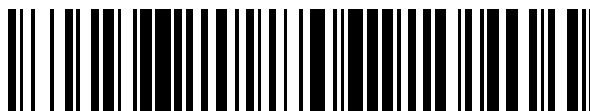


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 858**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

A61K 35/54 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2008 E 13157678 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2602316**

54 Título: **Composiciones adecuadas para el tratamiento de la enfermedad, trastorno o condición espinal**

30 Prioridad:

30.08.2007 US 935767 P
30.08.2007 EP 07115352

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.03.2017

73 Titular/es:

OMRIX BIOPHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)
Weizmann Scientific Park Bldg. 14, Nes-Ziona
76106 Rehovot, IL

72 Inventor/es:

BECHOR, EDNA;
BAR, LILIANA y
NUR, ISRAEL

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 606 858 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).

Composiciones adecuadas para el tratamiento de la enfermedad, trastorno o condición espinal**Descripción****Campo de la invención**

[0001] La invención se refiere al uso de un concentrado de plasma crioprecipitado inactivado viral que comprende una concentración relativa inicial de fibrinógeno y fibronectina adecuada para el tratamiento de una enfermedad de la columna, trastorno o afección como la degeneración de un tejido de la médula, como disco intervertebral.

Antecedentes de la invención

[0002] Los discos intervertebrales se encuentran entre los cuerpos vertebrales adyacentes de la columna vertebral. Cada disco forma una articulación cartilaginosa que permite ligeros movimientos de las vértebras, actúa como un ligamento que sostiene las vértebras juntas y soporta cargas de compresión que surgen del peso corporal y la tensión muscular.

[0003] El cartílago es un tejido firme y elástico conjuntivo compuesto por células especializadas llamadas condrocitos que producen una gran cantidad de matriz extracelular (ECM). Proporciona amortiguación protectora y permite que las articulaciones soporten cargas derivadas del movimiento necesario para realizar actividades diarias. El cuerpo contiene tres tipos diferentes de cartílago: articular, que cubre las superficies de las articulaciones; fibro cartílago, que se encuentra en el menisco de la rodilla y el disco intervertebral; y cartílago elástico, que se encuentra en el oído externo. Los diferentes cartílagos se distinguen por su estructura, elasticidad y fuerza.

[0004] Aota et al ("Efectos diferenciales de fragmento de fibronectina en el metabolismo de proteoglicanos por las células del disco intervertebral: una comparación con los condrocitos articulares" Spine 2005; 30: 722-728) informaron sobre los diferentes efectos del fragmento de fibronectina en la proliferación y el metabolismo de proteoglicanos en diferentes poblaciones de discos intervertebrales y condrocitos articulares. Estos resultados sugieren que los condrocitos de diferentes tejidos del cartílago requieren diferentes condiciones para proliferar y para mantener la función del tejido.

[0005] El disco intervertebral se compone de tres estructuras básicas: una sustancia similar al gel interno llamado núcleo pulposo (NP), una banda fibrosa exterior resistente llamada anillo fibroso (AF), y placas terminales cartilaginosas superior e inferior, que marcan transición entre el disco intervertebral y la vértebra. Estas estructuras difieren en la disposición de proteoglicano y colágeno en el tejido, así como la concentración relativa de cada uno.

[0006] Durante el desarrollo embrionario tres capas germinales se pueden diferenciar: el endodermo, mesodermo y ectodermo. Estas tres capas finalmente dan origen a órganos internos; tejidos musculoesqueléticos; y tejidos epidérmicos y nerviosos, respectivamente. Una cuarta región, conocida como notocorda, guía el desarrollo embrionario del tubo neural; y la columna vertebral, incluyendo los discos intervertebrales. Las células mesenquimales comienzan a emigrar y condensarse alrededor de la notocorda para formar los cuerpos vertebrales óseos y el anillo fibroso. Las células de notocordiales atrapadas juegan un papel crítico en la iniciación del desarrollo del núcleo pulposo (Walmsley R. "El desarrollo y crecimiento del disco intervertebral", Edinburgh Med J. 1953; 60: 341-364). Así, estas dos estructuras básicas del disco intervertebral, el anillo fibroso y el núcleo pulposo, se originan de diferentes orígenes embrionarios, a saber, el mesénquima y el notocordio, respectivamente.

[0007] El anillo fibroso está compuesto principalmente de fibrillas de colágeno de tipo I que forman laminillas concéntricas que rodean el núcleo pulposo y se insertan en las placas terminales de los cuerpos vertebrales adyacentes para formar una estructura reforzada.

[0008] El núcleo pulposo consiste en su mayoría de pequeñas células similares a condrocitos y una segunda población de células grandes vacuoladas. Éstas son las células notocordio que se presumen restos del tejido embrionario que guió la formación de la columna vertebral y los núcleos pulposos (Hunter et al , "La célula notocordio en el núcleo pulposo: una revisión en el contexto de la ingeniería de tejidos", Tissue Eng. 2003; 9: 667-677). Debido al hecho de que estas células de notocordiales parecen desempeñar un papel crucial en la formación de la columna vertebral y el núcleo pulposo, se presume que podrían promover la reparación del disco dañado y la columna vertebral. Las células similares a los condrocitos expresan colágeno de tipo II, agreganos de proteoglicanos y cadenas largas de hialuronano, que tienen moléculas con cadenas laterales altamente ramificadas y altamente hidrófilas. Estas regiones cargadas negativamente tienen una fuerte avidez para las moléculas de agua e hidratan el núcleo o centro del disco mediante una presión osmótica de hinchamiento. El efecto hidráulico del núcleo hidratado contenido dentro del anillo actúa como un amortiguador para amortiguar la columna vertebral de las fuerzas que se aplican al sistema musculoesquelético. Las placas terminales vertebrales están unidas tanto al disco como al cuerpo vertebral adyacente. La estructura química de estas placas consiste en proteoglicano y fibras de colágeno.

[0009] Degeneración humana del disco intervertebral es un problema clínico, y la principal causa del dolor de la

médula y la discapacidad. Más de 15 millones de personas en todo el mundo sufren de degeneración de disco, que se caracteriza por tener una composición de matriz alterada y un número de células reducido.

[0010] La enfermedad degenerativa del disco (DDD) es un proceso no deseado en el que los discos intervertebrales pierden su flexibilidad, elasticidad, y el choque características de absorción. En este proceso, la estructura de colágeno del anillo fibroso se debilita y se vuelve quebradiza. La presión excesiva sobre un disco debilitado puede causar desgarros en el anillo fibroso, lo que permite al núcleo pulposo herniarse o extruirse a través de los desgarros. A esta condición se le llama hernia de disco. El material herniado puede comprimir los nervios alrededor del disco y crear dolor. Una hernia discal puede interferir con la función nerviosa, lo que lleva a debilidad, entumecimiento, inflamación y dolor. Además, el contenido de proteoglicano se disminuye, reduciendo así las capacidades de retención de agua del núcleo pulposo. Estos cambios reducen la capacidad de los discos para actuar como amortiguadores y los hacen menos flexibles. La pérdida de líquido también hace que el disco sea más pequeño y reduce la distancia entre las vértebras y el disco. Dado que los discos intervertebrales se encuentran en un medio no vascular, el uso de ingeniería de tejidos de un disco para retardar o revertir el proceso degenerativo representa un desafío biológico importante ya que tienen una capacidad limitada para la reparación. La actividad celular requiere glucosa, oxígeno y otros nutrientes necesarios para el soporte del tejido. Sin embargo, el disco es el tejido avascular más grande del cuerpo. Las células dentro del disco son sostenidas por la difusión de nutrientes en el disco a través de la concavidad central porosa de la placa terminal vertebral (Rudert M y Tillmann B. "Lymph and blood supply of the human intervertebral disc. Cadaver study of correlations to diLMEtis". Acta Orthop Scand. 1993; 64: 37 - 40).

[0011] La degeneración de los discos intervertebrales o un hematoma puede causar compresión de la médula espinal y lesión de la médula. La lesión de la médula espinal (LME) por lo general comienza con un traumatismo en la columna vertebral que daña los nervios dentro del canal espinal. Las causas frecuentes de daño son los traumatismos (accidentes de coche, disparos, caídas, etc.) o enfermedades (p. ej. polio, espina bífida, Ataxia de Friedreich, etc.) y la compresión de la columna vertebral por hernia de disco intervertebral. Una lesión en los nervios de la médula espinal produce pérdida o déficit en la función motora, sensorial y autonómica. La lesión secundaria tras el impacto primario incluye una serie de alteraciones bioquímicas y celulares que conducen a la necrosis tisular y la muerte celular. Se estima que la incidencia anual de LME es de aproximadamente 40 casos por millón en los EE.UU., y que el costo de la gestión de la atención de los pacientes de LME se aproxima a \$ 4 mil millones cada año. Hasta la fecha, se han realizado relativamente pocos progresos en el tratamiento de la LME y los trastornos neurológicos relacionados. Actualmente sólo hay una terapia aceptada, aunque no aprobada, la metilprednisolona. Si se usa en dosis muy altas no más tarde de 8 horas después de la lesión, la metildrednisolona ha demostrado una modesta capacidad para mejorar el resultado neurológico después de la LME.

