

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 819**

51 Int. Cl.:

A61L 27/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2009 E 09726492 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 2279014**

54 Título: **Matriz extracelular que comprende factores plaquetarios**

30 Prioridad:

04.04.2008 IT FI20080070

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

04.06.2014

73 Titular/es:

**AZIENDA OSPEDALIERO-UNIVERSITARIA
CAREGGI (50.0%)
Largo Brambilla 3
50134 Firenze, IT y
REGIONE TOSCANA (50.0%)**

72 Inventor/es:

MIRABELLA, CARLO

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 464 819 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

Matriz extracelular que comprende factores plaquetarios.

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de la reparación y/o regeneración tisular.

10 Estado de la técnica

[0002] La necesidad de influir en los procesos de reparación del tejido para facilitar la cicatrización de heridas, así como la inducción de la regeneración real del tejido dañado después de eventos traumáticos o patológicos (tales como lesiones, quemaduras, escisión quirúrgica), siempre ha sido uno de los principales problemas para aquellos que se ocupan de la reconstrucción tisular.

15 [0003] La ingeniería tisular se originó como un intento de construir tejido y órganos fuera del cuerpo humano, en base al hecho de que casi todas las células animales pueden ser cultivadas en el laboratorio.

20 [0004] Sin embargo, debe recordarse que las células cultivadas proliferan formando únicamente capas bidimensionales, que no pueden equipararse a los tejidos, puesto que estos últimos son estructuras tridimensionales que tienen células dentro o en su superficie superior; por lo tanto, es necesario usar andamios artificiales con el fin de proporcionar un soporte adecuado (matriz extracelular) a las células para la regeneración tisular.

25 [0005] Es obvio que es extremadamente importante desarrollar matrices extracelulares capaces de proporcionar un medio eficaz para la reconstrucción del tejido que se ha destruido después de eventos traumáticos o patológicos.

30 [0006] El documento WO02/43692 describe la fabricación de una composición para tratar lesiones. Dicha composición se forma por la incorporación de una sal de calcio en una matriz polisacáridica porosa. Dicha matriz se pone en contacto con plasma rico en plaquetas.

[0007] El documento EP1184040 describe una matriz para la regeneración de la piel que comprende una malla de un material de matriz extracelular, en la que se forma fibrina en los poros de la malla a partir de una composición que comprende fibrinógeno, trombina, calcio y el factor XIII.

35 Breves descripciones de las figuras

[0008]

40 La figura 1 muestra una matriz de acuerdo con la invención, inmediatamente después de la preparación.
La figura 2 muestra un ejemplo de una aplicación de una matriz de acuerdo con la invención.

Resumen

45 [0009] En este documento se describen matrices extracelulares que comprenden factores plaquetarios, como se describe en la reivindicación independiente 1, y procedimientos para la preparación de las mismas, como se describe en la reivindicación independiente 6.

Descripción detallada de la invención

50 [0010] La presente invención permite superar los inconvenientes que se han mencionado anteriormente gracias a una matriz extracelular que comprende factores de crecimiento derivados de plaquetas humanas que son capaces de maximizar la eficacia terapéutica mediante la combinación de los beneficios obtenidos de los dos componentes, la matriz y los factores de crecimiento, reduciendo la fase inflamatoria, anticipando así la migración celular y la proliferación, dando como resultado una integración más rápida y eficiente de la matriz hasta que se logra una reconstrucción organizada de forma estructural del tejido neoformado "in vivo".

55 [0011] De acuerdo con la invención, la expresión matriz celular se refiere a una matriz modificada por bioingeniería o heteróloga capaz de permitir enlaces estables entre las células y la matriz (generalmente con el componente proteico y/o polisacáridico).

60 [0012] Por lo tanto, las matrices extracelulares de acuerdo con la invención deben tener:

- Un nivel de porosidad que permite a las células recrear un microambiente adecuado para el sitio

específico y el tejido específico

- la capacidad de comunicar e intercambiar señales con las células huésped,
- una estructura adecuada para el crecimiento de vasos y células, en caso necesario.
- degradación controlada capaz de metabolizarse y reemplazarse por la matriz extracelular producida por las propias células.

5 [0013] Generalmente, las matrices asignadas para sustitución dérmica de acuerdo con la invención se componen de una membrana de doble capa, la parte destinada a reemplazar la dermis con una estructura porosa.

