mg/ml representa una concentración de plasmina diez veces mayor que la concentración de plasmina y plasminógeno total presente en las proteínas plasmáticas comerciales. La concentración de plasmina de 0,045 mg/ml representa una concentración de plasmina cinco veces mayor. La solución de proteína plasmática para la esponja compuesta de 0,09 mg/ml de plasmina se preparó mezclando 281 ul de proteínas plasmáticas (64 mg / ml), 67,5 ul de ácido hialurónico, 2,7 ul de plasmina y 251,3 de solución salina. La solución de proteína plasmática para la esponja compuesta por 0,045 mg/ml de plasmina se preparó mezclando 281 proteínas plasmáticas ul, 67,5 ul de ácido hialurónico, 1,35 ul de plasmina y 250 ul de solución salina. Se preparó un control sin la adición de plasmina. Se prepararon cinco esponjas a partir de cada solución mediante la adición de 43 ul de trombina a un pozo (1 UI de trombina/ mg de proteína plasmática) y 87 ul de solución de proteína plasmática y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente.

[0165] Ninguna de las mezclas que contenían plasmina formó un coágulo, mientras que el control sin plasmina formó un coágulo en apenas unos minutos y una esponja liofilizada se formó tras la congelación y la liofilización. Esto hace indicar que las proteínas plasmáticas pueden tolerar menos de 45 ug/ml de plasmina o menos del 22,5% de plasminógeno y plasmina presentes normalmente en el plasma.

Ejemplo 5: Morfología de la matriz y propiedades mecánicas

[0166] Las matrices para la ingeniería tisular, en general, se caracterizan según varios criterios, incluyendo naturaleza química, porosidad, adhesión, biocompatibilidad y elasticidad, entre otras (Hunziker, Osteoart. Cart., 10:432-465, 2002). La Tabla II de la referencia mencionada anteriormente enumera varias de las propiedades y las bases biológicas de las mismas.

[0167] En el laboratorio de los inventores, se determinaron varias de las propiedades. La porosidad, importante para la migración y adhesión celular se determina por mediciones geométricas utilizando el microscopio de luz para seccionar la matriz en muestras gruesas. Las muestras se montaron en los portaobjetos y se tiñeron con hematoxilina/eosina. Un micrómetro óptico midió el tamaño del poro y la distancia entre los poros adyacentes.

[0168] El Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) se utiliza para analizar la homogeneidad y la ultraestructura de la matriz. El grosor de las fibras de fibrina se mide también de esta manera.

[0169] En su forma final antes del uso con células, la esponja está sustancialmente seca y contiene menos del 15% de humedad residual, más preferiblemente menos del 10% de humedad residual y más preferiblemente menos del 3% de humedad residual. Esta característica se midió por métodos ya conocidos en la disciplina.

[0170] Las mediciones de propiedad mecánica se llevaron a cabo utilizando una máquina Chatillon TCD200 con un dinamómetro digital DF12. Cada esponja de proteína plasmática era de 2,5 cm de largo, 0,5 cm de ancho; y se liofilizó completamente. La deformación representa la elasticidad de la esponja, es decir, la cantidad de tracción se midió en milímetros (mm) ejercidos hasta que la esponja se desgarró. La fuerza se calcula en kiloPascal (kPa) y representa la cantidad de energía necesaria para desgarrar las tiras de la esponja. El grosor se incorpora en el cálculo.

Ejemplo 6: Cultivo celular en la matriz

[0171] Se pueden utilizar diferentes métodos de cultivo celular en la esponja. Para el cultivo, es importante la adherencia, la capacidad migratoria y la proliferación de las células dentro de la matriz. Las células se pueden suspender en un medio, en PBS, o en cualquier solución reguladora biocompatible sola o en presencia de agentes bioactivos. Las células se pueden cultivar colocando una gota del líquido que contiene las células en la esponja y dejando que las células sean absorbidas. Por otra parte, las células del líquido pueden ser absorbidas por la esponja colocando la esponja en un recipiente que contenga una suspensión de células. Otros métodos que incluyen siembra de aerosol también han demostrado ser eficaces.

[0172] Una ventaja particular de la presente invención es el alto nivel de viabilidad celular y la excelente distribución de células tras el cultivo celular directamente sobre una esponja seca. A menudo, una matriz compuesta de un agente antifibrinolítico exógeno como es el ácido tranexámico, exhibe una menor viabilidad celular tras el cultivo. Las células parecen recuperarse, pero los agentes antifibrinolíticos exógenos pueden ser perjudiciales para el crecimiento inicial de la célula. Cuando se lava dicha esponja, se retira el ácido tranexámico parcial o totalmente, mejorando la proliferación celular. También se comprobó que muchas células se asientan en la periferia de la matriz utilizando una esponja húmeda, mientras que hay una mejor distribución de las células tras el cultivo en una esponja seca.

Materiales y métodos:

[0173] Se probaron esponjas compuestas de diferentes concentraciones de proteínas plasmáticas y trombina. Las esponjas que comprenden 10 mg/ml, 15, 16,5 mg/ml, 18 mg/ml, 20 mg/ml, 22 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml y concentraciones variables de ácido hialurónico (de unos 0,05% a unos 1,1%) y 1, 1,5 o 2 UI de trombina/mg de proteína. Un total de unos 5×10^5 a unos 5×10^6 de condrocitos se cultivaron en esponjas de 1 cm de diámetro y se incubaron durante tres días. Se añaden diferentes volúmenes de medio de crecimiento y la matriz a la que se le han añadido las células se incubó. Se debe entender que la esponja puede tener diferentes tamaños, formas y grosores.

[0174] Tras la incubación de las esponjas cultivadas durante tres días, 1 semana y tres semanas, algunas de las esponjas fueron degradadas a colagenasa y las células se contaron tras la tinción con azul de tripano. La proliferación celular se determina según se describe en el ejemplo 8.

[0175] Las muestras de esponjas o matrices portadoras de células, fueron integradas en parafina y se prepararon secciones usando un microtomo. Las secciones histológicas se tiñeron adicionalmente usando diferentes manchas biológicas incluyendo hematoxilina y eosina (H&E), azul de toluidina y rojo rápido, tinción tricrómica de Masson y otros. Todas las esponjas mostraron una distribución celular similar, con células vivas presentes en todas las capas de la esponja.

[0176] Los ejemplos de la invención de crecimiento de las células en la esponja de fibrina se muestran en las figuras 1A, 1B y 2. Cada esponja fue cultivada con 5×10^6 de condrocitos porcinos o humanos de 30 microlitros de volumen, se incubaron una hora y se añadió un medio fresco. Después de tres días, las esponjas fueron degradadas a colagenasa y se contó el número de células vivas tras la tinción con azul de tripano. La Figura 1A muestra la viabilidad aumentada de condrocitos porcinos en matrices con (moteado) y sin plasminógeno (sólido) tras un cultivo de tres días en la incubadora. Después de los tres días, más del 50% de las células permanecieron viables si se comparan con el 20% de las células cultivadas en la matriz estándar preparada a partir de proteínas plasmáticas compuestas de ácido tranexámico. La figura 1 B muestra la viabilidad de los condrocitos humanos cultivados en matrices con (moteado) y sin plasminógeno (sólido-seco) después de una incubación de tres días. Las esponjas sin plasminógeno cultivadas con condrocitos humanos, mostraron una viabilidad celular superior si se comparan con las esponjas compuestas de ácido tranexámico. La Figura 1C muestra la viabilidad celular después de tres días en tres composiciones diferentes de esponja. Todas las esponjas compuestas de proteínas plasmáticas sustancialmente libres de plasminógeno, fueron cultivadas con aproximadamente 4×10^6 de condrocitos humanos. La barra moteada representa la viabilidad en una esponja de 20 mg de proteína plasmática/ml, sin aditivos presentes. La barra de color negro sólido representa la viabilidad celular en una esponja que comprende 20 mg/ml y 0,075% de ácido hialurónico.

La barra de cuadros representa la viabilidad celular en una esponja que oscila entre un 18 mg/ml y un 0,75% de ácido hialurónico. Se puede observar que las tres esponjas proporcionan una buena estructura para el cultivo de células. Las figuras 1D y 1E muestran fotografías de esponjas secas de un centímetro (1 cm) de diámetro e implantes portadores de células, respectivamente.

[0177] Las figuras 2A, 2B y 2C muestran secciones histológicas transversales a través del centro de una matriz compuesta de condrocitos humanos tras 1 semana de incubación. La esponja de fibrina fue hecha de fibrinógeno comercial sustancialmente libre de plasminógeno (Omrix, 20 mg / ml) compuesta de ácido hialurónico al 0,05% y 1×10^6 de células humanas. Hay que tener en cuenta la infiltración de los condrocitos en la esponja. Las figuras 2A, 2B y 2C muestran aumentos de 40x, 100x y 400x, respectivamente.

Ejemplo 7: Ensayo de Degradación *in vitro*

[0178] Se llevó a cabo un ensayo para determinar el índice de degradación de la esponja de la invención. Las diferencias en el índice de degradación se pueden ver entre la esponja de la invención y una esponja estándar compuesta de fibrinógeno y un antifibrinolítico exógeno como es el ácido tranexámico.

[0179] El ensayo se realizó de la siguiente manera: se prepararon tres tipos diferentes de esponjas, cada uno con la misma concentración de fibrinógeno, la misma concentración de trombina (1.5U/mg proteína) y ácido hialurónico. Se vieron diferencias en la fuente de fibrinógeno y de ácido hialurónico.

[0180] Una esponja de fibrina compuesta del 10% de ácido tranexámico, fibrinógeno (Omrix, 27 mg / ml), y ácido hialurónico reticulado (Syvisc al 0,08%).

[0181] Se preparó una esponja de fibrina a partir de fibrinógeno sustancialmente libre de plasminógeno (Omrix 27 mg/ml) y ácido hialurónico reticulado (Synvisc al 0,08%).

[0182] Se preparó una esponja de fibrina a partir de fibrinógeno sustancialmente libre de plasminógeno (Omrix 27 mg/ml) y ácido hialurónico no reticulado (BTG al 0,08%).

[0183] El experimento se realizó de la siguiente manera: Cinco esponjas preparadas en placas de 96 pocillos se colocaron en placas de 48 pocillos y se añadieron 750 ul de 10M de urea para cubrir las esponjas.