[0012] En el sistema nervioso de los vertebrados en desarrollo, el tubo neural es el precursor del sistema nervioso central (SNC), que comprende el cerebro y la médula espinal. La médula espinal contiene fibras de comunicación llamadas axones que transfieren información sensorial y motriz entre el cerebro y la periferia. En la sección transversal la médula espinal se divide en mitades simétricas por una mediana dorsal y una mediana ventral. La parte dorsal del tubo neural se asocia principalmente con la sensación, mientras que la parte ventral está asociada principalmente con el control motor (por ejemplo, el músculo). El término neurona motora se aplica clásicamente a las neuronas ubicadas en el SNC que proyectan sus axones fuera del SNC y controlan directa o indirectamente los músculos. El término es sinónimo de neuronas eferentes. Una lesión de la médula espinal tiene implicaciones devastadoras que producen una pérdida de sensibilidad o una función motora por debajo del nivel de lesión. Después de una lesión del SNC, las neuronas motoras son incapaces de volver a crecer sus axones y mueren por necrosis o apoptosis. La investigación publicada muestra que al trasplantar y expresar una segunda notocorda cerca del tubo neural dorsal, 180 grados opuestos a la localización normal del notocordio, se puede inducir la formación de neuronas motoras en el tubo dorsal, que generalmente forma células sensoriales. Un SNC lesionado es un ambiente altamente inhibitorio para la regeneración del axón, limitando severamente la recuperación funcional después de la lesión.

[0013] El pegamento de fibrina es típicamente un producto de la sangre obtenida ya sea de fuentes comerciales o algunos centros de transfusión sanguínea regionales. Los componentes que se usan comúnmente en la preparación de cola de fibrina son fibrinógenos, trombina, factor VIII, factor XIII, fibronectina, vitronectina y factor de von Willebrand (vWF). Las formulaciones de cola de fibrina se usan en cirugía, tanto como una adición útil a suturas y para proporcionar una integridad de herida óptima, para hemostasia, y para prevenir o tratar adherencias. Algunos fabricantes añaden agentes anti-proteolíticos a la formulación de cola de fibrina (como se describe en el documento WO-A-93/05822) o retiran específicamente el plasminógeno con el fin de retrasar o detener la fibrinólisis (como se describe en los documentos US-B-5.792.835 y US-B-7.125.569).

[0014] Normalmente, la preparación de crioprecipitación de plasma es el primer paso en la fabricación de fibrinógeno de adhesivo a base de fibrina. Bar et al ("La unión del sellador de fibrina al colágeno está influenciada por el método de purificación y el contenido de fibrinogeno-fibronectina (heteronectina) entrecruzada del componente fibrinógeno".) Informaron que las formulaciones de gel de fibrina preparadas a partir de crioprecipitado difieren en su contenido de fibronectina y heteronectina (complejos de fibrinogeno-fibronectina unidos covalentemente). El informe indicó que el contenido de heteronectina en la formulación influye en la adherencia basada en fibrina al colágeno.

Por un lado, el procedimiento de purificación de Schwartz et al. (US-B-4,377,572) da como resultado la eliminación de la mayoría de las moléculas de fibrinógeno-fibronectina reticuladas, resultando posteriormente en una baja relación de fibronectina: fibrinógeno de 1:14,7 en la formulación y colágeno bajo y propiedades de unión a la gelatina de la fibrina formada. Por otra parte, la preparación de crioprecipitado descrita por Martinowitz y Bal (EP-B-691,858) conserva estas moléculas de fibrinógeno-fibronectina reticuladas y, por consiguiente, tiene una relación aumentada de fibronectina: fibrinógeno de 1:7 que se correlaciona con una mayor adherencia de la fibrina producida a colágeno en comparación con la adherencia al colágeno de la fibrina formada con la preparación obtenida mediante la purificación de Schwartz.

[0015] Las siguientes publicaciones describen el uso de diferentes preparaciones de cola de fibrina en la enfermedad de la columna vertebral. Se han descrito matrices tridimensionales de fibrina como sustratos celulares in vitro y como materiales puente para la reparación del sistema nervioso central. Ju et al. ("Enhanced neurite growth from mammalian neurons in tridimensional salmon fibrin gels.", 2007: 28: 2097-2108) informó que los geles de fibrina de salmón fueron andamio superior para el re-crecimiento neuronal después de lesión SNC en comparación a fibrina preparada a partir de proteínas de la sangre humana o bovina. Cheng et al ("Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function", Science, 1996, 273: 510-513) describe la reparación de las aberturas de la médula espinal en ratas adultas utilizando injertos de nervios periféricos. La zona injertada se estabilizó con pegamento de fibrina que contenía factor de crecimiento fibroblástico ácido.

[0016] La solicitud de patente de Estados Unidos US-A-2004/0121011 describe un método para promover la reparación, regeneración y re-crecimiento de las células neuronales lesionadas. La aplicación indicó que el sitio de lesión del nervio puede estar en el central o en el sistema nervioso periférico. La formulación combina un antagonista Rho y un componente portador fluido capaz de formar una matriz aceptable in vivo tal como adhesivos tisulares. El documento US-A-2004/0121011 describe diferentes aditivos de tejidos basados en proteínas que incluyen geles de colágeno, adhesivos de tejido de fibrina, matrigel, redes de laminina y adhesivos basados en una composición de proteínas de membrana basal que contienen colágeno. Se describen diversas preparaciones comerciales tales como Tissucol®/TISSEEL®, Beriplast® P y Hemaseel®.

[0017] Las siguientes publicaciones describen el uso de composiciones de cola de fibrina en disco intervertebral.

[0018] El documento US-A-2005/0148512 se refiere a la inyección de un agente fibrosante o una composición que comprende un agente fibrosante en los discos intervertebrales dañados para mejorar la cicatrización y apoyar el anillo anular del disco. Las formulaciones que contienen fibrinógeno, tales como TISSEAL®, se mencionan entre numerosas composiciones que pueden suministrarse en el disco intervertebral.

[0019] US-B-6.428.576 describe un método para la reparación de defectos en el anillo fibroso utilizando un sellador de curado in situ. La patente describe una formulación que cura a un material viscoelástico que simula la estructura, propiedades físicas y funciones biomecánicas del anillo fibroso. El polímero curado puede ser sintético o natural. La patente describe que los polímeros sintéticos son más fiables. La patente describe varias proteínas naturales que ocurren, tales como albúmina, colágeno, fibrinógeno, fibrina y elastina. Estas proteínas pueden ser de cualquier fuente tal como la proteína fraccionada de sangre o proteínas recombinantes, incluyendo las procesadas, desnaturalizadas o modificadas de otro modo.

[0020] WO-A-07/089942 da a conocer un método de tratamiento de un disco, que comprende la inyección de un sellador de fibrina en un disco para sellar al menos un defecto de un anillo fibroso, mientras que se controla la presión del sellante de fibrina que se inyecta. El sellador de fibrina comprende fibrinógeno y un compuesto activador tal como trombina. De acuerdo con la descripción, el defecto puede ser un desgarró o una fisura en el anillo fibroso o una cápsula fibrosa de una articulación espinal. La descripción describe el uso de cualquier fibrinógeno que formará fibrina en un cuerpo humano. La fibronectina se menciona como uno de los numerosos aditivos posibles a la composición de fibrinógeno.

[0021] WO-A-06/050268 da a conocer una inyección de sellante de fibrina en un desgarró o una fisura en el anillo fibroso. El sellador comprende fibrinógeno y compuesto activador tal como trombina. De acuerdo con la solicitud, el componente de fibrinógeno puede ser autólogo, humano incluyendo el fibrinógeno humano combinado, recombinante y bovino u otra fuente no humana. La fibronectina se menciona entre muchos componentes como un aditivo adicional que puede emplearse en el sellante de fibrina.

[0022] También el documento WO-A-06/050267 da a conocer la inyección de sellador de fibrina y el anestésico en el área de la columna para sellar defectos en el anillo fibroso, tales como desgarró o fisuras. De acuerdo con la descripción, el componente de fibrinógeno incluye cualquier fibrinógeno que formará fibrina en el cuerpo humano. La solicitud menciona kits comerciales de fabricantes como Baxter tales como TISSEEL®. La descripción de WO-A-06/050267 describe que se pueden usar cantidades alternativas de fibrinógeno para cambiar la densidad de los componentes combinados.

[0023] WO-A-07/089948 se refiere a un método de tratamiento de un disco que tiene una fuga de núcleo pulposo en y/o a fondo al menos un defecto en el anillo fibroso. El método comprende inyectar un sellador biológico, tal como

solución de fibrinógeno y solución de activación a la zona espinal utilizando un catéter de múltiples lúmenes. La descripción también se refiere a un kit que comprende un sellador biológico y un aparato de sellado biológico para inyectar sellador de fibrina en un disco humano.

[0024] US-B-6.468.527 describe un sellador de fibrina de dos componentes que incluye un agente biológico o no biológico. La composición proporciona un medio para suministrar un agente particular a un sitio crítico específico dentro del cuerpo y proporcionar un valor terapéutico prolongado, de liberación temporal. Se describen específicamente inyecciones de cola de fibrina infundida con corticosteroides en el espacio epidural lumbar y en el espacio intra-discal. El sellante de fibrina actúa para mantener una respuesta antiinflamatoria prolongada del corticosteroide y sellar las fisuras anulares, que de otro modo permiten que los productos químicos dañinos escapen del espacio discal y bañen la raíz nerviosa dando como resultado radiculitis química. Además, el documento US-B-7.235.255 describe un sistema para suministrar un adhesivo de tejido biológico que comprende un componente de fibrinógeno, un componente de trombina y una solución que contiene corticosteroides. De acuerdo con la descripción, el sellador de fibrina puede usarse para tratar el disco degenerativo y la enfermedad del disco incompetente. Se ejemplifica una inyección intra-discal. El sistema de administración sella, protege las raíces nerviosas expuestas de daños químicos adicionales y actúa como un vehículo para mantener los corticosteroides en una deposición duradera en la raíz nerviosa.