10 [0014] En general, las matrices modificadas por bioingeniería se componen de cualquier tipo de biomaterial tolerable y biocompatible que comprende un componente proteico y/o polisacárido tal como, por ejemplo, colágenos, glicosaminoglicanos (como ácido hialurónico), celulosa y/o combinaciones de estos materiales. Además, existen matrices heterólogas acelulares biológicas humanas, tal como dermis desepidermizada (DED) o que pueden obtenerse a partir de animales, tales como la matriz obtenida de la submucosa del intestino delgado del cerdo.

15 [0015] Es preferible proporcionar matrices tridimensionales con una porosidad que permite que las células se recreen en un microentorno adecuado para el sitio específico y el tipo de tejido.

20 [0016] En particular, es preferible proporcionar matrices con una porosidad adecuada para permitir la adsorción de las plaquetas y las proteínas contenidas en el crioprecipitado con el fin de conseguir una concentración plaquetaria terapéutica de aproximadamente $1-2 \times 10^9$ por ml.

25 [0017] Dadas las condiciones que se han mencionado anteriormente, las matrices útiles de acuerdo con la invención deben tener poros con un diámetro superior a 2 micrómetros.

[0018] La membrana que forma la matriz dérmica puede revestirse (o no) con una película de un material semi-permeable, tal como polisiloxano o un elastómero, que forma la parte que reemplaza la epidermis.

30 [0019] Normalmente, se usan matrices sin película para añadir espesor a la capa de regeneración dérmica, durante el tratamiento de heridas profundas.

35 [0020] La porción dérmica actúa como un andamio para la infiltración de fibroblastos, macrófagos, linfocitos y células endoteliales capilares que forman la red neo-vascular. A medida que mejora la salud, la capa de matriz se reabsorbe y se deposita una nueva matriz extracelular por los fibroblastos para formar la neodermis. Cuando la vascularización de la neodermis es adecuada, y a condición de que esté disponible el autoinjerto, puede eliminarse cualquier película que se use para reemplazar la epidermis, y si es necesario, se pone una fina capa de autoinjerto epidérmico en la neodermis. Las células de injerto epidérmico crecen y forman una epidermis madura que proporciona una dermis y epidermis funcional.

40 [0021] Un ejemplo particular de una matriz extracelular de acuerdo con la invención es la matriz Integra® (Integra Lifesciences Corp., Plainsboro, NJ, Estados Unidos).

45 [0022] La expresión factores plaquetarios se refiere a los componentes terapéuticos de la sangre que pueden obtenerse a través de gránulos alfa de liberación obtenidos durante la agregación de un concentrado plaquetario situado en contacto con calcio y factores proagregantes biológicos y farmacológicos (trombina).

[0023] Dichos factores plaquetarios pueden ser obviamente autólogos o heterólogos o recombinantes.

50 [0024] En particular, de acuerdo con la invención, así como otros mediadores bioquímicos que se liberan por las propias plaquetas, los propios factores plaquetarios se encuentran en una preparación compuesta por una mezcla de adhesivo de fibrina, gel plaquetario y trombina.

[0025] Todos estos componentes están implicados en la reparación/regeneración tisular y pueden ser de origen autólogo o heterólogo.

55 [0026] Para preparar las matrices extracelulares de acuerdo con la invención, el gel plaquetario y el adhesivo de fibrina se forman "*in situ*" en el interior de la matriz a través de la acción, respectivamente, de la trombina en el concentrado plaquetario (PRP) y en el crioprecipitado (CRIO) usados previamente para impregnar la matriz.

60 [0027] En particular, después de haber preparado la matriz de acuerdo con las instrucciones de usuario impresas en el catálogo ilustrado del fabricante, se aclara con una solución fisiológica que elimina todo el exceso y se deposita en un recipiente de base plana, tal como una bandeja quirúrgica.

5 **[0028]** Se usa una jeringa para poner gotas del PRP/CRIO en la matriz en una gran cantidad suficiente para asegurar que la matriz se impregna completamente (normalmente en una relación de 2:1 en volumen), después se agita suavemente y se deja sedimentar, repitiéndose el procedimiento varias veces. Después, usando una jeringa, se ponen gotas de una mezcla de gluconato cálcico y trombina en la matriz, se agita suavemente y después se deja sedimentar hasta que se forma el gel.

10 **[0029]** La matriz preparada de esta manera puede usarse inmediatamente, o puede mantenerse a una temperatura inferior a -25 °C y se descongela antes del uso. Preferiblemente, el gluconato cálcico está en una solución acuosa al 10% y la relación de gluconato cálcico/trombina es de 1:5 a 1:10 en volumen.

