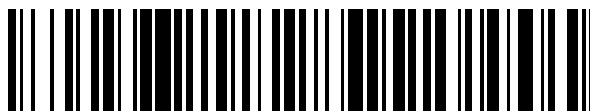


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 090**

51 Int. Cl.:

**A61P 19/00** (2006.01)  
**A61K 38/18** (2006.01)  
**A61K 38/19** (2006.01)  
**A61K 38/36** (2006.01)  
**A61K 38/39** (2006.01)  
**A61K 38/48** (2006.01)  
**A61K 33/00** (2006.01)  
**A61K 33/24** (2006.01)  
**A61K 33/42** (2006.01)  
**A61K 35/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2002 E 02709881 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2013 EP 1351697**

54 Título: **Fármaco para fomentar la regeneración de tejidos**

30 Prioridad:

**18.01.2001 AT 892001**

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

**24.02.2014**

73 Titular/es:

**WATZEK, GEORG (33.3%)**  
**Wassergasse 28**  
**1030 Wien, AT;**  
**GRUBER, REINHARD (33.3%) y**  
**BIO-PRODUCTS & BIO-ENGINEERING**  
**AKTIENGESELLSCHAFT (33.3%)**

72 Inventor/es:

**WATZEK, GEORG;**  
**GRUBER, REINHARD y**  
**EIBL, JOHANN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 444 090 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

Fármaco para fomentar la regeneración de tejidos

- 5 La presente invención se refiere a un fármaco para uso local para fomentar la regeneración de tejidos, especialmente tejido óseo.

10 Las células eucariotas mediante la estimulación adecuada pueden liberar partes de su membrana plasmática en el espacio extracelular. Estos fragmentos celulares contienen fracciones citoplásmicas y se denominan micropartículas. La formación de tales micropartículas se puede verificar en monocitos, linfocitos, células endoteliales, granulocitos y trombocitos. Por ejemplo, en trombocitos mediante estimulación con colágeno, trombina, el ionóforo de calcio A23187 y la proteína del sistema del complemento C5b-9 se produce la separación de tales elementos celulares (Tans G., Blood 1991; Sims PJ., J Biol Chem 1988). Además de las sustancias mencionadas, que producen un cambio en la concentración de calcio intracelular, se describen también la fosforilación de proteínas, la translocación de fosfolípidos, cambios en el citoesqueleto y fuerzas de cizalla en la formación de micropartículas trombocíticas.

15 Las micropartículas de trombocitos tienen características que pueden producir no solo una aceleración sino también una desaceleración de la coagulación sanguínea. Mediante la unión de alta afinidad de los factores que inducen la coagulación VIII, un cofactor de los complejos enzimáticos de tenasa, y Va, que junto con el factor Xa constituye el complejo protrombinasa, las micropartículas se dotan de una función de fomento de la coagulación. La unión de los factores a la superficie de las micropartículas se realiza mediante fosfatidilserina, un fosfolípido de la membrana celular. Por el contrario, la acumulación de "proteína S" produce una inactivación de los factores de coagulación Va y VIII, así como una unión de la proteína C y de la "proteína C activada", por lo cual se puede deducir una propiedad anticoagulante de las micropartículas (Tans G., Blood 1991). En comparación con los trombocitos activados las micropartículas muestran un mayor número de sitios de unión para los factores de coagulación IXa (Hoffman, M., Thrombin Haemost 1992) y Va (Sims PJ., JBC 1988). Además, las glicoproteínas GP IIb/IIIa, Ib, Ialla y P-selectina en la superficie celular permiten la unión de las micropartículas al endotelio vascular (George JN JCI 1986; Gawaz M, Atheroscler Thromb Vasc Biol 1996). Además de la activación de células endoteliales también se pudo demostrar la activación de monocitos y trombocitos por las micropartículas (Barry OP; Thromb Haemat 1999).

20 Se observaron concentraciones aumentadas de micropartículas en el torrente sanguíneo en esas enfermedades asociadas con una activación de trombocitos.