[0025] Las siguientes solicitudes informan de ingeriería de tejidos como un posible enfoque biológico, que pretende sustituir, reparar, mantener y/o mejorar la función de los tejidos por la combinación de células, factores bioquímicos y fisicoquímicos adecuados y opcionalmente una estructura porosa para emplearse como andamio. El documento WO-A-04/093934 describe un método para aumentar y/o reparar un disco intervertebral administrando material de células madre en el disco. El material de células madre se proporciona en un material reticular biológicamente compatible. El material de reticulación preferido es el reticulado derivado de liposomas, tal como proteoglicanos, glicoproteínas, hialuroninas, fibronectinas, colágenos (tipo I, tipo II, tipo III, tipo IV, tipo V, tipo VI, etc.) y similares. Conforme a la descripción del documento WO-A-04/093934, los retículos derivados de lipos sirven como excelentes sustratos para el crecimiento celular. Ejemplificados son materiales basados sólo en colágeno.

[0026] El documento WO-A-00/47621 da a conocer un método para producir un crioprecipitado inactivado viral que tiene un fibrinógeno preferido y la relación de fibronectina de 0,02-0,5 que por ejemplo se puede utilizar para producir una biomatriz basada en fibrina adecuada para el cultivo de las células humanas y queratinocitos, fibroblastos y condrocitos. En una realización preferida, se utiliza el agente antifibrinolítico t-AMCHA (es decir, ácido tranexámico) que se indica para reducir ventajosamente la viscosidad de la composición.

[0027] La solicitud de patente de Estados Unidos US-A-06/0275273, describe un método para la implantación o la inyección de condrocitos en un disco intervertebral degenerativo. La patente describe los condrocitos obtenidos de un cadáver. Según la descripción, los condrocitos pueden obtenerse a partir de tejido de cartílago, incluyendo cartílago de disco intervertebral, o cartílago procedente de tejidos cartilaginosos distintos del tejido de disco intervertebral. La descripción describe varias moléculas biocompatibles a añadir a la composición celular tales como laminina, quitosano, hidrogel, hidrogel pegilado, colágeno tipo I, II, III, fibrinógeno, fibrina, trombina, fibronectina y ácido hialurónico. Se describe el uso de la formulación comercial de pegamento de fibrina TISSEEL® con las células. Los ejemplos también describen el uso de fibrinógeno de porcino crioprecipitado y una solución de condrocito-trombina.

[0028] La solicitud de patente de Estados Unidos US-A-07/0093905 describe una mezcla para la reparación y regeneración de los discos intervertebrales que comprenden glicina, monocitos concentrados y cola de fibrina. La patente también describe el núcleo o tejido anular eliminado y tratado para su reinserción en el disco. Las células de disco reinsertadas pueden combinarse opcionalmente con soportes tales como un soporte similar a un gel o un adhesivo. El soporte de gel puede ser un hidrogel biológico o sintético, ácido hialurónico, gel de colágeno, adhesivo a base de mejillón, pegamento de fibrina, coágulo de fibrina, sangre, coágulo sanguíneo, componente sanguíneo, coágulo de componente sanguíneo, etc. La solicitud de patente no menciona la composición específica de vehículos descritos, y es silencioso en un concentrado de crioprecipitado.

[0029] El documento EP-A-1894581 da a conocer un gel de matriz que comprende condrocitos o células progenitoras como un implante de reparación de cartílago. De acuerdo con la descripción, la matriz de gel proporciona una dilución simple de condrocitos primarios dando como resultado una producción aumentada de material de matriz extracelular. En una realización preferida, los condrocitos se aíslan del cartílago articular. El pegamento de fibrina se menciona entre el material de gel de matriz numeroso que se puede usar. La solicitud no menciona una composición específica del material de gel matricial y es silenciosa sobre una concentración relativa particular entre los componentes del gel.

[0030] Células de disco cultivadas en monocapa asumen un fenotipo similar a fibroblastos. En un entorno tridimensional, sin embargo, las células de disco se redondean, forman colonias y exhiben mayor proliferación y síntesis de proteoglicanos. Se han desarrollado varias técnicas de cultivo in vitro, incluyendo geles tridimensionales complejos y andamios poliméricos degradables con el objetivo de proporcionar un bastidor sostenible en el que las células del disco pueden proliferar. Se han utilizado ácido hialurónico, colágeno, quitosano y gel de fibrina en la

preparación polimérica reticulable para atrapar células.

[0031] A pesar de todas las técnicas informadas sobre el uso de cola de fibrina en IVD, Gruber et al ("Cell-based tissue engineering for the intervertebral disc: in vitro studies of human disc cell gene expression and matrix production within selected cell carriers". Spine J. 2004;4:44-55) informaron que las formulaciones de gel de fibrina eran microambientes inferiores para la proliferación, producción de ECM y expresión génica de células de anillo fibroso. El término "matriz extracelular", abreviado "ECM", se refiere al material estructural complejo que es producido por células en tejidos de mamíferos. La matriz extracelular es típicamente la característica que define un tejido conectivo, por ejemplo, células de condrocitos. El ECM in vivo suele proporcionar soporte estructural a las células.

[0032] Hay una necesidad de una composición de fibrina óptima adecuada para el tratamiento de una enfermedad de la columna, trastorno o afección tales como la degeneración del disco intervertebral.

Resumen de la invención

[0033] Los pegamentos de fibrina son bien conocidos y se utilizan ampliamente en diversos entornos clínicos. Tales colas se usan en la cirugía, tanto como una adición útil a las suturas y para proporcionar una integridad de herida óptima, para la hemostasia, y para prevenir o tratar adherencias. Recientemente, se ha publicado literatura sobre el uso de cola de fibrina para reconstruir el disco intervertebral espinal, sellando fisuras en el anillo fibroso y en la restauración del sistema nervioso central.

[0034] Se encontró de acuerdo con la presente invención que un aumento en la concentración de fibrinógeno en placas recubiertas disminuyó significativamente la unión de las células de núcleo pulposo de disco intervertebral a las placas mientras que un aumento en la proporción de fibronectina: concentración de fibrinógeno llevan al resultado opuesto. Por otra parte, una composición de cola de fibrina tal como un crioprecipitado que se agota selectivamente de fibrinógeno y comprende altos niveles de fibronectina no curaría y por lo tanto no formará un armazón tridimensional de soporte para las células. La presente invención resuelve este problema técnico y proporciona kits que comprenden crioprecipitado con concentraciones óptimas de fibronectina y fibrinógeno para uso en discos intervertebrales.

[0035] Se encontró de acuerdo con la presente invención que la fibronectina: la relación de fibrinógeno juega un papel crucial en la unión de las células del núcleo pulposo, la proliferación y la migración y absolutamente depende de un alto contenido de fibronectina en relación con fibrinógeno. Por ejemplo, se encontró según la invención que las células de núcleo pulposo cultivadas en una mezcla que comprende una proporción aumentada de fibronectina: fibrinógeno de aproximadamente 1:10-1:5 muestran un aumento de la unión celular y la proliferación en comparación con las células cultivadas en una mezcla que comprende una proporción menor de fibronectina:fibrinógeno. También, se mostró en la presente invención que un crioprecipitado con la relación incrementada de fibronectina:fibrinógeno era capaz de restaurar la altura del disco cuando se inyectaba en el área del núcleo pulposo. Por lo tanto, se puede usar un crioprecipitado que comprende una relación de fibronectina:fibrinógeno mayor que 1:12 y en el intervalo de 1:10-1:5, tal como 1:7 se puede usar como un componente superior de una matriz para restaurar la altura del disco mientras que sirve como un andamio óptimo para las células del núcleo pulposo.

[0036] Los estudios indican que las células de notocorda pueden guiar la formación de células de núcleo pulposo y SNC y/o se pueden utilizar como progenitores de tales células. Por lo tanto, el crioprecipitado de acuerdo con la invención se puede utilizar para ayudar en la reconstrucción del disco intervertebral y el sistema nervioso central (SNC).

[0037] El ácido tranexámico es un inhibidor de la fibrinólisis sintética, que se ha demostrado que afecta el sistema nervioso central (SNC) que causa hiperexcitabilidad y convulsiones probablemente como resultado de que sea un antagonista de ácido gamm-aminobutírico (GABA) (Furtmüller et al. "Tranexamic acid, a widely used antifibrinolytic agent, causes convulsions by a gamma- aminobutyric acid(A) receptor antagonistic effect". J Pharmacol Exp Ther. 2002; 301:168-173, Roger et al. Evaluating the differences between fibrin sealants: recommendations from an international advisory panel of hospital pharmacists" The European Journal of Hospital Pharmacy Science Volumen 12, 2006, Número 1, P. 3-9). Además, se ha demostrado que la aprotinina bovina es un inhibidor altamente inmunogénico de serina proteasa que puede causar un trastorno neurológico degenerativo muy raro e incurable llamado enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), que provoca una degeneración esponjosa en el cerebro y la médula espinal. Por tanto, de acuerdo con el método descrito en la presente memoria, las sustancias como ácido tranexámico y aprotinina bovina pueden excluirse del concentrado de crioprecipitado que se va a usar en la columna vertebral.

[0038] Por lo tanto, La técnica descrita no describe ni sugiere la cola de fibrina óptima para uso en la columna preparada con una formulación que tiene un crioprecipitado fibrinógeno adecuado y la relación de la fibronectina y carece de ácido tranexámico y/o aprotinina bovina derivada.