[0184] Se obtuvieron muestras de 20 ul de cada pocillo en los siguientes puntos: 1, 2, 3, 4, 5, 8 minutos, 10 minutos, 30 minutos y 1 hora. La proteína de cada muestra se midió en un ensayo estándar de Bradford. Los resultados se presentan en la figura 3A.

[0185] La esponja , compuesta de fibrinógeno estándar y un 10% de ácido tranexámico, se sometió a una degradación rápida tal como se mide por la proteína (mg / ml) detectada en el sobrenadante y que no podría ser vista hasta transcurridos 10 minutos, mientras que la esponja compuesta de proteína plasmática sustancialmente libre de plasminógeno se mantuvo estable.

[0186] En un experimento similar, las esponjas fueron degradadas en collagenasa. Las esponjas de la prueba se incubaron en 400 ml de collagenasa (1,7 mg / ml) diluida 1:10 en DMEM sin FBS a 37°C hasta su completa disolución. En los diferentes puntos de tiempo se recogieron muestras y se examinó la concentración de proteína mediante el ensayo de Bradford. Los resultados se presentan en la figura 3B. La esponja que comprende el 10% de ácido tranexámico y ácido hialurónico reticulado se degrada mucho más rápido que las esponjas que contienen fibrinógeno sustancialmente libre de plasminógeno compuesto también de ácido hialurónico reticulado o no reticulado (wo plm x link, wo plm non x link, respectivamente).

Ejemplo 8: Liberación de los agentes bioactivos de la matriz

[0187] Para ciertas aplicaciones, la liberación prolongada de un agente bioactivo como un factor de crecimiento puede ser deseable. La incorporación y liberación de factores de crecimiento de la matriz de la invención se evalúan *in vitro* o *in vivo* utilizando factores de crecimiento radiomarcados o etiquetados, por ejemplo, el marcado con fluorocromo, con fosfatasa alcalina o el factor de crecimiento marcado con peroxidasa de rábano. La fracción y velocidad del agente liberado se midieron siguiendo la radioactividad, la fluorescencia, la actividad enzimática u otra peculiaridad de la etiqueta. De manera similar, la liberación de enzimas de la matriz se determina mediante el análisis de la actividad enzimática en el microambiente en un ensayo *in vitro* o *in vivo*. La liberación de un FGF de la matriz de la invención fue llevada a cabo como se describe aquí.

[0188] El índice de liberación del factor de crecimiento se determinó a partir de esponjas preparadas en dos métodos alternativos. En un caso el FGF2 se adsorbió a la heparina y el producto combinado se añadió a la solución de proteína plasmática. En el segundo ejemplo, cada componente se añadió por separado a las soluciones individuales: la heparina se añadió a la solución de proteína plasmática, mientras que el FGF2 se añadió a la

solución de trombina. Las esponjas se fundieron con las dos mezclas y la liberación del FGF2 se determinó en un ensayo FDCP, *vide supra*.

Materiales y métodos:

[0189] Proteína plasmática (aproximadamente 20-65 mg de fibrinógeno / ml; Omrix, sin plasminógeno).

[0190] Ácido hialurónico no reticulado (MTF o BTG),
Heparina (Sigma, MW 6000)

Una esponja de FGF2 (ProChon) 2,5 ug per 75 ul

[0191] Se prepararon esponjas de fibrina sustancialmente libres de plasminógeno y agentes quelantes orgánicos usando el método descrito en el ejemplo 1 con la siguiente modificación: la solución de proteína plasmática compuesta por ácido hialurónico no reticulado con una concentración final del 0,08%.

[0192] El primer conjunto de esponjas se preparó mezclando soluciones de heparina con FGF2 y la adición de la mezcla a la solución de proteína plasmática.

[0193] El segundo conjunto de esponjas se preparó mediante la adición de heparina a la solución de proteína plasmática con una concentración final de 0,1, 0,5 o 2,5 ug / ml. Se añadió FGF2 a la solución de trombina para hacer que la concentración final fuera de 2,5 ug/por esponja. Se fundieron las esponjas como se ha descrito anteriormente. La liberación de FGF2 se determinó en un ensayo de FDCP como se describe a continuación.

[0194] Ensayo FDCP: La línea celular FDCP es una línea celular interlecina-3 de una médula ósea de origen murino inmortalizada que no expresa receptores endógenos de FGF (FGFR). En cuanto a la transfección FGFR cDNA de la línea celular FDCP exhibía una respuesta proliferativa dependiente de la dosis de FGF que puede reemplazar la dependencia de IL-3. El FGFR transferido a células FDCP pueden utilizarse para la detección de FGFR. Las respuestas de las células FDCP a varios ligandos es cuantificada por un ensayo de proliferación celular con reactivo XTT (Kit de proliferación de células, Biologic Industries Co.). El método se basa en la capacidad de las enzimas mitocondriales para reducir las sales de tetrazolio en un compuesto colorigénico que puede ser cuantificado y que es un indicativo de viabilidad celular.

[0195] En concreto, las células estables FDCP que expresan el FGFR1 (FDCP-FGFR1), fueron cultivadas en "medio completo" (medio de Iscove que contiene 2 ml de glutamina, un 10% de FCS, 100 ug / ml de penicilina, ML / ml de estreptomycin) suplementado con 5 ug / ml de heparina. Las células se dividieron cada 3 días y se mantuvieron en cultivo no más de un mes. Un día antes del experimento, las células se dividen. Antes del experimento las células se lavaron 3 veces (1.000 rpm, 6 min) en medio completo. Las células se resuspendieron y se contaron con azul de tripano. Veinte mil células (2×10^4) se fueron añadiendo a cada pocillo de la placa de 96 pocillos en 50 µl en medio completo con o sin heparina. El medio condicionado de las esponjas compuestas de FGF o FGF complejo con los diversos glicosaminoglicanos se añadió a un volumen adicional de 50 µl en medio completo para tener un volumen final de 100 µl. La placa se incubó durante 48 horas a 37°C. Para probar la proliferación celular, se añadieron 100 µl de reactivo de PMS a 5 ml de reactivo XTT y se mezcló bien (según el protocolo de fabricación). Se tomaron 50 µl alícuotas de la solución anterior y las placas se incubaron a 37°C durante 4 horas y el color desarrollado fue leído por un lector espectro-ELISA a A_{490nm} .

Las figuras 4A y 4B muestran los resultados de este ensayo de la invención para una esponja hecha de proteínas plasmáticas comerciales sustancialmente libres de plasminógeno (Omrix, final 20 mg / ml) compuestas por el 0,08% de ácido hialurónico no reticulado, bien por la adición de variantes de heparina y FGF2 que han sido previamente mezclados (mezcla) al componente de proteína plasmática de la esponja *ab initio* o bien por la adición de heparina a la solución de proteína plasmática y la variante de FGF2 a la solución de trombina (SEP), seguido del mezclado y la fundición del coágulo. Las esponjas están compuestas por 0,5, 1,5 o 2,5 ug / ml de heparina y 1 ug variante total de FGF2. El sobrenadante se testó después de varios días y se registraron los resultados para la proliferación. La figura 4A muestra la liberación de la variante de FGF2 de una esponja compuesta de heparina y FGF2v tras 1, 3 y 5 días. La figura 4B muestra el porcentaje de liberación total de un período comprendido entre 5 y 37 días. El perfil de liberación del FGF depende de la concentración de heparina en la esponja. Sin estar ligado a una teoría en particular, la heparina puede servir como estabilizador del FGF liberado. La figura 4C muestra el perfil de liberación de más de 5 días de una variante de FGF de una esponja compuesta de heparina, fibrinógeno comercial y ácido tranexámico o proteína plasmática sustancialmente libre de agentes antifibrinolíticos. Los resultados muestran un perfil de liberación óptimo para ambas composiciones.

Ejemplo 9: Aislamiento y cultivo de condrocitos

Reactivos:

[0196] Colagenasa Tipo 2; Worthington Biochemical Corp. (Cat. #: 4147)

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

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

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

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

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

5

Preparación de implantes para cartílago articular

10

[0197] La esponja de la presente invención se puede utilizar como un armazón portador de células, para la reconstrucción y regeneración del tejido. Por una parte, las células se cultivan en la esponja *in vitro* antes de la implantación. Por otra parte, la esponja se cultiva con células inmediatamente antes de la implantación y las células se dejan crecer y proliferar *in vivo*.

15

[0198] Las biopsias del cartílago a partir de cartílago de cerdo fresco se dividieron en secciones de pequeñas piezas, de aproximadamente 3-4 mm de grosor, se lavaron asépticamente con PBS y se colocaron en un tubo nuevo con 3 ml de medio MEM. El cartílago se puede obtener de cualquiera de las especies de vertebrados, y preferiblemente es alogénico o autólogo.

20

[0199] La collagenasa tipo II se diluyó a 1:5 y se le adicionó 1 ml a las piezas del cartílago y la mezcla se agitó suavemente en una incubadora a 37°C durante la noche. La mayor parte de la muestra fue asimilada, la suspensión se vertió a través de una gasa estéril para eliminar los residuos de la matriz y el material no asimilado. El filtrado fue centrifugado y se lavó dos veces para eliminar la enzima residual.

25

[0200] El número de células se determinó con un hemocitómetro y la viabilidad se determinó con la exclusión de azul de tripano. Las células se inocularon en matraces de cultivo de tejidos de 150 cm² en 30 ml de medio de cultivo en una concentración de 5x10⁶ células/ml. Los matraces se colocaron en una incubadora a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y al 95% de humedad. El medio de cultivo se cambió cada tres o cuatro días. Las células se adhieren y confluyen tras una semana de incubación.

30

[0201] El medio de la célula fue retirado y se adicionaron 3ml de solución de tripsina-EDTA y treinta ml de MEM+ FBS, la solución se centrifugó a 800g durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró, el pellet se dispersó y las células fueron contadas. Para crear una matriz portadora de células, se cultivaron 10²-10⁶ de células en un armazón de proteína plasmática de 9mm de diámetro y un grosor de 2mm (aproximadamente 0,2 cm³). Las matrices se colocaron en una incubadora a 37°C, durante 1 hora y 1ml de medio recién preparado se le adicionó a cada una.