25 Una de las funciones más importantes del sistema inmunitario es dirigir leucocitos a la proximidad de la infección y del tejido dañado. Para ello los leucocitos circulan a lo largo de la pared endotelial y se produce su inmigración en el área de infección de la herida mediante integrinas y selectinas. Las micropartículas fomentan la acumulación de los leucocitos "rodantes" mediante P-selectina y pueden contribuir de esta manera a una homeostasia y reacción a la infección reforzadas (Forlow B, Blood 2000). También se pudo demostrar la unión reforzada de monocitos al endotelio mediante micropartículas (Barry OP, JCI 1997). Un trabajo adicional pudo mostrar que las micropartículas de trombocitos producen una proliferación aumentada de células de músculo liso de vasos (Weber AA, Thromb Res 2000).

30 Los trombocitos son los componentes sanguíneos más pequeños en el organismo humano y pueden reaccionar a estímulos químicos y físicos. En el caso de una lesión vascular se provoca que los trombocitos agreguen en las superficies endoteliales descubiertas y que secreten una gran cantidad de sustancias biológicamente activas. Entre ellos se cuentan el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento epidérmico (EGF), pero también metabolitos del ácido araquidónico, como prostaglandina D<sub>2</sub>/E<sub>2</sub> y tromboxano A<sub>2</sub>, y también micropartículas.

35 Se supone que mediante la liberación de las micropartículas se fomenta la formación del coágulo de fibrina y la inmigración de células inflamatorias en el área de la herida. Los granulocitos neutrófilos y los macrófagos secretan por su parte factores de crecimiento que, a su vez, dirigen leucocitos, fibroblastos y células endoteliales al coágulo de fibrina. Los macrófagos descomponen el tejido destruido y fomentan la proliferación y la síntesis de colágeno de tipo I, mediante lo cual se inicia la formación del denominado tejido de granulación. Con esto se refiere a un tejido conjuntivo fibroso que sustituye al tejido original. En paralelo surgen vasos y se produce la epitelización del área de la herida. La formación de un tejido cicatricial duradero, rico en colágeno y pobre en células constituye el fin de la cicatrización, un proceso que puede durar semanas, pero también meses.

40 Puesto que un tejido cicatricial no muestra las características originales, en la curación de tejidos blandos se habla de reparación pero no de regeneración (Bennet NT et al. Am. J. Surg. 1993, 165: 728-737; Bennet NT et al. AM. J. Surg. 1993, 166: 74-81).

45 Sin embargo, hay deficiencias de la cicatrización que se pueden producir por numerosas causas. La hiperglucemia impide la cicatrización probablemente debido a una inhibición de la proliferación de células endoteliales y fibroblastos (Goodson WH, J Surg Res 1977 22: 221-227). Los niveles de azúcar aumentados reducen además la función de los leucocitos lo que produce que la herida permanezca en la fase de infección. Además, el grado de

gravedad del traumatismo precedente también puede ser causa de un resultado desfavorable de la cicatrización (Holzheimer RG, 1966, Zentralbl Chir 121:231).

5 Al contrario que para la formación de un tejido cicatricial en las heridas en tejidos blandos (reparación), después de la rotura de huesos o después de trasplante de huesos la estructura del tejido original se restablece totalmente (regeneración). En principio los procesos regenerativos de los huesos se parecen al esquema de curación de la cicatrización de tejidos blandos: inmediatamente después de la lesión se produce, entre otros, la liberación de PDGF y TGF- $\beta$  por los trombocitos que se desgranulan, seguido por la inmigración de macrófagos y otras células inflamatorias, que también secretan PDGF, TGF- $\beta$ , y además también factor de crecimiento de fibroblastos (FGF),  
10 interleuquina-1 (IL-1) e IL-6. En general se asume que esta compleja cooperación de factores de crecimiento junto con el entramado de fibrina que se está formando representa el proceso inicial de la curación de los huesos en donde los tejidos próximos, como la médula ósea, periostio y tejidos blandos, tienen una participación determinante en la regeneración.

15 Además de la reorganización de las células de la médula ósea en zonas de densidades diferentes, se estimula la división celular y la diferenciación de los osteoblastos que revisten los huesos y los preosteoblastos del cambium. El hueso entretejido de nueva formación mediante estos procesos se denomina callo duro. Además de la osificación directa se produce la inmigración de células mesenquimatosas indiferenciadas del periostio y de fibroblastos del tejido blando circundante en el hematoma. Después de una extensa fase de división se produce un tejido  
20 cartilaginoso, el callo blando, cuyas células se hipertrofian, mineralizan y se sustituyen por huesos entretejidos tras el surgimiento de vasos. El último paso para la reconstitución completa de la estructura original del hueso es la transformación del hueso entretejido en hueso lamelar mediante osteoblastos/actividad de osteoblastos. Este proceso se denomina osificación indirecta ya que el cartílago formado primero se debe sustituir por hueso (Barnes et al., JBMR 1999, 11:1805-1815).