15 **[0030]** La relación (mezcla de gluconato cálcico y trombina)/(PRP-CRIO) es preferiblemente 1:10, pero puede reducirse, a 1:5, por ejemplo, a condición de que la concentración plaquetaria y/o fibrinógena no se reduzca al nivel de concentración terapéutica. La trombina puede obtenerse usando procedimientos conocidos convencionales, tales como mediante recalcificación de plasma o crioprecipitado.

20 **[0031]** Este procedimiento se realiza bajo una campana de seguridad estéril recogiendo el plasma o el crioprecipitado de la bolsa usando una jeringa, y añadiendo gluconato cálcico al 10% en una relación de 1:5 a 1:10 en volumen.

25 **[0032]** Tras el proceso de recalcificación, después de aproximadamente 20 minutos, el producto se somete a una centrifuga de alta velocidad (3000 rpm) durante 15 minutos para obtener el suero de capa leucocitaria rico en trombina.

30 **[0033]** El concentrado plaquetario usado para la invención puede obtenerse usando procedimientos conocidos convencionales a partir de:

- plaquetas de unidad homóloga única/capa leucocitaria única, configurando una agrupación, está conectada a una bolsa de transferencia usando un conector estéril, que se centrifuga a 3500 rpm durante 15 minutos. El gránulo plaquetario obtenido de este modo se suspende de nuevo en aproximadamente 50-60 ml de plasma;
- plaquetas de aféresis de multicomponentes homólogos, la aféresis plaquetaria se centrifuga directamente para proceder como se ha descrito anteriormente;
- sangre completa autóloga, una unidad de plaquetas se obtiene a partir de una única capa leucocitaria en una bolsa cuádruple, y se conecta a una bolsa de transferencia usando un conector estéril, que se centrifuga a 3500 rpm durante 15 minutos, después de lo cual la capa leucocitaria que se elimina se usa para producir la trombina autóloga. El gránulo plaquetario obtenido de este modo se suspende de nuevo en aproximadamente 10-15 ml de plasma;
- una aféresis autóloga multicomponente usando un separador celular y se realiza un procedimiento dedicado para obtener una aféresis plaquetaria de aproximadamente 20 ml (en la que el volumen puede modificarse de acuerdo con las necesidades del paciente sin afectar a la concentración plaquetaria final) con un rendimiento de $3,5 \times 10^6$ plaquetas por microlitro, una unidad de plasma de 200 ml, y una unidad de capa leucocitaria de aproximadamente 30 ml con una concentración de glóbulos blancos (que contiene monocitos y células madre) de aproximadamente $50-60 \times 10^3$ por microlitro y una concentración plaquetaria de aproximadamente $1,5 \times 10^9$ por ml. La aféresis plaquetaria se usa sin ninguna manipulación adicional. El plasma se congela para producir crioprecipitado;
- Sistemas en miniatura, generalmente de circuito cerrado, que están disponibles en el mercado y están dedicados para la producción de gel plaquetario autólogo tomado de una muestra de sangre de 8 a aproximadamente 150 ml. Se proporciona por el fabricante un protocolo operativo técnico específico para cada uno de estos sistemas junto con el paquete de instrumentos.

35 **[0034]** El CRIO usado en la invención es una preparación compuesta por la fracción crioglobulínica de plasma fresco, obtenido de una única donación, concentrado a un volumen final no superior a 40 ml.

40 **[0035]** Así como el factor VIII, el producto también contiene la mayor parte del factor de Von Willebrand, fibrinógeno, factor XIII y fibronectina, presentes en el plasma fresco inicial.

45 **[0036]** El CRIO puede obtenerse de forma conocida a partir de plasma fresco congelado de aféresis o plasma de separación después de haber conectado una bolsa de transferencia usando un conector estéril y descongelación a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante una noche, se realiza la decantación suspendiendo de nuevo el crioprecipitado en aproximadamente 40 ml de plasma de residuos (obtenido a partir de plasma fresco congelado sin crioprecipitado), el contenido en fibrinógeno no debe ser menor de 3,5 mg/ml.

[0037] Por lo tanto, como puede entenderse a partir de las descripciones anteriores, el concentrado plaquetario, el crioprecipitado y la trombina se preparan usando procedimientos físicos sencillos.