[0039] La invención proporciona un kit que comprende: un primer recipiente que comprende un concentrado viral

crioprecipitado-plasma inactivado (VIPCC) que tiene una relación de fibronectina:fibrinógeno de 1:10 a aproximadamente 1:5, que comprende un segundo recipiente de una enzima capaz de formar fibrina cuando reacciona con fibrinógeno, y un tercer recipiente que comprende una enzima proteolítica seleccionada del grupo que consiste en peptidasas de serina, peptidasas de cisteína, peptidasas aspárticas, peptidasas de metalo, hialuronidasas y combinaciones de las mismas.

[0040] Todavía en otra realización de la invención, la enzima proteolítica se selecciona del grupo que consiste en tripsina, quimotripsina, elastasa pancreática, quimopapaína, papaína, pepsina, colagenasa, gelatinasa, condroitinasa de pronasa, hialuronidasa y combinaciones de los mismos. El kit puede además comprender un agente de contraste tal como yodo.

[0041] El kit de la invención puede ser utilizado para el tratamiento de una enfermedad de la columna, trastorno o afección como la degeneración de un tejido de la médula, como disco intervertebral.

Breve descripción de los dibujos

[0042] Las características, aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor con respecto a la siguiente descripción, ejemplos, reivindicaciones y las siguientes figuras.

Fig. 1: muestra el efecto de la trombina, el concentrado de crioprecipitado de plasma inactivado viral (VIPCC) y sus componentes sobre la unión y proliferación de células de anillo fibroso. Se recubrió una placa de cultivo de plástico de 97 mm en la circunferencia con VIPCC, trombina, albúmina y fibrinógeno. Posteriormente, se sembró la suspensión de células anulares fibrosas en el centro del plato (Origen). La fijación de células a VIPCC, trombina, albúmina y fibrinógeno se determinó después de 14 días mediante tinción con hematoxilina y eosina.

Fig. 2: muestra los efectos del procedimiento de tripsinización y/o el paso sobre la unión celular y la proliferación de células de anillo fibroso. Se colocaron células anulares fibrosas disociadas en el centro de un plato de cultivo de plástico de 97 mm recubierto en la circunferencia con VIPCC, fibrinógeno, fibronectina y mezcla purificada de fibronectina:fibrinógeno (1:10). La fijación celular se evaluó después de 9 días mediante tinción con hematoxilina y eosina.

Figs. 3A-3B: muestran enlace de células de núcleo pulposo (A) y anillo fibroso (B) en diferentes recubrimientos. Los resultados obtenidos se expresan como una unión de células de pliegue a recubrimientos de fibronectina en el mismo experimento (100%). Fn-fibronectina; Fgn-fibrinógeno.

Fig. 4: muestra niveles de células activas de núcleo pulposo metabólicas en los días 1 y 5 en cultivo en diferentes recubrimientos. Los resultados se presentan como porcentaje de la intensidad de absorbancia en el revestimiento de fibronectina (100%). Concentrado de crioprecipitado de plasma inactivado viral VIPCC; Fn-fibronectina; Fgn-fibrinógeno.

Fig. 5: muestra los niveles del cultivo metabólico de núcleo pulposo activo en cantidad constante de fibronectina y aumento de la cantidad de fibrinógeno en la matriz de revestimiento (A) y en cantidad constante de fibrinógeno y aumento de la cantidad de fibronectina en la matriz de revestimiento (B).

Figs. 6A-6D: muestran la morfología y la función del anillo fibroso (panel superior) y los condrocitos de núcleo pulposo (panel inferior) en andamiaje adjunto (A, C) y distante (B, D) tridimensional preparado con VIPCC.

Fig. 7: muestra la migración de las células de núcleo pulposo en VIPCC activado.

Fig. 8: muestra una imagen fluorografía de control (A, solución salina) y activado por VIPCC (B; preparado con VIPCC y trombina) inyecciones en el disco intervertebral.

Fig. 9: muestra la columna vertebral lumbar aislada 14 días después del procedimiento de inyección descrito en la Fig. 8

Fig. 10: muestra los discos intervertebrales (DIV) de solución salina (A) y inyecciones activadas por VIPCC (B) como se describe en la Fig. 8

Fig. 11: muestra los estudios histológicos de la región de núcleo pulposo de solución salina (A) e inyecciones IVDs activadas por VIPCC (B) descritas en la Fig. 8

Fig. 12: muestra la región central del núcleo pulposo de control (A) e inyecciones IVDs activadas por VIPCC (B) descritas en la Fig. 8

Fig. 13: muestra los racimos de núcleo pulposo de la región periférica de control (A) e inyecciones IVDs activadas por VIPCC (B).

Fig. 14: muestra la morfología y la producción de sulfato de condroitina de células de condrocitos de núcleo pulposo dispuestos en tres andamios dimensionales formados de la mezcla VIPCC de 20 veces y trombina diluida dentro de los discos intervertebrales aislados. La evaluación histológica se realizó usando un microscopio de fluorescencia invertido 1 hora y 3 días (A y B, respectivamente) siguiendo el procedimiento de inyección. N-núcleo; CS-sulfato de condroitina. La producción de sulfato de condroitina es aparente en la membrana celular (flecha).

Fig. 15: muestra el porcentaje de compresión de disco bajo carga de fuerza creciente del disco no tratado, disco vacío y vuelve a discos rellenos (PBS o VIPCC y trombina).

Fig. 16: muestra la recuperación de altura de los discos inyectados ya sea con VIPCC activado o PBS. Los resultados se basan en las mediciones mostradas en la Fig. 15 (compresión bajo 500 N). Los resultados se presentan como porcentaje de la compresión máxima posible de disco sin tratar bajo 500 N de carga en el mismo experimento (100%).

Descripción detallada

[0043] La invención se refiere a kits que comprenden el concentrado crioprecipitado de plasma viral inactivado (VIPCC) que comprende un fibronectina adecuado: relación de fibrinógeno para el tratamiento de una enfermedad de la columna, trastorno o afección tales como la degeneración del disco intervertebral (DIV).

[0044] Sorprendentemente, se encontró de acuerdo con la presente invención que la relación fibronectina: fibrinógeno juega un papel crucial en la fijación de las células del núcleo pulposo, la proliferación y la migración. Se ha demostrado según la invención que las propiedades de conductividad de crioprecipitado en el núcleo pulposo (NP) absolutamente dependen de una relación óptima de la fibronectina con relación al fibrinógeno.

[0045] El término "crioprecipitado" se refiere a un componente de la sangre que se obtiene a partir de plasma congelado preparado a partir de sangre entera. Un crioprecipitado se puede obtener cuando el plasma congelado se descongela en el frío, por lo general a una temperatura de 0-4°C, y recoge el precipitado, por ejemplo por centrifugación. Por lo general, se forma un crioprecipitado que es rico en fibrinógeno, factor VIII, factor de von Willebrand, factor XIII y fibronectina. El componente de crioprecipitado se puede preparar a partir de plasma autólogo, humano, incluyendo plasma de mezcla, o de plasma de fuente no humana.

[0046] Los resultados obtenidos de acuerdo con la invención muestran que un aumento en la concentración de fibrinógeno en placas recubiertas disminuyó significativamente la unión de células de núcleo pulposo a las placas. Mientras que un aumento de la concentración de fibronectina en las placas provocó el resultado opuesto. Sin embargo, crioprecipitado se agota selectivamente de fibrinógeno y compone altos niveles de fibronectina no curaría, y por tanto sin fibrinógeno no se formará un andamiaje que soporte una formación de tejido tridimensional.

[0047] Más específicamente, se comprobó según la invención que una mezcla purificada de la fibronectina: fibrinógeno en una relación de 1:10 y 1:5 es más adecuada para la fijación y proliferación de células de núcleo pulposo que mezclas que comprenden una fibronectina inferior: relación de fibrinógeno. Sorprendentemente, en contraste con anillo fibroso, se encontró que la unión de células de núcleo pulposo se afectaría por un aumento en la concentración de fibrinógeno en placas recubiertas de fibrinógeno. De hecho, la unión de células de núcleo pulposo disminuyó significativamente con el aumento de concentraciones de fibrinógeno en una manera que dependía de la dosis. Por el contrario, el aumento de la relación fibronectina: fibrinógeno da lugar al resultado opuesto. Estos resultados indican el papel clave de relación de fibronectina: fibrinógeno en la unión de células de núcleo pulposo y demuestran la ventaja de usar una relación de alto nivel de fibronectina: fibrinógeno para las células de núcleo pulposo. Los resultados obtenidos indican que la unión de las células del núcleo pulposo es mejor en VIPCC que en una mezcla purificada de la fibronectina: fibrinógeno que tiene una relación de altura y similar de fibronectina: fibrinógeno. Es de destacar que la unión celular de los condrocitos de anillo fibroso fue similar en ambos recubrimientos.

[0048] La proliferación celular de las células de núcleo pulposo y anillo fibroso era mayor en el recubrimiento VIPCC que en el revestimiento compuesto de la fibronectina purificada y la mezcla de fibrinógeno. Sin embargo, la proliferación de los condrocitos de núcleo pulposo fue más afectada que la de condrocitos de anillo fibroso por los diferentes revestimientos. La viabilidad de las células de núcleo pulposo de un revestimiento VIPCC con alta fibronectina: relación de fibrinógeno y fibronectina purificada de: la mezcla de fibrinógeno también se controló. Los resultados muestran que la alta fibronectina: relación de fibrinógeno era capaz de mitigar la disminución de la viabilidad celular observada en el recubrimiento de fibrinógeno. Este efecto positivo en células de núcleo pulposo era particularmente pronunciado con el revestimiento VIPCC. Estos resultados muestran las ventajas de utilizar el VIPCC con alta fibronectina: relación de fibrinógeno como un revestimiento para las células de núcleo pulposo en lugar de la fibronectina pura: mezcla de fibrinógeno. Se encontró que los condrocitos de núcleo pulposo detectan un gradiente quimiotáctico de diversas diluciones de VIPCC y se produce trans migración en presencia de tal gradiente VIPCC. Por lo tanto, una formulación VIPCC con alta relación de fibronectina:fibrinógeno puede tener características

condroconductoras.