25 La curación de las fracturas de hueso no transcurre siempre sin problemas: infecciones, enfermedades sistémicas (por ejemplo, osteoporosis), enfermedades metabólicas (por ejemplo, diabetes mellitus), defectos genéticos (por ejemplo, osteogénesis imperfecta) y tratamientos farmacéuticos (terapia de glucocorticoides) pueden ser la causa de una regeneración retrasada.

30 Además de la curación de fracturas, el trasplante de hueso autólogo y de materiales sustitutos de hueso para procesos aumentativos o para el relleno de defectos del hueso tiene una importancia creciente. También en este caso sería deseable una aceleración de la regeneración y una mejora de la "calidad del hueso".

35 Las causas precisas de la regeneración de hueso desacelerada o ausente no se conocen. De los documentos WO 91/13905, WO 91/04035, WO 91/16009, US-A-5.165.938 y US-A-5.178.883 se sabe que los factores de crecimiento liberados por los trombocitos se pueden usar para la cicatrización.

40 La activación de trombocitos se conoce, por ejemplo, del documento WO 86/03122. En la activación se liberan factores de crecimiento para fibroblastos y células musculares. El producto obtenido mediante la activación se puede procesar con un soporte, por ejemplo colágeno microcristalino, en una pomada.

Según el documento WO 90/07931 esta pomada también se puede usar para apoyar el crecimiento del pelo.

45 El documento WO 00/15248 describe una composición que contiene factores de crecimiento trombocíticos y fibrina y contiene un polímero adicional. Dicha composición se puede usar para la curación y tratamiento de daños en tejidos que se caracterizan por riego sanguíneo bajo y/o capacidad de regeneración reducida, en donde a estos tejidos pertenecen en particular a fibrocartílagos elásticos o hialinos y tejidos de fascia.

50 El cartílago de las articulaciones es un tejido avascular con un potencial de regeneración limitado. Ninguno de los métodos que están en uso en la actualidad para la renovación del cartílago de las articulaciones de los pacientes con artrosis se puede considerar satisfactorio. Actualmente hay un método autorizado, en el que las células del cartílago se expanden ex vivo y después se introducen en el defecto bajo un lóbulo perióstico (Brittenberg M, NEJM 1994).

55 El objeto de la presente invención es proporcionar un fármaco con efecto mejorado para la regeneración de tejidos, especialmente tejido óseo.

El fármaco según la invención se caracteriza en que

- 60
- contiene micropartículas que derivan de trombocitos y que son obtenibles mediante un tratamiento activador de los trombocitos con trombina, colágeno, el ionóforo de Ca<sup>2+</sup> A23187 y/o la proteína C5b-9 en solución acuosa y se han purificado por medio de centrifugación diferencial, filtración o cromatografía de afinidad,
  - 65 - se ha sometido a un proceso para la inactivación de virus y/o la reducción de virus,
  - y que mediante la filtración estéril se consigue la esterilidad, y que

- que se presenta en estado liofilizado o ultracongelado.

La invención se basa en el descubrimiento de que las micropartículas liberadas de células eucariotas estimulan, es decir, fomentan la proliferación de fibroblastos, osteoblastos y células del cartilago. Las micropartículas pueden tener un origen homólogo. Mediante el término micropartícula se entiende cualquier componente celular que se puede separar de una suspensión acuosa por métodos conocidos de la bibliografía (por ejemplo, centrifugación a 100.000 x g/2 horas; Forlow SB, Blood 2000). Las micropartículas separadas por centrifugación se pueden someter a un proceso para la disminución de virus y/o la inactivación de virus. Convenientemente el fármaco se puede dotar con factores de crecimiento.