35

El medio fue reemplazado con medio recién preparado y todos los días se tomaron matrices para el análisis de diferenciación y proliferación celular.

40

[0202] Por otra parte, la población de células adultas de las anteriores matrices expresa varios de los marcadores de diferenciación de los condrocitos. Uno de los varios fenotipos expresados durante la diferenciación de los condrocitos es la producción de glicosaminoglicano (GAG). La producción de GAGs fue identificada en la tinción histológica utilizando azul de alcian y se cuantificó utilizando el método de coloración DMB (3,3'-dimetoxobencidina dihidrocloruro). La matriz extracelular del cartílago puede ser identificada también por la tinción de azul de toluidina y rojo rápido.

45

Ejemplo 10: Ensayo de proliferación celular

50

[0203] La proliferación de las células de cartílago en la matriz de la invención, se cuantificó por uno de estos dos métodos: Cy-QUANT® (Molecular Probes) o reactivo XTT (Biological Industries, Co.). La matriz de proteína plasmática se disolvió en collagenasa u otras enzimas y las células se recolectaron por centrifugación y se sometieron al análisis según los protocolos del fabricante.

55

[0204] En un experimento, los condrocitos articulares humanos (10⁴-10⁶ células/30-100 ul) se cultivaron en matrices sustancialmente libres de agentes antifibrinolíticos exógenos en placas de micropozos. Las células se cultivaron durante la noche en MEM, se adicionaron 34 U de collagenasa y las células o células-esponja, se incubaron durante cuatro horas. El reactivo XTT se adicionó durante 3-4 horas y las placas se leyeron en un lector ELISA a A490 nm. Los resultados muestran que la tasa de proliferación celular no se vio afectada ni por la presencia de la esponja ni por la adición de la collagenasa. Las figuras 5A, 5B, 5C y 5D muestran condrocitos porcinos (0,5 x 10⁶ células en 30 ul) que han sido cultivados (6 días) en una esponja de fibrina a partir de plasma humano (30 mg / ml) compuesto del 0,024% de Hylan 1 ug derivado de FGF. Las figuras 5A y 5B muestran una tinción de hematoxilina y eosina (H & E) (aumento de 100x). La figura 5C muestra un aumento de 400x de una sección de esponja teñida con tinción de Masson. Obsérvese la tinción de las células y la matriz intracelular que rodea las células. La figura 5D muestra un aumento de 200x de una sección de una esponja teñida con tinción de Masson. Hay que tener en cuenta las células presentes en la gran cantidad de poros.

65

Ejemplo 11: Cultivo, crecimiento de células y líneas celulares en la matriz de fibrina

[0205] Con el fin de determinar la capacidad de la matriz de proteína plasmática para soportar el crecimiento celular se cultivaron y se dejaron crecer varios tipos diferentes de células y líneas celulares. Específicamente, se cultivaron en la matriz hepatocitos primarios de hígado de rata. Se prepararon esponjas de 1cm de diámetro compuestas de proteínas plasmáticas sustancialmente libres de plasminógeno (20 mg de proteína / ml, Omrix), 0,075% de ácido hialurónico y 1 UI de trombina/ml. Aproximadamente $6,6 \times 10^5$ hepatocitos primarios fueron cultivados en las esponjas en HDM (medio definido hormonalmente) sin suero y se incubaron durante tres días en los que se realizaron y se tiñeron muestras histológicas con H&E. La figura 6A muestra una sección representativa de una esponja que comprende hepatocitos. Hay que tener en cuenta la buena dispersión de las células a través de la matriz y la presencia de células típicas que mantienen sus características hepáticas.

[0206] Se ensayaron dos líneas celulares para determinar la viabilidad y el crecimiento dentro de las esponjas, la línea celular L8 del músculo esquelético de rata y la línea celular de ovario de hámster chino CHO. Dos millones de células fueron cultivadas en cada matriz y se incubaron durante tres días. La línea de células CHO se cultivó en medio de Iscove, la línea L8 en cultivos DMEM. Los cortes histológicos se realizaron y se tiñeron con H&E. Las figuras 6B y 6C muestran secciones de esponja con células CHO y L8, respectivamente. Además, las células CHO y L8 fueron retiradas de varias esponjas y se contaron usando azul de tripano. Las células L8 se mostraron con un 57-67% de viabilidad, mientras que las células CHO mostraron más del 85% de viabilidad. Ambas figuras muestran una buena distribución y viabilidad celular. La matriz de la invención proporciona un almacén mejorado para la ingeniería y regeneración tisular.

Ejemplo 12: Formación de cartílago ectópico en ratones desnudos

[0207] El ensayo se diseñó para determinar la capacidad de los condrocitos aislados para crear neocartílagos en una zona ectópica y para determinar la calidad de este cartílago si se compara con el cartílago natural.

[0208] Los condrocitos humanos y porcinos cultivados en matrices de la invención se usaron para inducir el cartílago ectópico en el dorso de ratones desnudos.

[0209] Secciones de tratamiento: Los grupos de estudio incluyen diferentes cantidades de células cultivadas en la matriz de fibrina sustancialmente libre de plasminógeno. Cualquiera de los condrocitos humanos o porcinos 10^5 (10^5) o 10^6 (10^6) se cultivaron en una esponja de fibrina a partir de una placa de 96 pocillos (~ 65 ul). El grupo de control consistía en matrices implantadas sin células.

[0210] Preparación de matrices de fibrina: El método para la preparación de esponjas consiste en mezclar una solución de fibrinógeno libre de plasminógeno (Omrix), con una solución de trombina (Omrix) en presencia de ácido hialurónico no reticulado (BTG), dando así lugar a una concentración final de 20 mg de fibrinógeno/ml, 0,5 UI de trombina/mg de fibrinógeno y 0,08% de ácido hialurónico. Se añadieron las soluciones a un molde (placa de 96 pocillos, volumen de 65 ml), donde tuvo lugar la coagulación a temperatura ambiente. El coágulo se congeló rápidamente a -70°C , seguido de liofilización dando como resultado un implante (matriz,esponja) con textura esponjosa.

[0211] Cultivo: Las esponjas fueron cultivadas con condrocitos humanos o porcinos (10^5 - 10^6 /20 ul medio de cultivo en una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37°C durante 1 hora. El medio de cultivo se añadió al pocillo y la esponja se incubó durante un periodo de 24 - 48 horas. La esponja se colocó en las incisiones subcutáneas hechas en el dorso de los ratones desnudos.

[0212] Procedimiento de implantación: Los animales fueron anestesiados con ketamina-xilazina. La piel del dorso fue afeitada y desinfectada con alcohol. Se hicieron dos incisiones a cada lado de la espalda, paralelas a la columna vertebral. En cada incisión se hizo un bolsillo subcutáneo o un bolsillo de la fascia muscular mediante disección roma. Las esponjas fueron implantadas en los bolsillos según la sección del tratamiento. La piel se cerró con sutura simple. Cada tratamiento se repitió 5 veces y en cada ratón se implantaron 4 esponjas. Véase a continuación la tabla 2.

Tabla 2: Ensayo experimental

Ratón N°	Proximal izquierdo	Distal izquierdo	Proximal derecho	Distal derecho	Etiquetado
1	1×10^5 Humano	1×10^6 Humano	1×10^5 Porcino	1×10^6 Porcino	Sin etiqueta
2	1×10^6 Humano	1×10^5 Humano	1×10^6 Porcino	Esponja w/o células	1 oreja dcha
3	1×10^6 Porcino	1×10^5 Porcino	1×10^5 Humano	1×10^6 Humano	1 oreja izq
4	1×10^5 Porcino	Esponja w/o células	1×10^6 Humano	1×10^5 Humano	2 oreja dcha
5	1×10^6 Humano	1×10^6 Porcino	Esponja w/o células	1×10^5 Humano	2 oreja izq
6	Esponja w/o células	Esponja w/o células	1×10^6 Porcino	1×10^5 Porcino	DCHA+IZQ

- 5 **[0213]** Evaluación de la formación del cartílago inducido: Una o cuatro semanas tras la implantación se sacrificaron los ratones recuperándose los implantes con tejido circundante y se prepararon para la evaluación de la histología. La evaluación microscópica consiste en una descripción morfológica completa del implante. Análisis adicionales incluyen la tinción de safranina o H&E, azul alcian y tinción de anticógeno tipo II.
- 10 **[0214]** La figura 7A muestra el procedimiento de implantación. La figura 7B muestra el crecimiento del cartílago ectópico derivado de una esponja con células incorporadas (células 10^5) en el dorso de un ratón, las figuras 8A, 8B y 8C muestran una sección teñida con hematoxilina-eosina de los condrocitos humanos de un tapón de neocartílago tras una semana. La figura 8A muestra un corte histológico con algunas células que muestran una fuerte tinción de la matriz del cartílago utilizando azul de toluidina y rojo rápido. Las figuras 8B y 8C muestran secciones histológicas teñidas con H&E. Hay que tener en cuenta la buena dispersión de las células y la presencia de la matriz celular que rodea las células. Las figuras 9A y 9B muestran una sección teñida con hematoxilina-eosina de los condrocitos porcinos con aumentos de 40x y 200x tras 4 semanas de crecimiento *in situ*.
- 15 **[0215]** Los resultados de este experimento confirmaron que la matriz compuesta de proteínas plasmáticas sustancialmente libres de plasminógeno es una matriz efectiva para la formación de cartílago. Las matrices no son ni inmunógenas ni tóxicas, y soportan el crecimiento y la diferenciación de condrocitos.
- 20

Ejemplo 13: Método para la preparación de la matriz

- 25 **[0216]** Las esponjas se prepararon de dos formas diferentes y se testaron para la viabilidad y la dispersión celular. Ambos métodos comprenden las etapas de la preparación de soluciones de proteína plasmática y trombina. Un método se compone además de la dispensación secuencial de la trombina y las soluciones de fibrinógeno en un molde. El segundo método, "premezcla", requiere que las dos soluciones se mezclen antes de la disposición en un molde. Las esponjas resultantes son diferentes en términos de porosidad y capacidad de absorción celular. La figura 30 10A muestra la viabilidad celular de los condrocitos en las esponjas preparadas usando los dos métodos diferentes. La viabilidad celular es similar en ambos tipos de esponjas. Se puede comprobar una diferencia en la porosidad y en la dispersión celular. La figura 10B muestra las células que se asientan en las capas superiores de una esponja preparada por el método de premezcla. La figura 10C muestra la distribución de células en toda la matriz en una esponja preparada según el método en el que las soluciones se funden en el molde de forma secuencial. Algunas 35 aplicaciones pueden beneficiar un tipo de esponja sobre otro.