[0049] En total, los resultados según la invención muestran que VIPCC como se describe aquí tiene una relación de fibronectina:fibrinógeno de 1:10 a 1:5, de 1:10 a 1:7 o de alrededor de 1:7 adecuada para su uso con células de núcleo pulposo. Por lo tanto, VIPCC activado como se describe aquí puede utilizarse como un andamio para el cultivo de células de núcleo pulposo ex-vivo o puede ser inyectado en el espacio discal intervertebral para ser utilizado como un andamio para las células de núcleo pulposo in vivo.

[0050] Se comprobó según la invención que la inyección de VIPCC y trombina en el disco intervertebral de un modelo animal no cambiaron la estructura del IVD y que la estructura típica de los tejidos de los condrocitos en el IVD se conservó. Además, se demostró que VIPCC activado puede funcionar para restaurar sustancialmente la altura del disco normal y tal disco restaurado es capaz de resistir cargas de compresión como el tejido del núcleo pulposo natural.

[0051] Además, el mantenimiento de la morfología y la funcionalidad de IVD inyectaron condrocitos de núcleo pulposo se demostró cuando se inyecta junto con VIPCC activado como se describe aquí.

[0052] Así, un crioprecipitado de plasma viral inactivado concentrado (VIPCC) teniendo una fibronectina: relación de fibrinógeno de 1:10 a 1:5 de 1:10 a 1:7 o de alrededor de 1:7 se puede utilizar ventajosamente para permitir la unión, proliferación y migración de células de tejido del núcleo pulposo. Los resultados también muestran que las células de núcleo pulposo cultivadas en VIPCC activado como se describe en el presente documento mantienen la morfología y la síntesis de sulfato de condroitina. Dado que las células de núcleo pulposo se originan desde y/o se guían por la región notocorda, estos resultados abren el camino a nuevos enfoques para el tratamiento de la columna lesionada, cuya formación se guía por las células de notocordio como núcleo pulposo y neuronas motoras a partir del sistema nervioso central. Por lo tanto crioprecipitados que contienen relación óptima de fibronectina: fibrinógeno son superiores en un crioprecipitado que no contiene fibronectina o que comprende una baja relación de fibronectina: fibrinógeno para su uso en la columna vertebral.

[0053] Las células de tejido de núcleo pulposo humano de la IVD son células de tipo condrocito principalmente pequeñas, pero hay una segunda población de células grandes, células de notocordio, que se presumen restos del tejido embrionario que guió la formación del desarrollo embrionario del tubo neural y el núcleo pulposo (Hunter et al, 2003). Algunos estudios indican que las células de notocordio que se encuentran en el tejido del núcleo pulposo pueden guiar la formación de núcleo pulposo y células del SNC. Por lo tanto, el tejido de núcleo pulposo puede ser utilizado para ayudar en la reconstrucción del disco intervertebral y el SNC.

[0054] Se describe aquí un método para facilitar el crecimiento, la proliferación, la diferenciación, el mantenimiento, la reparación y/o restauración de las células derivadas de notocordio tales como las células de núcleo pulposo, el método de las cuales comprende la puesta en contacto de la población de dichas células con concentrado de crioprecipitado de plasma inactivado viral (VIPCC) que tiene una concentración relativa inicial de fibronectina:fibrinógeno de 1:10 a 1:5, de 1:10 a 1:7 o de alrededor de 1:7.

[0055] El término "células derivadas de notocordio" se refiere a la formación de células que se guió por la región notocorda. En otras palabras, las células derivadas de notocordio se refieren a las células de núcleo pulposo de la columna vertebral y las células neurales de la columna vertebral (es decir, células del SNC).

[0056] El ácido tranexámico es un inhibidor de la fibrinólisis sintética, que se ha demostrado que afecta el sistema nervioso central (SNC) que causa hiperexcitabilidad y convulsiones probablemente como resultado de que sea un antagonista de ácido Gamm-aminobutírico (GABA) (Furtmüller et al., "Tranexamic acid, a widely used antifibrinolytic agent, causes convulsions by a gamma- aminobutyric acid(A) receptor antagonistic effect". J Pharmacol Exp Ther 2002; 301:168-173; Roger et al "Evaluating the differences between fibrin sealants: recommendations from an international advisory panel of hospital pharmacists". The European Journal of Hospital Pharmacy Science, Volumen 12, 2006, Número 1, P. 3-9). Además, se ha demostrado que la aprotinina bovina es una serina inhibidora de proteasa altamente inmunogénica que puede causar un trastorno neurológico degenerativo muy raro y incurable llamado enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), que provoca una degeneración esponjosa en el cerebro y la médula espinal.

[0057] De este modo, las sustancias como el ácido tranexámico y/o aprotinina bovina pueden ser excluidas del concentrado crioprecipitado que se utilizarán en la columna vertebral. VIPCC en el que se redujeron los niveles de plasminógeno y plasmina hace que el uso de estas sustancias sea innecesario. En una realización de la invención, en VIPCC el plasminógeno y la plasmina se han reducido a igual o menor que 15 µg/ml como por ejemplo 5 µg/ml.

[0058] El crioprecipitado de plasma como se describe en el presente documento puede ser activado o no activado. El término "VIPCC activado" se refiere a la composición de crioprecipitado después de la combinación con un componente activador que es capaz de formar fibrina a partir de fibrinógeno. La mezcla combinada resulta en una estructura tridimensional. El componente activador puede ser la trombina y/o una solución obtenible a partir de veneno de serpiente. La puesta en contacto de VIPCC como se describe en el presente documento con las células

se puede llevar ex-vivo, incluyendo en cultivo celular in vitro con o sin otros tipos de células o in vivo en el sitio de la lesión.

[0059] La técnica descrita ni sugiere ni describe el uso de una formulación que tiene un crioprecipitado fibrinógeno preferido y la relación de la fibronectina, que carecen de ácido tranexámico y aprotinina bovina derivados para su uso en la columna vertebral.

[0060] Se describe aquí un método para tratar y/o prevenir una enfermedad de la columna, trastorno o afección tales como la degeneración del disco intervertebral que comprende la administración en la columna vertebral de un sujeto en necesidad de un concentrado de crioprecipitado de plasma viral inactivado (VIPCC) que tiene una relación inicial de fibronectina:fibrinógeno de 1:10 a 1:5, con la condición de que el ácido tranexámico y aprotinina bovina están ausentes del concentrado de crioprecipitado. La composición VIPCC como se divulga aquí se puede administrar en combinación con una composición de células que comprende células derivadas de notocordio tales como las células de núcleo pulposo.

[0061] Dicho VIPCC puede ser activado o no activado.

[0062] Tal como se utiliza aquí, el término "inicial" se refiere a la relación de las variables en el extremo de la preparación de concentrado de crioprecipitado.

[0063] También se describe aquí un método útil para el tratamiento de la enfermedad de sistema nervioso central (SNC), trastorno o afección que comprende la administración al sitio de la lesión o daño de un sujeto en necesidad de un concentrado de crioprecipitado de plasma viral inactivado (VIPCC) que tiene una relación de fibronectina:fibrinógeno de 1:10 a 1:5. La divulgación es útil para tratar lesiones del SNC o la médula espinal, y mejora la restauración del SNC y el crecimiento axonal en un sujeto.

[0064] El término "enfermedad de la columna, trastorno o afección" se refiere al disco intervertebral y/o hasta el centro de enfermedades del sistema nervioso, trastorno o afección.

[0065] El término "enfermedad del disco intervertebral, trastorno o afección" se refiere a un trastorno múltiple, enfermedad o condiciones que implican la degeneración del disco intervertebral y/o lesiones tales como hernia de disco, disco fisurado, estenosis espinal, disco negro, dolor de disco, etc.

[0066] A menudo, el término "enfermedad del disco intervertebral, trastorno o afección" se usa como sinónimo del término "enfermedad degenerativa del disco (DDD)".

[0067] De acuerdo con el sistema de denominación "Dallas Discograma modificado" hay seis posibles categorías que describen la gravedad del desgarro anular radial (grado 0-5) (Sachs et al. "Dallas discogram description. A new classification of CT/discography in low-back disorders" Spine 1987; 12: 287-294). Mientras que el grado 0 describe un disco normal; donde no haya fugas de material de contratación del núcleo y el desgarro de grado 5 describe un desgarro que ha roto por completo las capas exteriores del disco y tiene una fuga de material fuera del disco.

[0068] Nutrición inadecuada de disco por ejemplo, cuando se altera el suministro de sangre a partir de las vértebras adyacentes, la degeneración del disco puede ser acelerada. Esto puede ser causado por la deshidratación del núcleo pulposo que conduce a la degradación de las fibras de colágeno. Tales discos deshidratados se pueden ver en una resonancia magnética y también se conocen como "discos negros" debido al cambio de color en la IRM. En última instancia, el disco puede perder su capacidad de absorción de impactos. El espacio de disco se hará estrecho, perderá su capacidad de absorción de impactos y el movimiento en ese nivel será anormal. Esto aplica tensión excesiva en las estructuras adyacentes en la columna vertebral que conduce a la compresión de la raíz nerviosa, una condición dolorosa llamada estenosis espinal (http://www.saspine.org/conditions/ddd_disease.htm).