El fármaco según la invención se puede producir sometiendo trombocitos en un medio acuoso a un tratamiento activador, para que los trombocitos liberen las micropartículas que fomentan la regeneración, después de lo cual el medio acuoso que contiene las partículas liberadas, se centrifuga para sedimentar los componentes celulares gruesos. Los componentes particulados del sobrenadante acuoso obtenido se obtienen en un 2º paso de centrifugación a alta velocidad rotacional (por ejemplo, 100.000 x g) y se someten a un proceso para la disminución de virus y/o la inactivación de virus. Un ejemplo de un tratamiento activador es poner en contacto los trombocitos con trombina, colágeno, el ionóforo de  $Ca^{2+}$  A23187 y/o la proteína C5b-9 del sistema del complemento. El fármaco según la invención se presenta en estado ultracongelado o liofilizado.

El fármaco según la invención también se puede aplicar repetidamente, por lo cual la concentración consecuentemente alta de micropartículas en el área de la herida permite una formación más rápida de tejido de granulación. Al mismo tiempo se puede administrar una matriz extracelular provisional de materiales orgánicos (por ejemplo, fibrina, colágeno, polilactonas, etc.) o inorgánicos (fosfato de calcio, etc.) que sirven como sustancia soporte para los factores de crecimiento y como andamio para las células inmigrantes.

La unión covalente del fármaco según la invención a las matrices anteriormente mencionadas se puede realizar mediante transglutaminasas.

Además, existe la posibilidad de proporcionar superficies metálicas con el fármaco según la invención.

Para la disminución de virus y/o la inactivación de virus son adecuados procesos físicos, químicos o de combinación físico/químicos conocidos en el estado de la técnica.

La esterilidad del fármaco según la invención se logra bien mediante el aislamiento estéril de los concentrados celulares y un procesamiento adicional aséptico, o mediante esterilización por filtración.

El aislamiento de la micropartícula, la producción del fármaco según la invención y su efecto en células osteoblásticas se ejemplifica en más detalle a continuación.

#### Aislamiento de micropartículas

Un concentrado de trombocitos ( $2 \times 10^9$  células) se mezcla con un exceso de tampón Tyrode (pH=6,4) y se centrifuga 10 minutos a 1200 x g. El sobrenadante se elimina, el sedimento de trombocitos se resuspende en 2 ml de DMEM/F12-ITS y se incuba con el ionóforo de  $Ca^{2+}$  A23187 (Sigma) 10  $\mu$ M 30 minutos a temperatura ambiente. Mediante este tratamiento se liberan micropartículas de las plaquetas.

Posteriormente se centrifuga nuevamente 10 minutos a 1200 x g, lo cual produce un precipitado y un sobrenadante. El sobrenadante (= el sobrenadante de trombocitos), que contiene las micropartículas liberadas de los trombocitos se retira y se somete a una centrifugación adicional.

De esta manera, las micropartículas liberadas mediante la activación de los trombocitos se separan por centrifugación de 1 hora a 14.000 x g, 4°C y el sedimento (= sedimento de micropartículas) obtenido se resuspende en 2 ml de DMEM/F12-ITS.

Para el aislamiento de las micropartículas en lugar del ionóforo de  $Ca^{2+}$  A23187 anteriormente descrito, también se pueden usar trombina (Baxter, Austria) u otros agentes anteriormente descritos.

#### Inactivación de virus del sobrenadante de trombocitos (inactivación de virus fotodinámica)

A 50 ml a una suspensión de micropartículas obtenida según el proceso anteriormente descrito se le añade 8-metoxipsoraleno (disuelto en dimetilsulfóxido [DMSO]) hasta una concentración final de 300  $\mu$ g/ml (concentración final de DMSO del 0,3%) y se irradia con luz ultravioleta desde abajo y desde arriba a 22-27°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y N<sub>2</sub> al 95% y una presión de 2 psi durante 6 horas, de modo que la intensidad lumínica total sea de 3,5 a 4,8 mW/m<sup>2</sup> (Lin L. et al. Blood 1989). De esta manera, se inactivan los virus de la suspensión de micropartículas.

Después de la inactivación de virus efectuada, la suspensión se puede ultracongelar o liofilizar como se describe a continuación.

5 Ultracongelación: Cada 1 ml de la suspensión de micropartículas se almacena a -80°C a los 30-40 minutos de la ultracongelación rápida. Antes del uso el preparado se descongela a temperatura ambiente.

10 Liofilización: Cada 1 ml de la suspensión de micropartículas se ultracongelan a -80°C durante al menos 24 horas y posteriormente se liofilizan de -20°C a -40°C durante 20 a 24 horas al vacío. Los sobrenadantes liofilizados se almacenan entre -20°C y -80°C y antes del uso se rehidratan con medio DMEM/F12.