5 **[0038]** Para reunir el PRP y el CRIO, puede usarse un circuito cerrado con conexiones estériles para mezclar el PRP y el CRIO en una proporción de 1:1 para obtener un hemocomponente que tiene las propiedades de ambos componentes.

10 **[0039]** El uso tópico de la matriz preparada de esta manera se facilita debido a su plasticidad y características conformables en el sitio de aplicación, facilitando y acelerando la reparación tisular.

[0040] Obviamente, así como la regeneración de la dermis, como se ha descrito de forma específica anteriormente y se ilustra en los siguientes ejemplos, las matrices de acuerdo con la invención pueden emplearse también para la regeneración de otros tipos de tejidos, tales como tendones, cartílago, músculo y hueso.

15 Ejemplo 1

[0041] Preparación de la matriz dérmica Integra® "plantilla de regeneración dérmica" enriquecida con PRP/CRIO.

20 **[0042]** A lo largo de toda la preparación de la matriz, PRP/CRIO y trombina deben manejarse usando técnicas asépticas, y deben seguirse cuidadosamente las instrucciones del fabricante para la preparación del producto.

[0043] Se usa una matriz Integra® "plantilla de regeneración dérmica", y después del lavado con una solución fisiológica se transfiere varias veces con una gasa estéril para absorber cualquier exceso de solución fisiológica.

25 **[0044]** La matriz se coloca en un recipiente estéril con base plana, tal como una bandeja quirúrgica, por ejemplo, con la parte de silicio en la parte inferior.

30 **[0045]** Usando una jeringa, se ponen gotas de PRP/CRIO en la matriz en una relación de 2:1 en volumen (matriz Integra® superficie de 5 x 5 mm, espesor de aproximadamente 1,5 mm, volumen de aproximadamente 3,75 ml; PRP/CRIO necesarios aproximadamente 7,5 ml)

[0046] El recipiente se agita suavemente 5-6 veces y después se deja sedimentar durante 10 minutos, después de lo cual se repite el procedimiento.

35 **[0047]** Usando una jeringa, se añaden gotas de una mezcla de gluconato cálcico al 10% y trombina (1:5) en una relación de 1:10 usando PRP/CRIO para enriquecer la matriz, y el recipiente se agita suavemente 5-6 veces.

[0048] Se deja sedimentar durante 5-10 minutos hasta que se forma el gel. La gelificación se controla inclinando el recipiente un ángulo de 45°.

40 **[0049]** La matriz está lista para su aplicación, que puede realizarse inmediatamente.

Ejemplo 2

45 **[0050]** Método para la preparación de la matriz dérmica Integra® "monocapa de plantilla de regeneración dérmica" enriquecida con PRP/CRIO.

[0051] A lo largo de toda la preparación de la matriz, PRP/CRIO y trombina deben manejarse usando técnicas asépticas, y deben seguirse cuidadosamente las instrucciones del fabricante para la preparación del producto.

50 **[0052]** Se usa una matriz Integra® "monocapa de plantilla de regeneración dérmica", y después del lavado con una solución fisiológica se transfiere varias veces con una gasa estéril para absorber cualquier exceso.

55 **[0053]** La matriz se coloca en un recipiente estéril con base plana, tal como una bandeja quirúrgica, por ejemplo, en contacto con la parte inferior de la bandeja.

60 **[0054]** Usando una jeringa, se ponen gotas de PRP/CRIO en la matriz en una relación de 2:1 en volumen (matriz Integra® superficie de 5 x 5 mm, espesor de aproximadamente 1,5 mm, volumen de aproximadamente 3,75 ml; PRP/CRIO necesarios aproximadamente 7,5 ml). El recipiente se agita suavemente 5-6 veces y se deja sedimentar durante 10 minutos.

[0055] La matriz dérmica se pone boca abajo en el interior del recipiente y se agita suavemente 5-6 veces, y después se deja sedimentar durante 10 minutos.