Ejemplo 14: Modelo de reparación del cartílago de una oveja

- 40 **[0217]** Este estudio fue diseñado para evaluar la capacidad de los condrocitos asignados a la matriz de fibrina de la invención para la reconstrucción del cartílago en un modelo de animal de gran tamaño. Un total de 20 ovejas fueron elegidas cada una con un peso aproximado entre 60 y 80 kg. Ocho de los animales se sometieron a un procedimiento de extracción de los condrocitos antes de la implantación. Los condrocitos extraídos se ampliaron y se clasificaron en matrices de fibrina humana recombinante.
- 45 **[0218]** Las condiciones de alojamiento de los animales estaban conforme a las leyes y reglamentos aplicables en materia de animales de laboratorio. Los experimentos se realizaron según los principios de las leyes locales para experimentación animal. Los animales fueron examinados en caso de hallar indicios de enfermedad o cojera. La aceptación en el estudio dependía de que estos estuviesen libres de enfermedades, sanos, y sin antecedentes de uso previo. La osteoartritis se excluyó mediante una radiografía preoperatoria. Los animales se acondicionaron durante un período adecuado de tiempo como se determinó en la institución. Cada animal se identifica con un 50 tatuaje y un crotal de número único. Los animales fueron asignados a los grupos de tratamiento mediante la asignación aleatoria de los números de identificación. El diseño del estudio se muestra a continuación en la tabla 3:

Tabla 3

# Oveja	Tratamiento	Tipo de matriz
1A-7A	No tratado	No tratado
1B-7B	Microfactura	Microfactura
1C-4C	Sólo matriz	TEA + AH reticulado
5C-8C	Sólo matriz	Sin plasminógeno + AH reticulado
9C-12C	Sólo matriz	Plasminógeno + AH no reticulado
1D-4D	Matriz + células	Sin plasminógeno + AH reticulado
5D-8D	Matriz + células	Sin plasminógeno + AH no reticulado

- 55 **[0219]** Se observó diariamente a los animales para comprobar su estado en el transcurso del estudio. En el improbable caso de que un animal se dañe, enferme o quede moribundo, se le atenderá siguiendo la práctica médica

veterinaria actual. Si se justifica, la eutanasia se llevará a cabo según las directrices establecidas por el Panel de la AVMA en Eutanasia (JAVMA, marzo de 2000). El veterinario encargado llevará a cabo un diagnóstico clínico y el tratamiento si el animal muestra signos de enfermedad.

- 5 **[0220]** Todos los animales fueron pesados durante el período de cuarentena, antes de la cirugía (día 0) y al final del estudio (día 112).
- [0221] Grupo A. Defectos no tratados:** En los animales 7b (14 defectos) los defectos condrales se crearon en el cóndilo y se dejaron sin tratar.
- 10 **[0222] Grupo B. Microfractura:** En 7 animales (14 defectos), la microfractura se realizó sin tratamiento adicional. Se realizaron cuatro microfracturas con punzones especiales en cada defecto hasta que se observó un sangrado punteado.
- 15 **[0223] Grupo C sólo matriz de Fibrina:** las matrices de fibrina compuestas de TEA y ácido hialurónico reticulado fueron implantadas en 4 ovejas (1C-4C). Se implantaron en 4 ovejas matrices de fibrina a partir de fibrinógeno libre de plasminógeno, ácido hialurónico reticulado (5C-8C) o no reticulado (9C-12C). Las matrices fueron implantadas después de la creación de los defectos como se describe a continuación.
- 20 **[0224] Grupo D matriz de fibrina portadora de células:** se implantaron en 4 ovejas matrices de fibrina preparadas a partir de plasminógeno fibrinógeno y cualquier ácido hialurónico reticulado (ID-4D)) o no reticulado (5D-8D) cultivadas con condrocitos y en los defectos de la rodilla).
- 25 **[0225] Operación:** Se cubrió la articulación de la rodilla izquierda con un paño estéril y se abrió por un abordaje anteromedial bajo anestesia general. Se descubrió el cóndilo medial, y se extrajeron pequeños trozos de cartílago de las superficies de baja carga de peso de la tróclea y de la escotadura intercondílea. El cartílago fue cortado superficialmente con un bisturí para evitar el sangrado. El cierre de la herida se realizó a capas. Se aplicó una inmovilización con escayola para la articulación de la rodilla y el tobillo durante cinco días y se limitó la actividad en la jaula para reducir la carga de la articulación con el fin de evitar el desplazamiento de la rótula. La muestra de tejido fue troceada y lavada en condiciones estériles y las células fueron aisladas por la colagenasa siguiendo un protocolo estándar de asimilación. Las células se cultivaron en matraces de 75 ml (Corning) y se incubaron a 37°C. El cambio de medio se realizó cada día. Después de 3 semanas, aproximadamente 200.000 células (2×10^5) se cultivaron en las matrices de fibrina seleccionadas y se cultivaron durante 4 días en placas de 6 pocillos. Las matrices de células fueron transferidas con un paño estéril a la sala de operación. Se descubrió el cóndilo medial de la rodilla derecha de la oveja. Usando un punzón de 4,5 mm (Smith & Nephew), se hicieron dos defectos, 1 y 2,5 cm en el distal de la escotadura intercondílea en el cóndilo medial del fémur. Los defectos se describen con el punzón dérmico hasta el hueso subcondral y el cartílago se eliminó con pequeñas curetas. Se intentará eliminar todo rastro de cartílago articular, para ello se debe raspar suavemente la superficie del cartílago calcificado. Debe observarse que no haya sangrado del hueso subcondral. Las matrices de fibrina se fijaron en su sitio con goma de fibrina.
- 30
- 35
- 40 **[0226]** Después del tratamiento de defecto, los puntos de sangrado de la cápsula fueron detenidos por la cauterización y el cierre de la herida se realizó a capas. La fijación de escayola se aplicó durante otros cinco días y la actividad en la jaula se limitó para reducir la carga de la articulación con el fin de prevenir la dislocación del tejido del injerto reconstructivo. Tras haber retirado la escayola, a las ovejas se les dio total libertad en su actividad, y tuvieron una nutrición equilibrada dos veces al día. Hasta el segundo día del postoperatorio se administraron 2gr de cefazolina tres veces al día.
- 45
- [0227]** Todos los animales del grupo C y D fueron sacrificados a las 16 semanas del postoperatorio como se describe a continuación en Mankin, H (NEJM (1974) 291:1335-1340).
- 50 **[0228]** Necropsia: Los animales fueron sacrificados a las 16 semanas de la operación. Los animales fueron pesados antes del sacrificio. Se indujo al sujeto desangrado sedación profunda con una mezcla de ketamina-xilazina según las directrices establecidas por el Panel AVMA en Eutanasia (JAVMA, marzo de 2000).
- 55 **[0229]** Se llevó a cabo la evaluación total y la toma de muestras como se describe en la tabla 4. Las superficies articulares opuestas a las zonas defectuosas fueron examinadas por si había cualquier superficie de articulación anormal. Además, se realizaron evaluaciones macroscópicas de las articulaciones de la rodilla para determinar la reconstrucción del cartílago sobre la base de los criterios de puntuación previos listados en la tabla 5. Los fémures, las rótulas, la membrana sinovial, y los ganglios linfáticos poplíteos se recogieron y se colocaron en recipientes etiquetados apropiadamente. Inmediatamente después de la extracción de tejidos, se realizaron exámenes morfológicos macroscópicos de la superficie del cartílago y se llevaron a cabo registros fotográficos de cada muestra.
- 60

Tabla 4: Evaluación macroscópica y colección de muestra

Muestra	Evaluación macroscópica	Colección de muestra	Fotografía y puntuación
---------	-------------------------	----------------------	-------------------------

Articulación de la rodilla (incl. la zona de defecto de la articulación)	X	X	X
--	---	---	---

[0230] Observaciones Morfológicas Macroscópicas: después de la recogida de las articulaciones de la rodilla, se abrieron las articulaciones, se fotografiaron y se puntuó la zona de defecto de la superficie como se indica en la tabla 5. Se examinó la membrana sinovial para determinar el grado de inflamación. Se recogió y se analizó líquido articular.

Tabla 5: Criterios de puntuación para las evaluaciones morfológicas macroscópicas

Características	Clasificación	Puntuación
Proceso de integración (relativo al tejido nuevo del cartílago nativo)	Completo	2
	Parcial	1
	Ninguno	0
Suavidad de la superficie del cartílago	Suave	2
	Intermedio	1
	Rugoso	0
Superficie del cartílago (grado de relleno)	Rasante	2
	Depresión ligera	1
	Depresión	0
Color del cartílago, opacidad o translucidez del neocartílago	Transparente	2
	Traslúcido	1
	Opaco	0

[0231] Histología y evaluación histológica: Las rodillas se abrieron en condiciones estériles y se obtuvo una muestra de cultivo. El sinovio fue documentado macroscópicamente, los defectos fotografiados y la articulación examinada concienzudamente. El fémur distal se retiró y se colocó en formalina neutra tamponada al 10% durante 12 horas. Las áreas de tróclea que contienen los defectos y las áreas extraídas fueron analizadas y conservadas en formalina al 10% durante 4 días. Las muestras fueron posteriormente colocadas en una solución de descalcificación (Tritriplex 100g (Epignost, Austria) y 33g de Tris-hidroximetileno-amnometano (Merck Eurolab, Bélgica) por litro) dos a cuatro días a temperatura ambiente. Las muestras descalcificadas se integraron en parafina y se cortaron con un microtomo en secciones de 5 µm de grosor.

[0232] Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E), safranina o / verde rápido, azul de alciano y azán para la evaluación de los tipos de tejidos. La inmunohistoquímica con anticuerpos para colágenos de tipo I y tipo II se lleva a cabo según un protocolo estándar de ABC utilizando anticuerpos conjugados con HRP. El cartílago y los tendones ovinos de un animal sano son utilizados como controles.