15 Inactivación de virus de una matriz extracelular provisional que contiene sustancias de andamiaje (inactivación de virus química)

20 Se inactivan los virus de matrices, que se añaden a una suspensión de micropartículas producida según el proceso anterior, mediante el método del solvente-detergente. Para ello se añade a una suspensión de matriz a 30°C fosfato de tri(n-butilo) al 1% (peso/peso) y Triton X-100 al 1% (peso/peso) y la mezcla se agita durante cuatro horas. Posteriormente se añade aceite de soja al 5% (volumen/volumen), la mezcla de solvente-detergente se separa de la suspensión de los biomateriales en una columna de C18 (Waters, Millipore) mediante cromatografía (Horowitz B. et al., Blood 1992, 79:826-831; Piet MP. et al., Transfusion 1990, 30:591-598; Piquet Y. et al., 1992, 63:251-256).

25 Las matrices tratadas con el método de inactivación de virus química descrito anteriormente también se pueden someter posteriormente a una inactivación de virus fotodinámica.

30 Cultivo de osteoblastos humanos

35 El aislamiento de osteoblastos humanos primarios se puede realizar a partir de fragmentos de hueso de un tamaño de aproximadamente 1-5 mm<sup>3</sup>. Para ello, los fragmentos de hueso se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se cultivan 2-3 semanas a 37°C, humedad del aire del 95% y CO<sub>2</sub> al 5%. Como medio de cultivo se usa DMEM/F12 con la adición de suero bovino fetal (SBF) al 10%, antibióticos y fungicidas.

40 Los osteoblastos que se desarrollan a partir de los fragmentos de hueso se desprenden de las botellas de cultivo con tripsina (2,5%) y después de un paso de dilución 1:3 se continúan en las mismas condiciones (pase 1). Este proceso se repite dos veces para la propagación de las células. Los medios y los aditivos se pueden comprar de Life Technologies, Grand Island, NY, EE UU.

45 Para la posterior estimulación de la proliferación de los osteoblastos con las micropartículas que se van a obtener de los trombocitos, los osteoblastos se colocan a una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de microtitulación (Packard, Meriden, CT, EE UU) y se precultivan 2-4 días en medio completo, que para fines de ensayo, se sustituye por un medio sin suero. Se refiere a un medio DMEM/F12 al que en lugar de SBF se le añade una mezcla de insulina/transferrina/selenio 5 mg/ml (ITS, Boehringer Mannheim, DE).

50 Cultivo de fibroblastos humanos

55 El aislamiento de fibroblastos humanos primarios se puede realizar a partir de fragmentos de mucosa bucal. Para ello los fragmentos de la mucosa bucal se lavan con PBS y se cultivan 2-3 semanas a 37°C, humedad del aire del 95% y CO<sub>2</sub> al 5%. Como medio de cultivo se usa DMEM/F12 con la adición de SBF al 10%, antibióticos y fungicidas. Los fibroblastos que se desarrollan de los fragmentos de mucosa bucal (fibroblastos gingivales) se desprenden de las botellas de cultivo con tripsina (2,5%) y después de un paso de dilución 1:3 se continúan en las mismas condiciones (pase 1). Este proceso se repite dos veces para la propagación de las células. Los medios y los aditivos se pueden comprar de Life Technologies (Gornstein RA, J Periodontol 1999).

60 Cultivo de condrocitos humanos

65 El aislamiento de condrocitos humanos primarios se puede realizar a partir de fragmentos de cartílago articular. Para ello los fragmentos del cartílago articular se lavan con PBS, se cortan y las células se liberan mediante digestión con una solución de colagenasa B (0,4% peso/volumen; Boehringer Mannheim, Alemania). Los pasos adicionales se han descrito anteriormente (F Héraud, Ann Rheum Dis 2000).

60 Actividad miótica de las micropartículas

Se examinó la actividad miótica de las preparaciones de micropartículas obtenidas según el proceso anteriormente descrito.

65 Para determinar la actividad biológica las preparaciones se diluyeron en una proporción 1:5 en DMEM/F12-IST. La dilución así obtenida se denomina primera dilución (I) y corresponde a una concentración de micropartículas que se obtienen de una cantidad inicial de trombocitos de 2x10<sup>8</sup> células/ml.