[0069] Las pruebas de diagnóstico para una enfermedad de la médula, trastorno o afección incluyen, pero no se limitan a, la radiografía, la mielografía, tomografía computarizada, resonancia magnética, tomografía de emisión de positrones, y otras pruebas de diagnóstico conocidas en la técnica.

[0070] Tal como se utiliza aquí, el término "enfermedad del sistema nervioso central, trastorno o afección" se refiere a cualquier enfermedad, trastorno, o trauma que interrumpe la función normal o la comunicación del cerebro o la médula espinal. Las lesiones del SNC que pueden tratarse utilizando los kits de la invención son diversas y se comprenderán fácilmente por la persona experta. Sin limitación, se pueden mencionar las lesiones cerebrales y de la médula espinal debido a la neurocirugía, trauma, isquemia, hipoxia, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad metabólica, enfermedad infecciosa, la compresión del disco invertebral, tumores y enfermedad autoinmune.

[0071] La administración de la composición VIPCC en el disco intervertebral se puede llevar a cabo mediante inyección. En tal realización, el procedimiento de inyección se puede realizar como sigue. El sujeto en necesidad se puede colocar lateralmente y doblarse hacia adelante. La aguja o cánula pueden insertarse en el núcleo pulposo del disco a tratar. En el tratamiento de un defecto del sistema nervioso central, la aguja o cánula se pueden colocar adyacente a la duramadre. La aguja o cánula se pueden insertar bajo la guía de un trazador. El término "trazador" es

intercambiable con el término "agente contractual", como se define a continuación. La técnica que se puede usar en el método descrito en este documento incluye fluorografía, escaneado, imágenes por resonancia magnética, la tomografía, la nanotecnología, video digital, rayos X o cualquier otra técnica conocida en la técnica. Los ejemplos no limitantes de marcadores son colorantes orgánicos, colorantes alimentarios y/o colorantes fluorescentes. El agente de contraste se puede seleccionar de diversos agentes no tóxicos, tales como yodo. Si el espectro del trazador no es visible para el ojo humano del trazador puede ser detectado por un equipo apropiado. Una vez en la posición correcta, la aguja o cánula pueden ser insertadas en el núcleo pulposo por ejemplo, después de atravesar el anillo fibroso. A continuación, el agente de contraste se inyecta a fin de verificar el sitio de aplicación exacto. El agente de contraste puede estar presente en el extremo de la punta de la aguja o cánula. Una vez que la ubicación se verifica el VIPCC y, por ejemplo un volumen igual de un componente activador se inyecta en el espacio intradiscal. El procedimiento de inyección puede ser en cualquier orden, por ejemplo, los componentes se aplican al mismo tiempo o uno después del otro y se forma un andamio cuando se mezclan los componentes.

[0072] El término "componente activador" se refiere a un compuesto que es capaz de formar fibrina a partir de fibrinógeno incluyendo la trombina y/o una solución obtenible a partir de veneno de serpiente. En una realización de la invención, la trombina se aisló a partir de plasma de los seres humanos o mamíferos. También es posible que la enzima que es capaz de formar fibrina se prepara por métodos recombinantes.

[0073] El VIPCC activado se puede inyectar en combinación con una composición de células que comprende células derivadas de notocordio tales como las células de núcleo pulposo.

[0074] El VIPCC activado se puede utilizar en una cantidad adecuada para la reconstrucción de la zona dañada y depende de la extensión de la lesión.

[0075] Los componentes se pueden inyectar en la base del defecto y la aguja o cánula pueden ser retiradas del anillo fibroso cuando se encuentra resistencia. Soluciones de exceso pueden ser derramadas de la zona de inyección, formando un gel sólido y un cierre de la abertura o incisión después de la inyección.

[0076] El VIPCC comprende una relación de fibronectina:fibrinógeno de aproximadamente 1:7. El término "concentrado de crioprecipitado de plasma viral inactivado" se refiere a un crioprecipitado de sangre total que tiene una relación de fibronectina:fibrinógeno mayor que 1:12, por ejemplo como se describe en el documento EP-B-534178 y WO-A-9305822, y obtenible por

- descongelación de un criopasta;
- disolver en un tampón a pH 7,0 a 7,2;
- precalentamiento de 30 a 35°C;
- ajustar el pH a 7,0-7,2;
- la adición de hidróxido de aluminio bajo agitación;
- centrifugar y desechar el precipitado;
- la adición de CaCl₂ ;
- inactivación de los virus;
- concentrar por ultrafiltración a una concentración de proteína de 60 a 100 mg/ml.

[0077] Actualmente, pegamento de fibrina o formulaciones fibrina se han descrito para su uso en el disco intervertebral y la regeneración del sistema nervioso central, sin embargo, hemos encontrado de acuerdo con la presente invención que crioprecipitado, tal como el preparado según el método Martinowitz y Bal, que contiene una alta relación de fibronectina:fibrinógeno, cerca de la relación del crioprecipitado original y en el que la composición de crioprecipitado no incluye el ácido tranexámico y/o aprotinina bovina es más adecuado para la mejora de la adhesión, proliferación, crecimiento, diferenciación y/o mantenimiento de las células en el tejido del núcleo pulposo que las composiciones que comprenden una relación de fibronectina:fibrinógeno menor y contienen ácido tranexámico y/o aprotinina bovina. La técnica descrita ni sugiere ni describe el uso de una formulación que tiene un crioprecipitado de fibrinógeno preferido y la relación de la fibronectina, que carecen de ácido tranexámico y aprotinina bovina derivados para su uso en el núcleo pulposo anormal.

[0078] Otras formulaciones comerciales tales como TISSEEL®, Tissucol® tienen una relación de fibronectina:fibrinógeno inferior que el crioprecipitado original y contienen ácido tranexámico y/o la aprotinina bovina, así el crioprecipitado como se describe en el presente documento que comprende una relación de 1:10 a 1:5, de 1:10 a 1:7 y de aproximadamente 1:7, por ejemplo BAC; Omrix, IL preparados como se describe en el documento

EP-B-534178, en el que la plasmina y plasminógeno se eliminan como se describe en el documento EP-B-1390485 y WO-A-02095019, es más adecuado para el tratamiento del disco intervertebral y el sistema nervioso central que cualquier otro crioprecipitado comercialmente disponible, por ejemplo, crioprecipitado que se basa en la metodología de Schwartz et al, y que no retienen la relación de fibronectina:fibrinógeno presente en el crioprecipitado original o tener una relación igual o inferior a 1:12 (Bar et al, 2005) y que comprende el ácido tranexámico y/o aprotinina bovina.

[0079] El crioprecipitado como se describe en este documento contiene ciertas sustancias y relación específica de fibronectina:fibrinógeno que estimulan la unión, la migración y la proliferación de las células derivadas de notocordio, un fenómeno que puede facilitarse en tratamiento de las enfermedades de la columna vertebral, trastornos o condiciones tales como disco intervertebral degenerativo y la enfermedad del sistema central nervioso, trastorno o afección.

[0080] El crioprecipitado como se describe en el presente documento puede comprender un agente estabilizante, por ejemplo, arginina o lisina, o mezclas de arginina y lisina, o sus sales farmacéuticamente aceptables. La solución de crioprecipitado comprende una mezcla de proteínas, tales como fibrinógeno, factor VIII, factor XIII, fibronectina, factor de von Willebrand (vWF), la vitronectina y similares. La solución de crioprecipitado puede comprender un inhibidor de la proteasa que no sea la aprotinina bovina y/o ácido tranexámico. Tal crioprecipitado se describe en el documento WO-A-9833533 y US-B-6121232, en el que la plasmina y de plasminógeno se eliminan como se describe en el documento EP-B-1390485 y WO-A-02095019. El procedimiento de inactivación de virus se puede llevar a cabo por nanofiltración, tratamiento con disolvente/detergente, tratamiento térmico, tal como, pero no limitado a pasteurización, irradiación gamma o UVC (<280 nm) o por cualquier otro método conocido en la técnica. El término "partícula infecciosa" se refiere a una partícula microscópica, como microorganismo o prión, que puede infectar o propagarse en células de un organismo biológico. Las partículas infecciosas pueden ser partículas virales.

[0081] El procedimiento de inactivación viral puede llevarse a cabo mediante la adición de una molécula a la composición antes y/o durante el procedimiento de purificación. Las moléculas añadidas y sus productos pueden ser removidos por la gravitación, cromatografía en columna o cualquier otro método conocido en la técnica.

[0082] La eliminación de partículas infectivas puede llevarse a cabo mediante nanofiltración o por métodos de absorción selectiva, tales como afinidad, intercambio iónico o cromatografía hidrófoba. Procedimiento de inactivación de virus se puede utilizar como el procedimiento descrito en el documento WO-A-9114439. Un principio básico es el tratamiento del crioprecipitado con detergentes especiales y eliminar el detergente después del crioprecipitado. Un procedimiento de inactivación viral multi-etapa se puede llevar a cabo. Por ejemplo, la composición se puede someter al disolvente/detergente de tratamiento, tratamiento térmico, cromatografía selectiva y nanofiltración. En una realización de la invención, el crioprecipitado es doble viral inactivado. Según la invención, el crioprecipitado es un concentrado de crioprecipitado. El crioprecipitado se concentra en el intervalo de aproximadamente un factor de 2 a alrededor de un factor de 5. En una realización de la invención, el factor de concentración es de aproximadamente 3. En una realización de la invención, el crioprecipitado se concentra por ultrafiltración a una concentración de proteína de 60 a 100 mg/ml. La concentración de fibrinógeno en el VIPCC puede ser muy alta y puede estar en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 150 mg/ml, de 40 a aproximadamente 100 mg/ml, o de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 mg/ml.