[0233] La microscopía óptica se lleva a cabo en un microscopio de investigación Vanox Olympus poniendo en marcha un método histomorfométrico para determinar el porcentaje de los tipos de tejidos seleccionados (análisis). Una serie de cortes histológicos transversales son evaluados a partir de la porción media del defecto. El relleno del defecto se determina como un porcentaje de área de tejido reconstructivo en el defecto, basado en el área de la sección transversal en un plano sagital a través del centro de la lesión. Se evaluó el área, el relleno, la altura, la base del defecto, y el tipo de tejido. Los tipos de tejidos se caracterizan de la siguiente manera: 1. tejido fibroso 2. tejido de transición 3. tejido hialino y 4. cartílago articular. Se realiza un análisis semicuantitativo del defecto y del tejido adyacente según las puntuaciones estándares adaptadas de O'Driscoll, Pineda y Frenkel.

Ejemplo 15: Ensayo Clínico Humano

[0234] Ha sido presentado y aprobado (por el Comité de Ética del Hospital de la Universidad de Viena) un estudio de factibilidad para evaluar la seguridad y el rendimiento de las matrices de fibrina de la invención en el tratamiento de los defectos crónicos del cartílago del cóndilo femoral.

[0235] Se lleva a cabo en pacientes un estudio en fase I, a etiqueta abierta no aleatorizado utiliza una matriz de fibrina o una matriz portadora de células de fibrina preparada con fibrinógeno libre de plasminógeno y condrocitos autólogos. Los pacientes que cumplan los criterios de entrada serán sometidos a un procedimiento artroscópico para confirmar el diagnóstico y para extraer una biopsia para el crecimiento de condrocitos para el futuro trasplante. De tres a seis semanas después de la cosecha de células, los pacientes serán hospitalizados para la cirugía. Después de la cirugía, los pacientes serán monitorizados por su seguridad de la siguiente manera: durante los 5-7 días de hospitalización, tras el alta en la semana 2 y semana 6, y la evaluación del procedimiento en la semana 12, mes 6 y mes 12.

[0236] El fin principal es evaluar la seguridad de una matriz portadora de células de la invención, en el que la matriz sirve como un almacén para el cultivo y el trasplante de condrocitos autólogos en el tratamiento de una lesión crónica del cartílago cóndilo.

[0237] El objetivo secundario es evaluar la actuación de una matriz portadora de células en la función restauradora, según la mejoría en los resultados de la RMI, un cuestionario de calidad de vida y puntuación de la función articular. Los parámetros de seguridad incluirán los signos vitales, la química sérica, hematología y eventos adversos sistémicos y locales. Se presentan todos los parámetros, incluyendo los criterios de inclusión, exclusión y retiro del paciente.

Ejemplo 16: Procedimiento en un solo paso para el tratamiento de cartílago dañado: Apto para artroscopia o hemi-artrotomía

[0238] El implante de condrocitos autólogos ha demostrado ser clínicamente eficaz en la reconstrucción del cartílago tipo hialino para aislar los defectos condrales de la rodilla. Las terapias actuales incluyen tres principales pasos:

1. La artroscopia diagnóstica y biopsia de cartílago sano.
2. El cultivo de células.
3. La inyección de condrocitos cultivados en la lesión bajo un colgajo perióstico, que se toma de la tibia y se sutura sobre la lesión.

[0239] Las desventajas de la técnica incluyen la necesidad de dos procedimientos quirúrgicos separados, la necesidad de una zona de cirugía para aislar un colgajo perióstico y la tendencia para el sobrecrecimiento del cartílago debido a la presencia del colgajo. Una variante mejorada de esta técnica proporciona un implante de la matriz de la presente invención. Un método menos traumático se presenta en este documento, donde el paciente se somete a un procedimiento quirúrgico único para la reconstrucción del cartílago.

[0240] Procedimiento: Un paciente con un defecto del cartílago puede donar plasma autólogo varios días antes de la artroscopia o hemi-artrotomía. La sangre (aproximadamente de 100 a 250 ml) se extrae y se purifican las proteínas plasmáticas, eliminando el plasminógeno. Una matriz de proteína plasmática, o varias matrices, son preparadas, etiquetadas y almacenadas de manera aséptica hasta el día de la cirugía.

[0241] Opcionalmente, en el día de la cirugía, se retira el cartílago de la articulación del paciente, se corta en trozos pequeños y se coloca en un tubo de ensayo que contiene collagenasa, hialuronidasa u otro tipo de enzimas de degradación del cartílago o combinaciones de los mismos.

[0242] El cirujano trata la región defectuosa de la articulación mediante la eliminación de los tejidos dañados, la limpieza y la preparación de la zona para el implante. La matriz preparada se retira de su envase y se corta para encajar en la zona defectuosa. Aproximadamente a los 20-30 minutos siguientes del tratamiento enzimático, las células y los pedazos pequeños de cartílago se centrifugan en una centrifugadora de mesa, se lavan en PBS y se resuspenden en una pequeña cantidad (50 ul-1000 ul) de PBS. El cirujano cultiva *in situ* las células en la esponja. Alternativamente, las células se absorben en la esponja y la esponja portadora de células se integra en la región de la articulación defectuosa. Opcionalmente, se añaden las enzimas de degradación de la matriz extracelular y /u otros agentes bioactivos que incluyen factores de crecimiento y / o compuestos antiinflamatorios. En ciertos casos, el cirujano colocará una esponja seca directamente sobre la zona lesionada, opcionalmente añadirá solución de enzima a dicha esponja y colocará una segunda esponja portadora de células en la parte superior de la primera esponja. Se cierra la articulación, se trata como es habitual por un procedimiento artroscópico o hemi-artrotomía y se deja al paciente recuperarse.

Kit

[0243] Un kit compuesto de componentes útiles para practicar el método de la invención, permitirá la práctica conveniente del método de la invención en un ambiente quirúrgico. En una realización, un kit de la invención proporcionará componentes estériles apropiados para el uso fácil en el ambiente quirúrgico incluyendo soluciones estériles (solución salina, enzimas) y una matriz estéril libre que soporte los condrocitos autólogos preparados para ser integrados en el defecto superficial de la articulación y las instrucciones para su uso.

Ejemplo 17: Reparación de un modelo óseo

[0244] La matriz de proteína plasmática de la presente invención es útil para el tratamiento de defectos óseos incluyendo osteotomía, particularmente en las zonas del esqueleto que no soportan peso. Se utilizan modelos adecuados de animales para crear osteotomías bilaterales para demostrar la eficacia de la presente invención. Se practicó una osteotomía de entre 4 y 6 mm en un ejemplar de conejo de Nueva Zelanda en cumplimiento con el Comité de Protección Animal. Se elige el cúbito debido a que es sólo un ligero soporte de peso y permite la creación de un defecto óseo sin necesidad de un molde u otro tratamiento de inmovilización. Además, esta fisura constituye un defecto espontáneo en la curación que permite la evaluación del agente probado. Los principales indicadores de

curación de la fractura son la duración acelerada de la curación y la formación de callos. Los compuestos de prueba se componen de matrices de la invención y de matrices de control.

- 5 **[0245]** Procedimiento quirúrgico: Los animales son anestesiados según el protocolo estándar. La formación de la fisura se realiza en mitad del cúbito. Una esponja de la invención se coloca en la zona de la fisura de cada extremidad y se cierra la fractura. Los animales son tratados con analgésicos durante 3 días después de la operación. La duración total del experimento es de 6 semanas.
- 10 **[0246]** Tiempo de curación y evaluación de la calidad: El examen de rayos X presenta la evaluación del estado de la curación de la fractura. Se hacen radiografías a los conejos cada semana durante las 5 semanas posteriores a la cirugía. Las radiografías son valoradas por dos cirujanos ortopédicos a ciegas según un protocolo estándar de escala de clasificación.
- 15 **[0247]** Evaluación de calidad: al final del experimento, los conejos fueron sacrificados y la zona de la fractura fue enviada para una evaluación histológica y de fuerza mecánica. La histología fue puntuada por un patólogo para la evaluación de los cambios histológicos durante el proceso de curación usando métodos estándares de tinción y utilizando hematoxilina y eosina (H&E) para el citoplasma y el núcleo. Se aplica también la tinción de índigo-carmin para la detección de nuevos callos generados. La evaluación de la resistencia mecánica se lleva a cabo utilizando el método de los «4 puntos de inflexión»
- 20 **[0248]** Grupos de tratamiento: osteotomía simulada, osteotomía tratada solo con una esponja de fibrina, osteotomía tratada con una esponja de fibrina compuesta de glicosaminoglicano, factores de crecimiento de heparina opcionales.
- 25 **[0249]** Otro ejemplo de un modelo animal para la reconstrucción ósea se describe en Cook et al., (Am. J. Vet Res. 64:2-20,2003).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una matriz de fibrina porosa liofilizada está formada a partir de proteínas plasmáticas compuestas de fibrinógeno, trombina y factor XIII, la matriz contiene menos del 10% de humedad residual, sin agentes antifibrinolíticos exógenos añadidos y comprende menos de 1 mM de agentes quelantes orgánicos, donde las proteínas plasmáticas comprenden menos del 20% de plasminógeno presente normalmente en el plasma.
- 10 2. Un método para la preparación de una matriz de fibrina porosa liofilizada que contiene menos del 10% de humedad residual, sin agentes antifibrinolíticos exógenos añadidos, que contiene menos de 1 mM de agentes quelantes orgánicos, y que comprende menos del 20% de plasminógeno presente normalmente en el plasma comprende los siguientes pasos:
 - 15 Proporcionar una solución de trombina y una solución de proteína plasmática, la solución de proteína plasmática sin haber añadido agentes antifibrinolíticos exógenos añadidos, con menos de 1 mM de agentes quelantes orgánicos y que comprende menos del 20% de plasminógeno presente normalmente en el plasma.
 - Introducir la solución de trombina y la solución de proteína plasmática en un soporte sólido o en un molde en presencia de iones de calcio.
 - Incubar en las condiciones apropiadas para conseguir la coagulación.
 - 20 Congelar la mezcla coagulada.
 - Liofilizar la mezcla coagulada para obtener una esponja.
- 25 3. El uso de una matriz de fibrina porosa liofilizada según la reivindicación 1 para la preparación de un implante para ser implantado en la zona de enfermedad o lesión para el tratamiento de un tejido enfermo o lesionado.
- 30 4. Una matriz de fibrina porosa liofilizada según la reivindicación 1, el método según la reivindicación 2 o el uso según la reivindicación 3, en el que las proteínas plasmáticas contienen menos del 10% del plasminógeno presente en el plasma normal.
- 35 5. Una matriz de fibrina porosa liofilizada según la reivindicación 1, el método según la reivindicación 2 o el uso según la reivindicación 3, en el que las proteínas plasmáticas contienen menos del 5% del plasminógeno presente normalmente en el plasma.
6. Una matriz de fibrina porosa liofilizada, método o uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde las proteínas plasmáticas contienen proteínas purificadas a partir de una fuente plasmática.
7. Una matriz de fibrina porosa liofilizada, método o uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que además contiene al menos un aditivo seleccionado del grupo formado por polisacáridos, glicosaminoglicanos y polímeros sintéticos.
- 40 8. Una matriz de fibrina porosa liofilizada, método o uso según la reivindicación 7, en el que dicho glicosaminoglicano se selecciona a partir de ácido hialurónico reticulado y no reticulado.
- 45 9. Una matriz de fibrina porosa liofilizada, método o uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho glicosaminoglicano se selecciona a partir del grupo formado por heparina, heparina de bajo peso molecular, heparán sulfato o una combinación de los mismos.
- 50 10. Una matriz de fibrina porosa liofilizada, método o uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que contiene además al menos un agente bioactivo seleccionado de factores de crecimiento, citoquinas, plaquetas, sobrenadante de plaquetas, proteínas derivadas de las plaquetas, hormonas, analgésicos, agentes antiinflamatorios, agentes antimicrobianos y enzimas.
- 55 11. Una matriz de fibrina porosa liofilizada, método o uso según con la reivindicación 10, en el que dicho factor de crecimiento es un factor de crecimiento de fibroblastos seleccionado del grupo FGF-9, FGF-2, FGF-4, FGF-18 o una combinación de los mismos.
- 60 12. Una matriz de fibrina porosa liofilizada, método o uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que contiene además células.
- 65 13. Una matriz de fibrina porosa liofilizada, método o uso según la reivindicación 12 donde dichas células se seleccionan a partir de células madre, células progenitoras, condrocitos, osteoblastos, hepatocitos o tipos de células mesenquimales, endoteliales, epiteliales, uroteliales, endocrinas, neuronales, pancreáticas, renales y oculares.
14. Una matriz de fibrina porosa liofilizada, método o uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde al menos una de las proteínas plasmáticas es autóloga.