ES 2 464 819 T3

- [0056]** Usando una jeringa, se añaden gotas de una mezcla de gluconato cálcico al 10% y trombina (1:5) en una relación de 1:10 usando PRP/CRIO para enriquecer la matriz, y el recipiente se agita suavemente 5-6 veces.
- 5 **[0057]** Se deja sedimentar durante 5-10 minutos hasta que se forma el gel. La gelificación se controla inclinando el recipiente un ángulo de 45°.
- [0058]** La matriz está lista para su aplicación, que puede realizarse inmediatamente.
- 10 **[0059]** La figura 1 muestra una matriz de acuerdo con la invención inmediatamente después de su preparación, mientras que la figura 2 muestra la rápida reconstrucción de la neodermis seguida del cuidado y la cicatrización de las heridas por segunda intención, tras la aplicación de una matriz de acuerdo con la invención en una úlcera causada por insuficiencia venosa.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Matriz tridimensional para reemplazar la dermis compuesta por una membrana monocapa o bicapa, en la que la parte destinada para reemplazar la dermis es una estructura porosa que comprende factores plaquetarios, estando dicha matriz **caracterizada porque:**
- dichos poros tienen un diámetro superior a 2 micrómetros;
 - dichos factores plaquetarios están contenidos en una preparación compuesta por una mezcla de adhesivo de fibrina, gel plaquetario, trombina;
 - 10 - dicho gel plaquetario y adhesivo de fibrina se forman en el interior de la matriz "*in situ*".
- 15 **2.** Matriz de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha matriz está modificada por bioingeniería o es heteróloga.
- 15 **3.** Matriz de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicha matriz modificada por bioingeniería está compuesta por cualquier tipo de biomaterial tolerable y biocompatible que comprende un componente proteico y/o polisacárido.
- 20 **4.** Matriz de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicha matriz heteróloga es una matriz de origen biológico humano y/o animal.
- 20 **5.** Matriz de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, en la que dicha matriz está revestida con una película de material semi-permeable que forma la parte que reemplaza la epidermis.
- 25 **6.** Procedimiento para la preparación de matrices extracelulares de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, en el que el gel plaquetario y el adhesivo de fibrina se forman en el interior de la matriz "*in situ*" respectivamente a través de la acción de la trombina en el concentrado plaquetario (PRP) y en el crioprecipitado (CRIO) usados previamente para impregnar la matriz.
- 30 **7.** Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que:
- la matriz se aclara con una solución fisiológica que elimina todo el exceso, y se coloca en un recipiente de base plana;
 - usando una jeringa, se ponen gotas de concentrado plaquetario y CRIO en la matriz en tal cantidad como para impregnarla completamente; después se deja sedimentar, repitiéndose este procedimiento varias veces;
 - 35 - usando una jeringa, a la matriz se le añaden gotas de una mezcla de gluconato cálcico y trombina, después de lo cual se agita suavemente y se deja sedimentar hasta que se forma el gel.
- 40 **8.** Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el gluconato cálcico está en una solución acuosa al 10% y la proporción de gluconato cálcico/trombina está entre 1:5-1:10 en volumen.
- 45 **9.** Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la proporción (mezcla de gluconato cálcico y trombina)/(PRP-CRIO) está entre 1:5 y 1:10 en volumen.
- 45 **10.** Matriz de acuerdo con las reivindicaciones 1-5 que también contiene monocitos y/o células madre.

FIGURA 1

Matriz extracelular dérmica integra®
que comprende factores plaquetarios

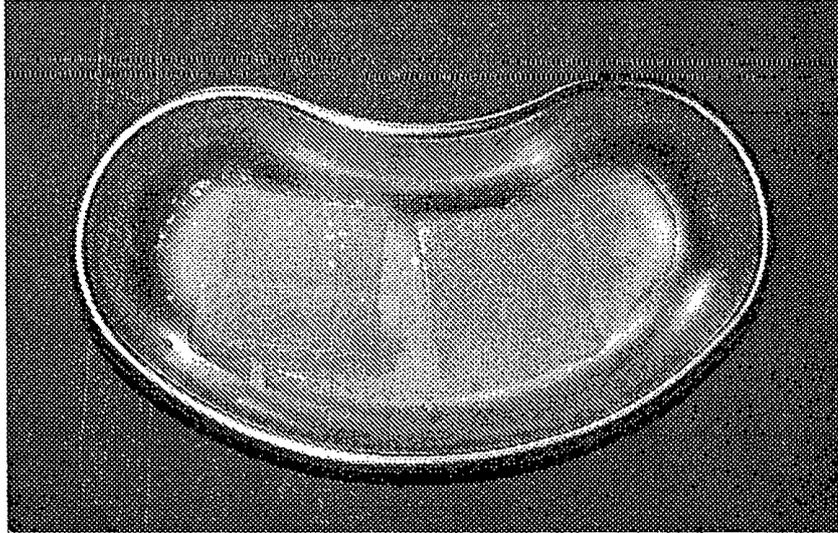


FIGURA 2

Aplicación de una matriz de la invención en una
úlcera causada por insuficiencia venosa