[0083] Como se muestra en los ejemplos, el aumento de los niveles de fibrinógeno interfiere con la unión, el crecimiento y la proliferación de núcleo pulposo. Sin embargo, la alta proporción de fibronectina:fibrinógeno en el VIPCC parece mitigar el efecto indeseable de fibrinógeno presente en altos niveles en VIPCC.

[0084] En una realización de la invención, se activa el crioprecipitado de plasma. En otra realización adicional de la invención, el crioprecipitado es no activado. El procedimiento de activación se puede lograr mediante la mezcla de dicho crioprecipitado con un volumen equivalente de una enzima que es capaz de reaccionar con el fibrinógeno para formar fibrina. En una realización de la invención, la enzima es la trombina y/o una solución obtenible a partir de veneno de serpiente. La trombina es típicamente aislada de seres humanos. También es posible que la enzima que es capaz de formar fibrina se prepara por métodos recombinantes. El crioprecipitado como se describe en el presente documento y/o el compuesto de la activación puede ser suministrado como una solución o en una forma sólida, por ejemplo como un polvo liofilizado. La solución puede estar en estado de congelación.

[0085] VIPCC activado que tiene propiedades bio-mecánicas y fisiológicas del núcleo pulposo puede ser ventajosamente utilizado para reemplazar el tejido dañado natural del núcleo pulposo.

[0086] El crioprecipitado puede comprender un agente de contraste. Un "agente de contraste" se refiere a un trazador que es capaz de hacer posible la visualización de la anatomía de la columna vertebral. La técnica que se puede usar en el método descrito en este documento incluye la exploración, imágenes de resonancia magnética, tomografía, la nanotecnología, vídeo digital, de rayos X o cualquier otra técnica conocida en la técnica.

[0087] Los ejemplos no limitantes de agentes de contraste son los colorantes orgánicos, colorantes alimentarios y/o colorantes fluorescentes. El agente de contraste se puede seleccionar de diversos agentes no tóxicos, tales como

yodo. Si el espectro del agente de contraste no es visible para el ojo humano el agente puede ser detectado por un equipo apropiado.

[0088] Se describe en el presente documento la formación de una matriz de dos dimensiones adecuada para el crecimiento de células derivadas de notocordio. Además, se describe un andamiaje tridimensional para in vivo y/o in vitro, incluyendo aplicaciones de un implante biocompatible para la ingeniería de tejidos in vivo, así como para el cultivo in vitro de células. El término "ingeniería de tejidos" se refiere típicamente a la utilización de una combinación de factores bioquímicos y físico-químicos adecuados para restaurar, reemplazar, mantener y/o mejorar la función del tejido o un órgano completo. El término ingeniería de tejidos a veces es sinónimo del término medicina regenerativa.

[0089] El término "andamio" se refiere en general a una matriz tridimensional que es capaz de proporcionar integridad estructural y soporta una formación de tejido en tres dimensiones, lo que permite la reconstrucción de tejidos.

[0090] El andamio posee las siguientes propiedades: no tóxico, biocompatible, biodegradable, permite la adhesión y migración de células derivadas de notocordio, y permite la difusión de la célula vital.

[0091] El andamio también se puede utilizar para la entrega y la retención de una composición de células que comprenden células derivadas de notocordio tales como las células de núcleo pulposo.

[0092] En una realización, dicho crioprecipitado activado que es capaz de formar un andamio tridimensional in vivo puede administrarse por inyección en una columna lesionada, por ejemplo, en el núcleo pulposo de un disco degenerativo o lesión de SNC de un sujeto en necesidad. El crioprecipitado activado in vivo se puede utilizar para proporcionar soporte mecánico, la restauración de la altura y/o la fuente de anclaje de células a un sitio defectuoso o dañado in situ y/o para proporcionar una matriz en la que las células de la zona lesionada pueden migrar, invadir, crecer, proliferar, y/o diferenciarse.

[0093] El andamio que forman in vivo puede ser un material inyectable que puede ser entregado en la columna lesionada como un líquido a través de una cánula o aguja y se endurecen en el cuerpo. En una realización, el andamio que se forma in vivo puede adaptarse a la forma de la cavidad y llenar completamente el espacio de disco permitiendo así una mejor estabilidad del segmento vertebral.

[0094] El crioprecipitado se puede inyectar de forma simultánea con un compuesto de activación y endurecimiento in vivo. En una realización, el componente activador y VIPCC se administran a lo largo de la médula espinal lesionada y el VIPCC activada sirve como un andamio para la reconstrucción de heridas y/o rotura de la médula espinal causada, por ejemplo, por la compresión del disco intervertebral.

[0095] La composición de VIPCC se puede usar para la reconstitución del disco intervertebral degenerado en la enfermedad, trastorno o afección en diferentes etapas de desarrollo. En una realización de la descripción, se utiliza el método de acuerdo con la divulgación para la prevención de la hernia de disco intervertebral. En otra realización de la descripción, el método de acuerdo con la revelación es para administrarse a un sujeto en una etapa temprana de la enfermedad del disco intervertebral antes de que la hernia se lleve a cabo. En una realización adicional, el crioprecipitado activado sirve como un andamio para la reconstrucción de núcleo pulposo en un sujeto en estado avanzado de la enfermedad del disco intervertebral y/o lesión de la médula espinal causada, por ejemplo, por compresión o herniación del disco intervertebral.

[0096] El VIPCC se puede utilizar para restaurar la altura y/o para reducir o aliviar el dolor discogénico. Los individuos con alto riesgo de tener la enfermedad degenerativa del disco, como el paciente que sufre de osteoporosis, se puede monitorizar por cambios en la altura del disco y cuando se detecta una disminución, VIPCC se puede administrar para restaurar o elevar la altura del disco.

[0097] Alternativamente, el método descrito en este documento comprende la etapa de ejercer la totalidad o una parte del núcleo pulposo antes de administrar dicho crioprecipitado. El procedimiento de extracción puede llevarse a cabo enzimáticamente mediante la interrupción de la matriz extracelular, mecánicamente, mediante el uso de una sonda de nucleotoma y/o por cualquier otro método conocido en la técnica.

[0098] Por ejemplo, la cirugía puede llevarse a cabo mientras el paciente se encuentre profundamente dormido o anestesia libre por, por ejemplo, dolor, general o local, respectivamente. Una incisión se puede llevar a cabo sobre el sitio de la degeneración, por lo general la región lumbar, en la línea media. El hueso que se curva alrededor y cubre la médula espinal (lámina) se puede eliminar (laminectomía) y el tejido que está causando presión sobre el nervio o la médula espinal puede ser eliminado. El agujero a través del cual pasa el nervio se pueden ampliar para evitar una mayor presión sobre el nervio. En ocasiones, un trozo de hueso (injerto de hueso), jaulas intersomáticas, o tornillos de pedículo puede ser utilizados para fortalecer el área de la cirugía. El crioprecipitado puede ser introducido a través del orificio y/o se puede utilizar para los medios de la capa utilizados para reforzar el área de la cirugía.

[0099] En una realización de la exposición, el paciente recibe anestesia local y el procedimiento es un procedimiento

mínimamente invasivo (MIS).

[0100] Los ejemplos no limitantes de las técnicas de separación mecánica incluyen picar, cortar, fresar, pulverizar, pulir, extraer, desollar. El aislamiento de células del disco se puede facilitar aún más con el uso de otras técnicas de separación conocidas, tales como filtros, centrífugas, columnas de separación, columnas de afinidad, o por cualquier otra técnica conocida en la técnica.

[0101] Las enzimas proteolíticas capaces de degradar el tejido del cartílago incluyen, pero no se limitan a peptidasas de serina, por ejemplo, tripsina, quimotripsina, elastasa pancreática; peptidasas de cisteína, por ejemplo, la quimopapaína de papaína; peptidasas de aspártico, por ejemplo, pepsina, peptidasas de metalo, por ejemplo, colagenasa, gelatinasa, pronasa, condroitinasa; hialuronidasa y/o materiales químicos alternativos que degradarían el material del disco de la misma manera o similar, y combinaciones de los mismos.

[0102] Debe entenderse que la cantidad de la solución farmacológicamente adecuada de enzimas necesarias para la degradación de tejido del disco de mamífero puede variar.

[0103] El término "solución farmacológicamente adecuado" se refiere a la disolución de una cantidad eficaz de las enzimas proteolíticas en una solución. El pH de la solución se puede ajustar a un pH fisiológicamente compatible de aproximadamente 7,40 para la activación máxima de las enzimas proteolíticas. Para obtener mejores resultados, la solución puede contener todos los componentes necesarios para activar las enzimas proteolíticas.

[0104] Las enzimas proteolíticas capaces de tejido de cartílago degradantes se pueden suministrar como una solución y/o una forma sólida tal como polvo liofilizado. La solución y/o el polvo son estériles, libres de pirógenos en un estado secado por congelación hasta inmediatamente antes de su uso. El vial, que contiene el polvo liofilizado, típicamente se dejó calentar a temperatura ambiente y se reconstituye en una solución acuosa estéril.