De una parte de la primera dilución (I) se establece una serie de diluciones mediante dilución adicional en una proporción de 1:5 que corresponden a los sobrenadantes de  $4 \times 10^7$  células/ml (segunda dilución II),  $8 \times 10^6$  células/ml (tercera dilución III),  $1,6 \times 10^6$  células/ml (cuarta dilución IV) y  $3,2 \times 10^5$  células/ml (quinta dilución V).

5

Estimulación de la proliferación de osteoblastos

Se estimuló la proliferación de osteoblastos con las cinco diluciones I, II, III, IV y V obtenidas como sigue:

10 Se cultivaron  $4 \times 100 \mu\text{l}$  de cada dilución durante 24 horas con osteoblastos. Durante las últimas 6 horas se realiza la adición de  $1 \mu\text{Ci}$  de [ $^3\text{H}$ ]-timidina/mancha cuya velocidad de formación se toma como medida para la proliferación de osteoblastos. La radioactividad absorbida se determina por centelleo líquido (Packard). DMEM/F12-ITS sirve como control, en donde el valor alcanzado con el mismo se toma como el 100%. La figura 1 muestra la proliferación de osteoblastos obtenida con las diluciones I-V y con el control.

15

La figura 1 documenta una proliferación de osteoblastos dependiente de la dosis, en donde en la concentración mayor (dilución I) se incorpora aprox. 3-7 veces más de [ $^3\text{H}$ ]-timidina en el ADN que en el control sin micropartículas.

Estimulación de la proliferación de fibroblastos

20

Se estimuló la proliferación de fibroblastos con las cinco diluciones I, II, III, IV y V obtenidas como se ha descrito anteriormente.

25 La figura 2 documenta una proliferación celular dependiente de la dosis, en donde en la concentración mayor (dilución I) se incorpora aprox. 2-3 veces más de [ $^3\text{H}$ ]-timidina en el ADN que en el control sin micropartículas (barras negras: micropartículas del donante A, barras blancas: micropartículas del donante B).

25

Estimulación de la proliferación de condrocitos

30 Se estimuló la proliferación de condrocitos con las cinco diluciones I, II, III, IV y V obtenidas como se ha descrito anteriormente.

30

35 La figura 3 documenta una proliferación celular dependiente de la dosis, en donde en la concentración mayor (dilución I) se incorpora aprox. 2-3 veces más de [ $^3\text{H}$ ]-timidina en el ADN que en el control sin micropartículas (barras negras: micropartículas del donante A, barras blancas: micropartículas del donante B).

35

Estimulación de la diferenciación de células osteoblásticas

Las células osteoblásticas se estimularon con las cinco diluciones I, II, III, IV y V obtenidas como sigue:

40

45 Se cultivaron  $4 \times 100 \mu\text{l}$  de cada dilución durante 4 días con las células osteoblásticas. Después las células se lavaron con PBS y se lisaron en  $100 \mu\text{l}$  de una solución de Triton X-100 al 0,5%. Respectivamente se usaron del lisado  $20 \mu\text{l}$  para la determinación de la proteína total (Gruber R, Cytokine 2000). La actividad enzimática medida se normaliza respecto a la cantidad de proteína. Este método sirve para determinar la diferenciación de osteoblastos. Como control se usa DMEM/F12-ITS, en donde el valor obtenido con el mismo se considera como el 100%.

45

La figura 4 muestra una estimulación de la diferenciación de células osteoblásticas en la dilución I. La actividad de la fosfatasa alcalina es aprox. el 80% mayor que en el grupo de comparación sin micropartículas.

Unión de micropartículas a una matriz extracelular provisional, que contiene sustancias de andamiaje

50

55 La suspensión de micropartículas estéril y con virus inactivados producida según el proceso anteriormente descrito se añade a una solución de una matriz extracelular provisional que contiene sustancias de andamiaje. Se refiere a biomateriales entrecruzables (fibrinógeno, fibronectina, factor de coagulación sanguínea XIII, colágeno), que se han podido someter a uno o varios procesos para la inactivación de virus, o también a materiales orgánicos (por ejemplo, polilactonas) e inorgánicos (por ejemplo, fosfato de calcio). Los componentes se pueden usar individualmente o en combinación entre ellos. La proporción de mezcla de la suspensión de micropartículas con la matriz extracelular debe ser preferiblemente 1:3. La mezcla así obtenida se ultracongela o liofiliza según los procesos anteriormente descritos para obtener una durabilidad conveniente.