15. Una matriz de fibrina porosa liofilizada, método o uso según la reivindicación 14, en donde todas las proteínas del plasma son autólogas.
- 5 16. Una matriz de fibrina porosa liofilizada, método o uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde al menos una de las proteínas plasmáticas es recombinante.

Figura 1A

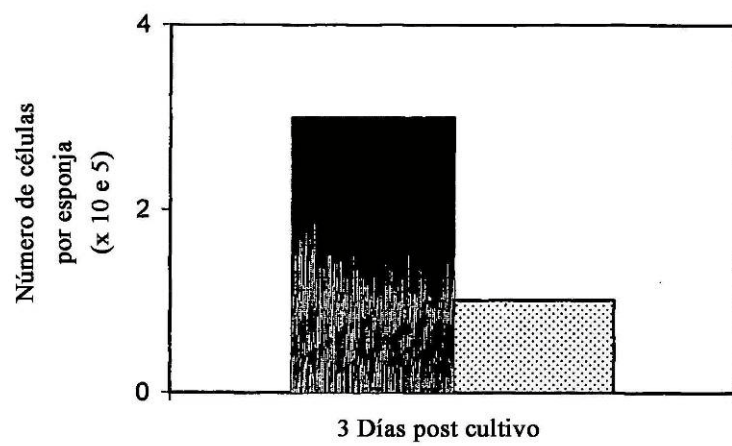
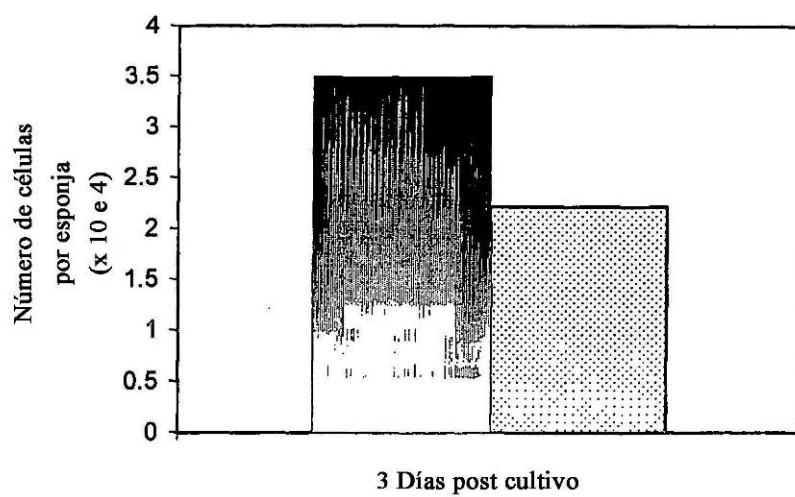


Figura 1B



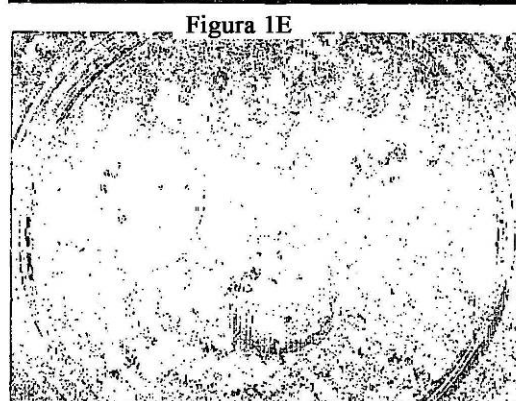
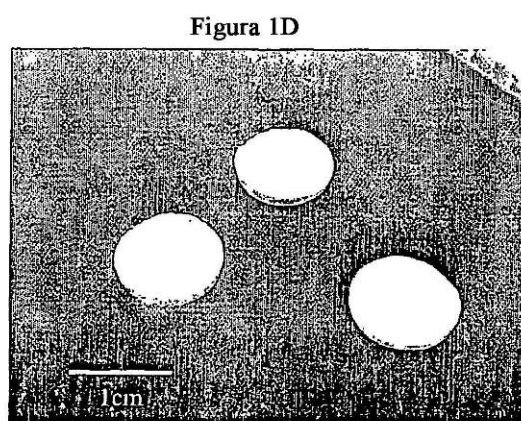
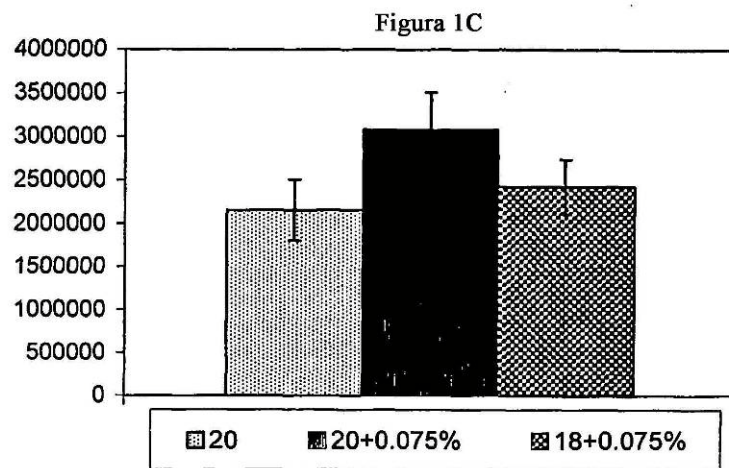