60

En lugar de llevar a cabo la inactivación del virus en los componentes individuales como se ha descrito también es posible realizar la inactivación del virus en la mezcla de la suspensión de micropartículas y matriz añadida.

60

65 Además, existe la posibilidad de unir las micropartículas a las matrices anteriormente mencionadas mediante unión covalente por medio de transglutaminasas.

65

**REIVINDICACIONES**

1. Fármaco para uso local para fomentar la regeneración de tejidos, **caracterizado en que**
  - 5 - contiene micropartículas que derivan de trombocitos y son obtenibles mediante un tratamiento activador de los trombocitos con trombina, colágeno, el ionóforo de Ca<sup>2+</sup> A23187 y/o la proteína C5b-9 en solución acuosa y se han purificado mediante centrifugación diferencial, filtración o cromatografía de afinidad,
  - se han sometido a un procedimiento de inactivación de virus y/o disminución de virus,
  - y que se alcanzó la esterilidad mediante filtración estéril, y que
  - 10 - está en un estado liofilizado o ultracongelado.
2. Fármaco según la reivindicación 1, **caracterizado en que** contiene sustancias solubles o insolubles que fomentan la cicatrización.
- 15 3. Fármaco según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizado en que** contiene citoquinas y/o factores de crecimiento.
4. Fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado en que** contiene una sustancia que representa o puede formar una matriz extracelular provisional.
- 20 5. Fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado en que** contiene colágeno.
6. Fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado en que** para la construcción de un andamiaje de fibrina contiene fibrinógeno y trombina.
- 25 7. Fármaco según la reivindicación 4 **caracterizado en que** como matriz extracelular provisional se prevé un polímero orgánico, especialmente una polilactona.
8. Fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 **caracterizado en que** contiene compuestos inorgánicos.
- 30 9. Producto farmacéutico **caracterizado en que** contiene:
  - un fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y
  - 35 - un material biocompatible que se usa junto con el fármaco.

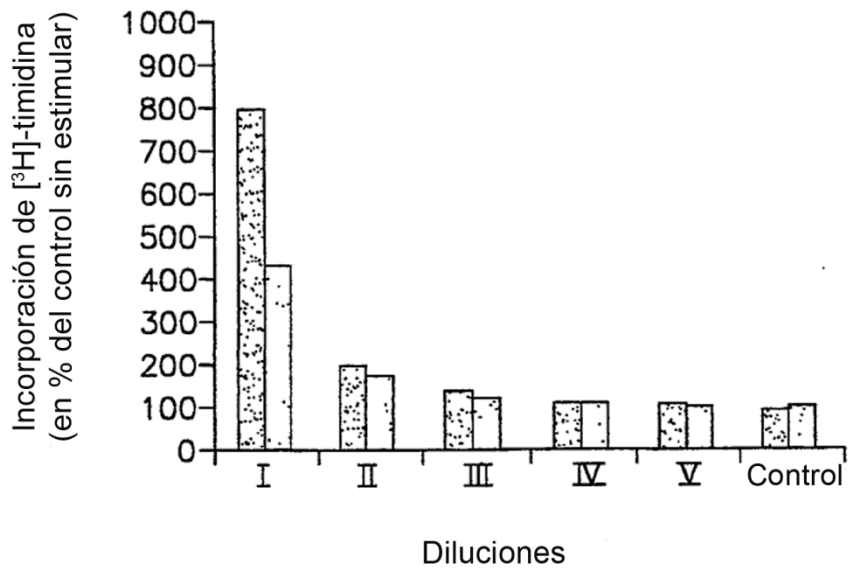


FIG. 1

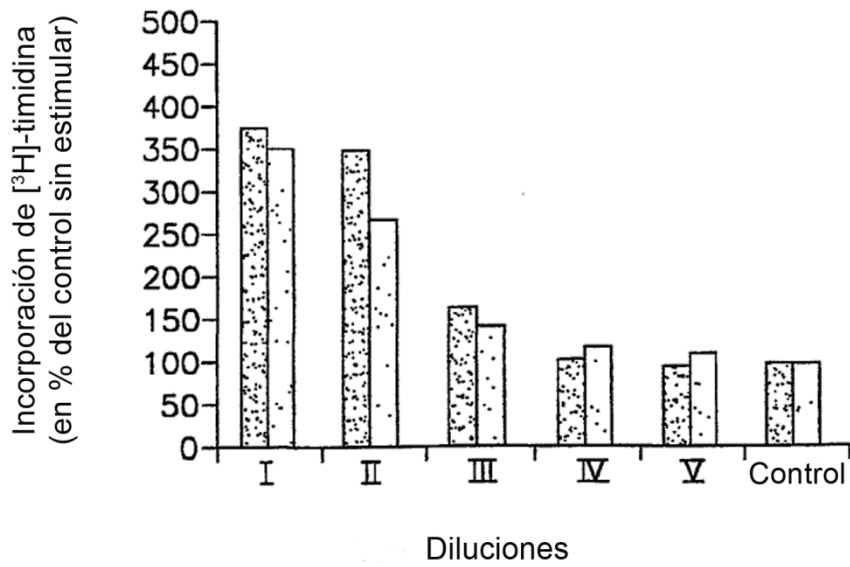


FIG. 2



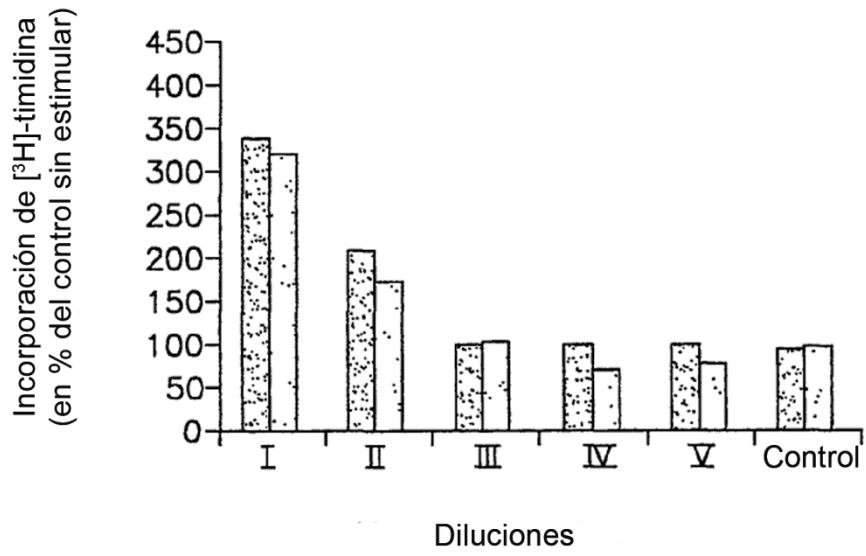


FIG. 3

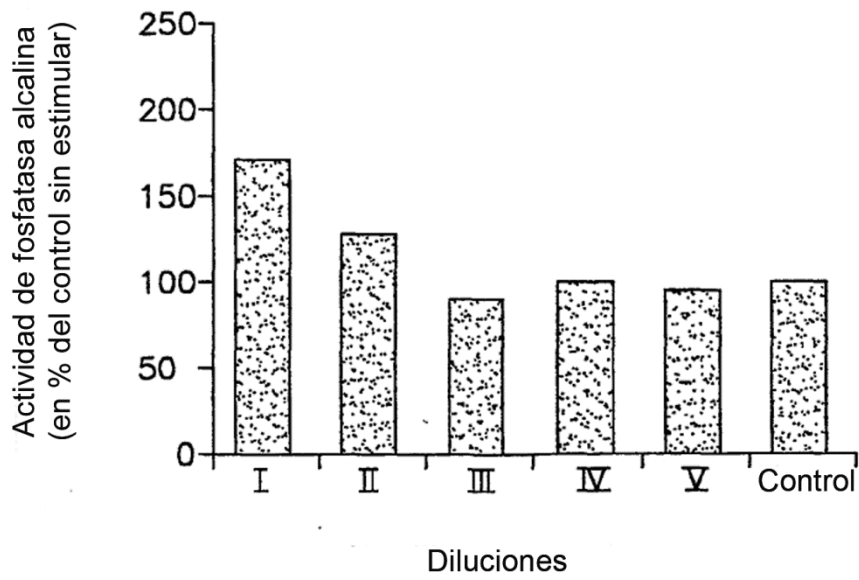


FIG. 4