Figura 2A



Figura 2B

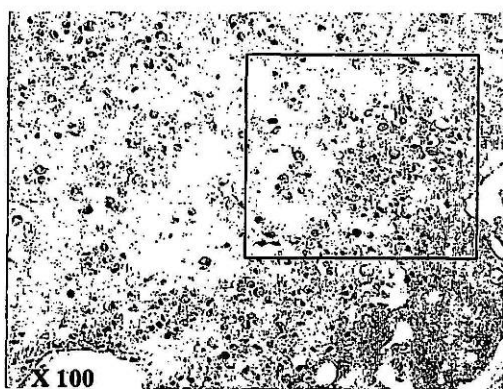


Figura 2C

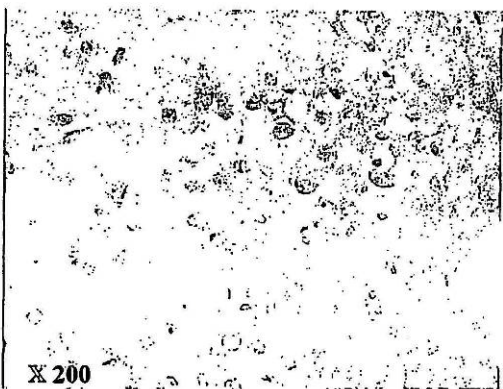


Figura 3A

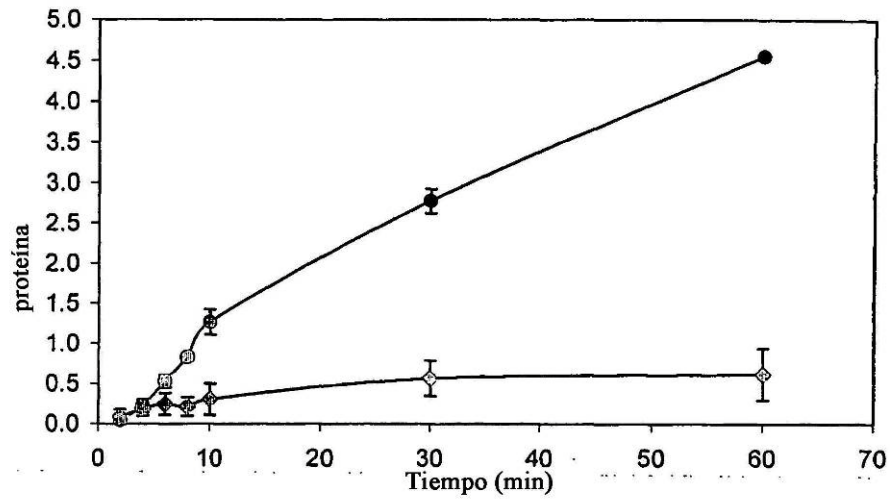


Figura 3B

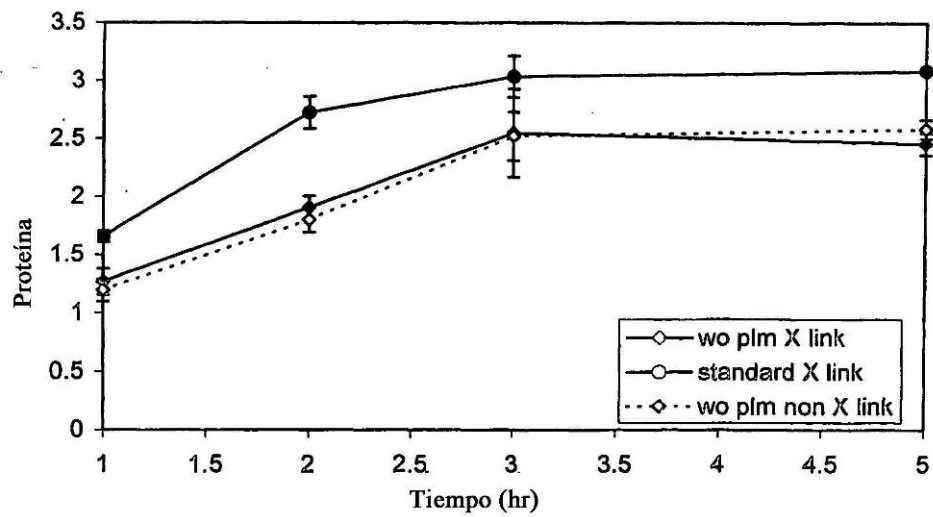


Figura 4A

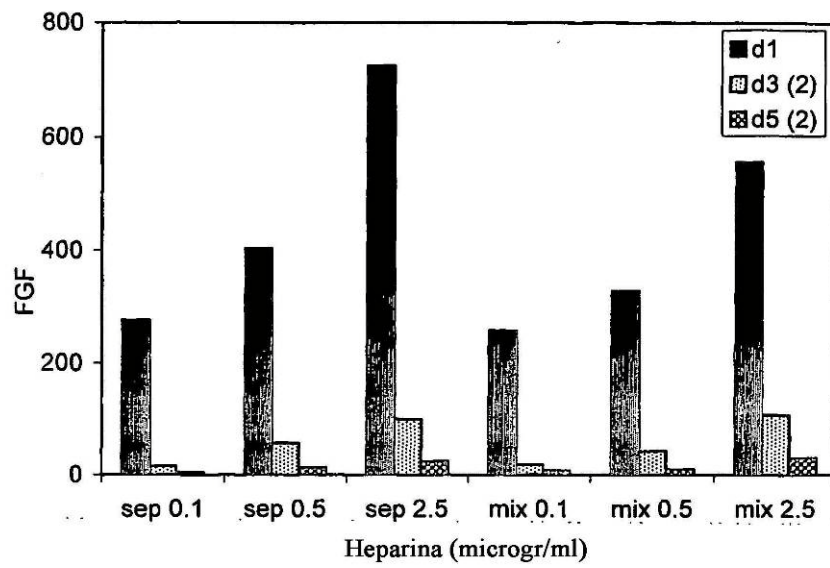


Figura 4B

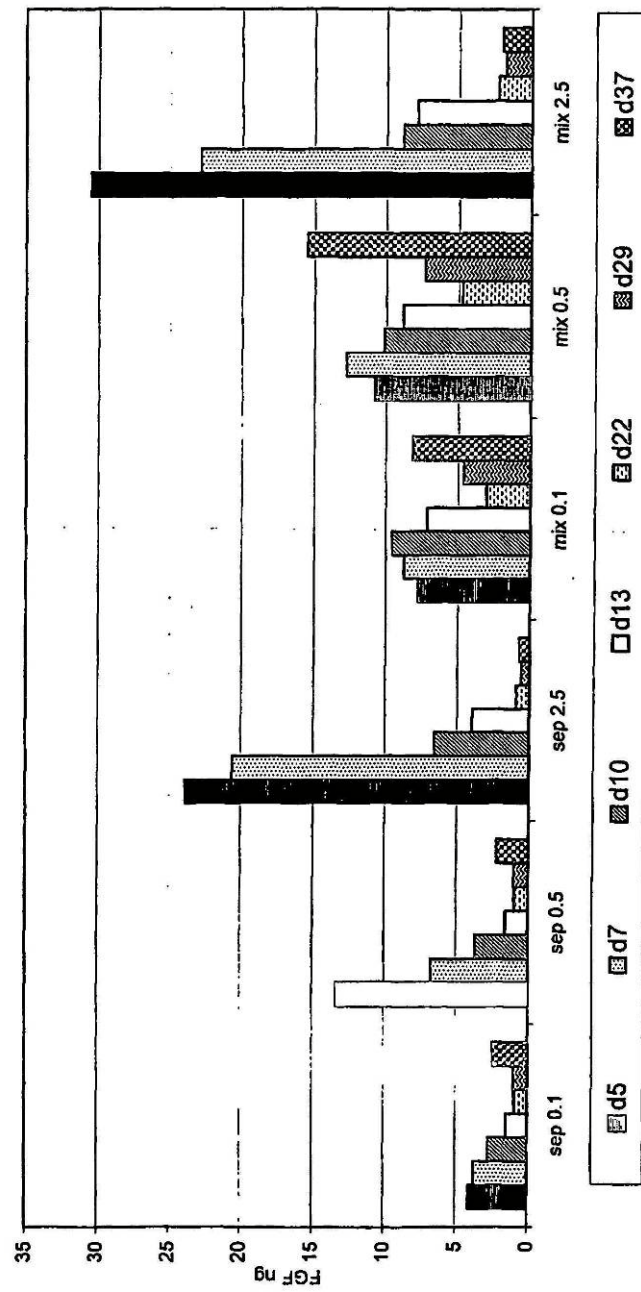


Figura 4C

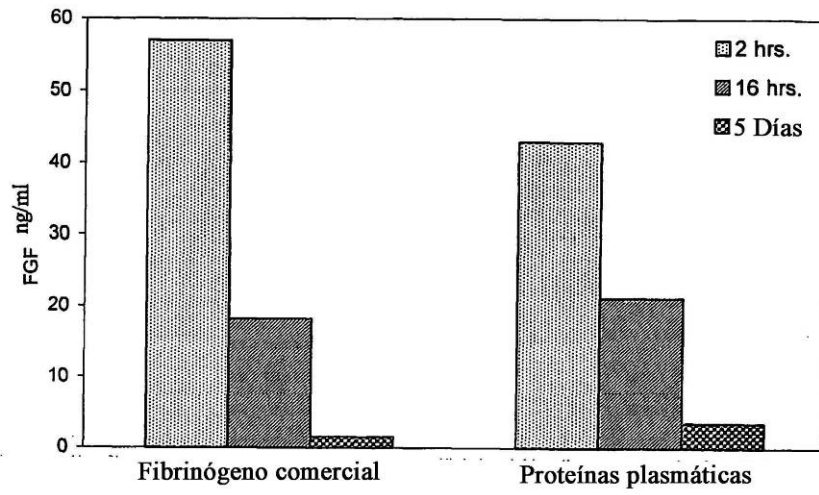


Figura 4D

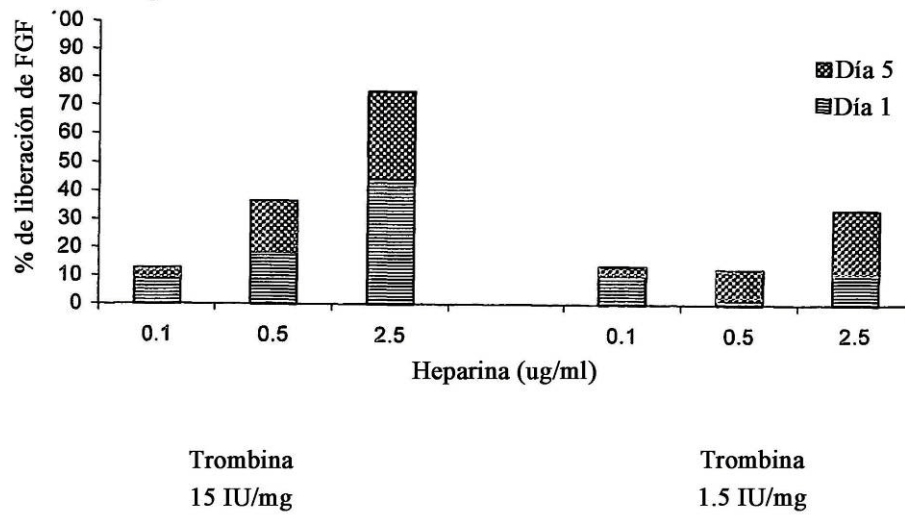


Figura 5A

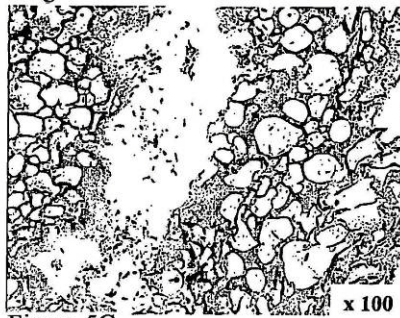


Figura 5B

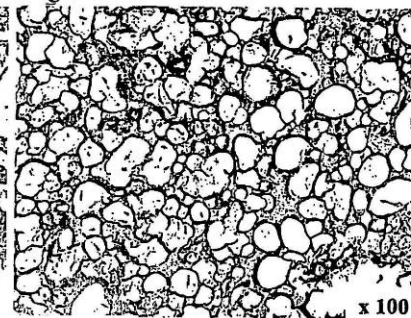


Figura 5C

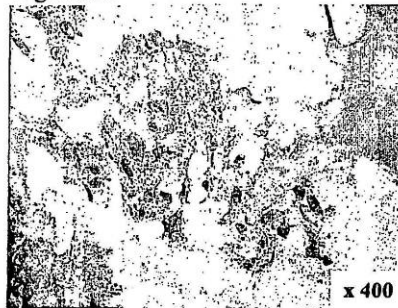


Figura 5D

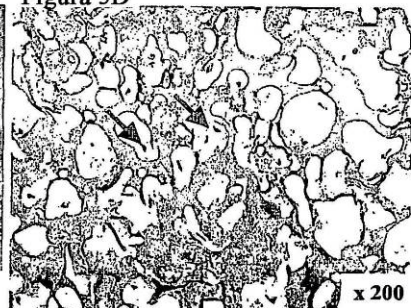


Figura 6A

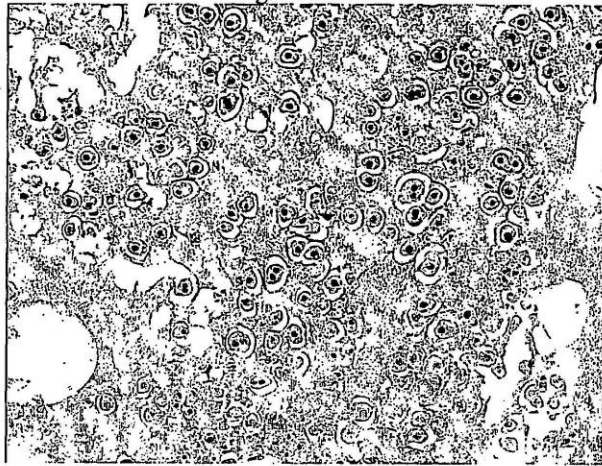


Figura 6B



Figura 6C



Figura 7A

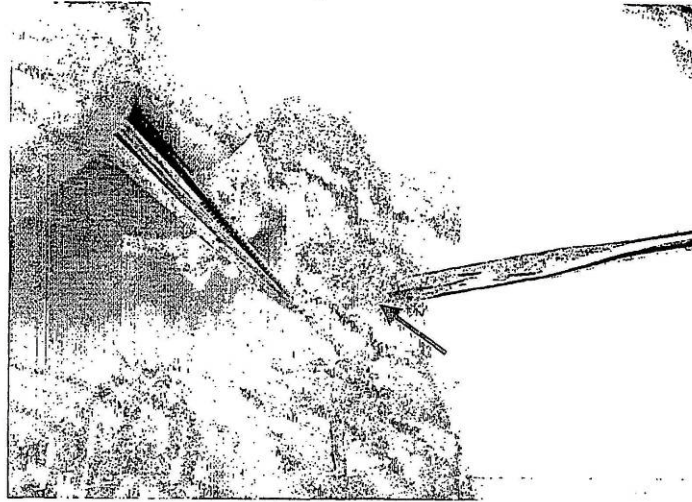


Figura 7B

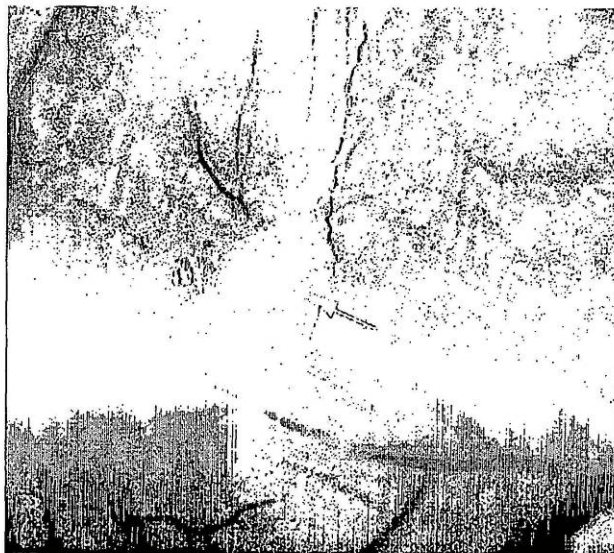


Figura 8A

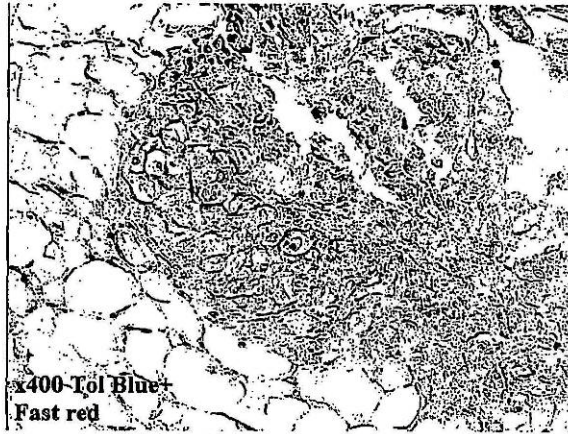


Figura 8B

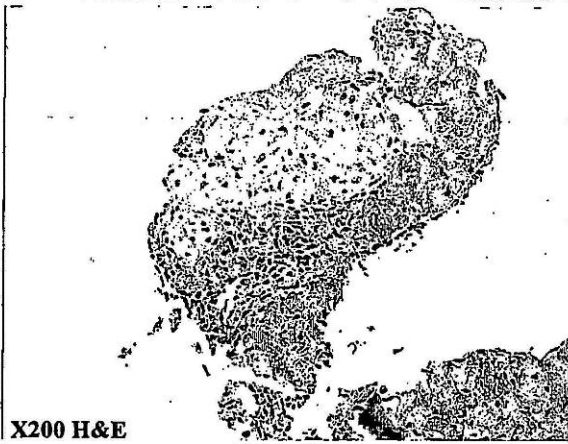


Figura 8C



Figura 9A

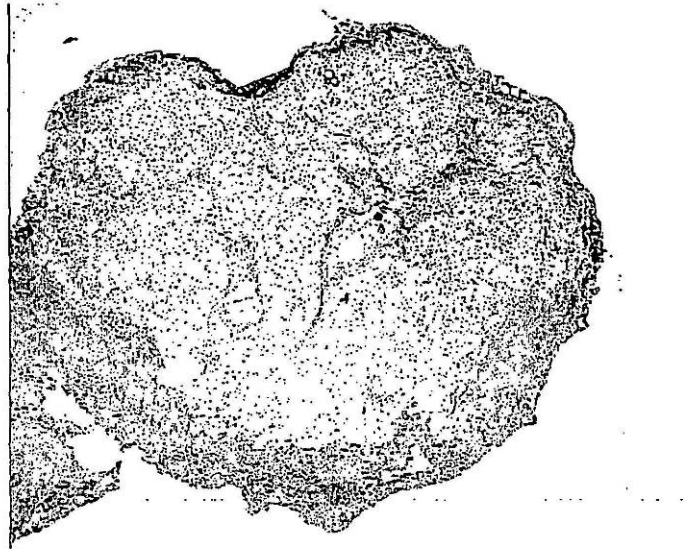
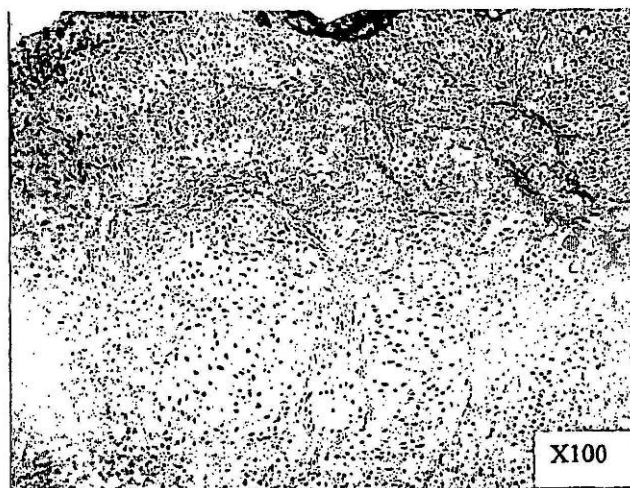


Figura 9B



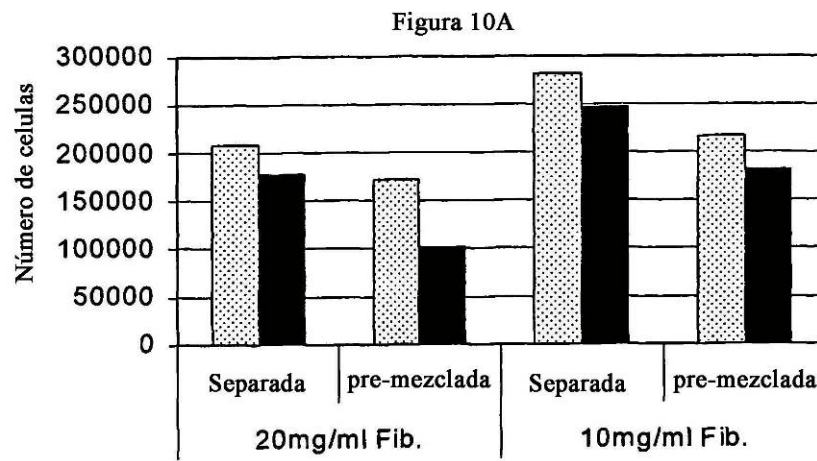


Figura 10B

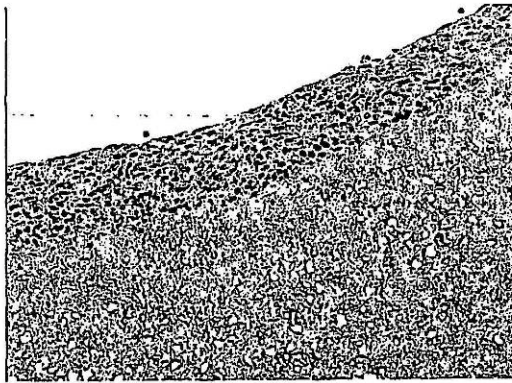


Figura 10C