[0105] Tal como se utiliza aquí, el término "pirógenos" se refiere a partículas infecciosas, tal como un virus, un prión, una endotoxina y/o una exotoxina, que puede infectar o propagar en células de un organismo biológico.

[0106] El paciente puede estar situado lateralmente y doblado hacia adelante y la aguja o cánula se puede colocar selectivamente en el núcleo pulposo bajo la guía, por ejemplo, la exploración, la resonancia magnética, la tomografía, la nanotecnología, vídeo digital y/o rayos X, o por cualquier otra técnica conocida en la técnica.

[0107] Los ejemplos no limitativos de agentes de guía son colorantes no tóxicos orgánicos, colorantes alimentarios y/o colorantes fluorescentes. Si el espectro del agente de guiado no es visible para el ojo humano el agente puede ser detectado por un equipo apropiado.

[0108] Una vez que se verifica la ubicación, la solución de enzimas proteolíticas se pueden aplicar por ejemplo por inyección en el área lesionada con el fin de degradar la totalidad o una parte del tejido de núcleo pulposo. El tejido digerido se puede aspirar y se coloca en un tubo. El medio de crecimiento tal como el medio F 12 DMEM/Ham se puede añadir a la suspensión.

[0109] En otra realización, el tejido de núcleo pulposo se elimina usando una sonda de nucleotoma. El paciente puede ser posicionado lateralmente y doblado hacia adelante y la cánula que contiene la sonda de nucleotoma se puede insertar bajo la guía como se especifica anteriormente. La sonda de nucleotoma tiene una punta redondeada que puede reseca y tejido del núcleo pulposo aspirado desde el disco lumbar. El tejido de núcleo pulposo recogido puede ser parcial o completamente digerido a 37°C con una solución de enzima proteolítica capaz de tejido de cartílago degradante como se especifica anteriormente.

[0110] El VIPCC activado como se describe en el presente documento que puede curar in vivo puede administrarse con las células de núcleo pulposo cosechadas, proporcionando de este modo una construcción eficaz en la que las células inyectadas pueden crecer en un modo tridimensional.

[0111] En el caso de que células de núcleo pulposo se tratan con la enzima proteolítica, antes del procedimiento de administración, la solución de enzima proteolítica puede ser vaciada de células y/o tejidos de núcleo pulposo disociados mediante la adición de una cantidad eficaz de inactivadores y/o la eliminación de las enzimas proteolíticas por centrifugación y descartando la fase sobrenadante, o por cualquier otro método conocido en la técnica.

[0112] Las células de núcleo pulposo cosechadas desasociadas pueden ser congeladas en nitrógeno líquido y se almacenan a -80°C hasta su uso.

[0113] Por otra parte, el método de la descripción puede incluir, sin excluir otras posibilidades, autólogas, alogénicas, xenogénicas y/o células portadoras de ADN recombinante. El término "células autólogas" se refiere a células derivadas originalmente de la misma persona a la que van a ser reimplantadas.

[0114] El término "células alogénicas" se refieren a células obtenidas a partir del cuerpo de un donante de la misma especie.

[0115] Células "xenogénicas" son las aisladas de individuos de otra especie.

[0116] Las células inyectadas pueden comprender una composición de células que comprende células seleccionadas a partir de células derivadas de notocorda.

[0117] Por lo tanto, el crioprecipitado, como se describe en el presente documento se pueden administrar en el disco, opcionalmente con células derivadas de notocorda, tales como células de núcleo pulposo.

[0118] La población de células puede comprender además células de anillo fibroso (por ejemplo, de cadáver).

[0119] En una realización de la divulgación, las células inyectadas son células de núcleo pulposo. En una realización adicional de la divulgación, las células son de origen autólogo. En otra realización adicional de la descripción, la eliminación de núcleo pulposo autólogo, y los pasos de suministro de células o re-implantación se realizan dentro del mismo procedimiento quirúrgico.

[0120] Las células que se entregarán en la columna vertebral lesionada pueden ser incluidas en el componente activador por ejemplo, trombina, en el componente de crioprecipitado, y/o pueden estar en un componente separado.

[0121] De acuerdo con una realización de la descripción, las células a administrarse en la columna vertebral lesionada puede ser cultivada ex vivo antes del procedimiento de administración en un crioprecipitado que comprende una fibronectina: relación de fibrinógeno de 1:10 a 1:5. Sin embargo, en otra realización de la invención, el crioprecipitado contiene una fibronectina: concentración relativa de fibrinógeno de 1:10 a 1:7. Sin embargo, en otra forma de realización adicional de la invención, la relación de fibronectina:fibrinógeno es de aproximadamente 1:7.

[0122] Las células cultivadas ex-vivo se pueden cultivar en crioprecipitado activado y/o no activado. El procedimiento de activación se puede lograr mediante la mezcla de dicho crioprecipitado con una enzima que es capaz de reaccionar con el fibrinógeno para formar fibrina. En una realización de la invención, la enzima es la trombina y se añade en un volumen equivalente al crioprecipitado. En otra realización de la invención, la enzima es una solución obtenible a partir de veneno de serpiente. La trombina se puede aislar a partir de plasma de los seres humanos o de mamíferos y/o preparado por métodos recombinantes. El crioprecipitado de la invención y/o de la enzima capaz de formar fibrina puede ser suministrado como una solución o en una forma sólida, por ejemplo como un polvo liofilizado. La solución puede estar en estado de congelación.

[0123] Como se usa en el presente documento, cultivo de células "ex-vivo" se refiere al cultivo de células fuera del cuerpo. El cultivo de células ex vivo incluye el cultivo de células in vitro, por ejemplo, en suspensión, o en placas individuales o de múltiples pocillos. Cultivo ex-vivo también incluye células co-cultivo con diferentes tipos de células, y se cultiva en o sobre matrices de dos o tres dimensiones.

[0124] También se describe en el presente documento un kit para uso en el tratamiento de una enfermedad de la columna, trastorno o afección tal como, por un disco intervertebral degenerativo. El kit comprende un primer recipiente que comprende un VIPCC como se describe aquí, y un segundo recipiente que comprende una enzima capaz de formar fibrina cuando reacciona con fibrinógeno. De acuerdo con la invención el ácido tranexámico y aptorinina bovina pueden estar ausentes del kit.

[0125] En una realización, VIPCC en el que plasminógeno y plasmina se han reducido a igual o menor que 15 µg/ml como por ejemplo 5 µg/ml o menos se utiliza.

[0126] En otra realización, el kit está dirigido para administrar soluciones terapéuticas en el tratamiento de emergencia de la lesión de la columna y el cable u otro mitigación de los axones lesionados en un sistema nervioso central lesionado.

[0127] El kit puede comprender también un agente de contraste, por ejemplo, con el fin de localizar el sitio de la administración y para mejorar la formación de imágenes. El agente de contraste puede ser incluido en el envase que comprende el componente de crioprecipitado, en el recipiente que comprende el componente de enzima y/o en un recipiente separado. En una realización de la invención, el agente de contraste se formula con el crioprecipitado. En otra realización de la invención, el agente de contraste se formula con la enzima capaz de formar fibrina. Ejemplos de agentes de contraste incluyen, pero no se limitan a, colorantes orgánicos, colorantes alimentarios y/o colorantes fluorescentes. El agente de contraste se puede seleccionar de diversos agentes no tóxicos, tales como yodo. Las técnicas que pueden usarse para detectar el agente de contraste incluyen la exploración, imágenes de resonancia magnética, tomografía, la nanotecnología, vídeo digital, de rayos X o cualquier otra técnica conocida en la técnica. Si el espectro del agente de visualización no es visible para el ojo humano el agente puede ser detectado por un equipo apropiado.

[0128] La invención se refiere a un kit que comprende: un primer recipiente que comprende un VIPCC como se describe aquí, un segundo recipiente que comprende una enzima capaz de formar fibrina cuando reacciona con fibrinógeno, y un tercer recipiente que comprende una enzima proteolítica capaz de degradar extracelular matriz tales como enzimas proteolíticas capaces de tejido de cartílago degradantes seleccionado del grupo que consiste en serina peptidasas, peptidasas de cisteína, peptidasas aspárticas, peptidasas de metalo, hialuronidasa y combinaciones de los mismos

[0129] En una realización de la invención, la enzima proteolítica se selecciona del grupo que consiste en tripsina, quimotripsina, elastasa pancreática, quimopapaína, papaína, pepsina; collagenasa, gelatinasa, condroitinasa pronasa, hialuronidase y/o materiales químicos alternativos que degradarían el material del disco de la misma manera o similar, y combinaciones de los mismos. El kit también puede comprender un agente de contraste, por ejemplo, yodo, como se describe anteriormente.

[0130] El crioprecipitado y/o la enzima capaz de formar fibrina y/o la enzima proteolítica y/o el agente de contraste se pueden proporcionar en la vertebra espinal y los kits de reconstrucción del sistema nervioso central como una solución y/o en una forma sólida, por ejemplo, como polvo liofilizado. La solución puede estar en estado de congelación. Los kits pueden comprender instrucciones para su uso. Los kits también pueden comprender una aguja tal como una aguja espinal incluyendo por ejemplo una aguja espinal curvada. Una cánula espinal puede ser usada alternativamente. Una jeringa de doble o una de varios barriles u otro dispositivo de suministro de selladores de fibrina se puede incluir en el kit.

[0131] También se describe aquí un andamio adecuado para uso en el tratamiento de una enfermedad de la columna, trastorno o afección tal como para la regeneración del disco intervertebral espinal y el sistema nervioso central. El andamio se prepara utilizando un crioprecipitado como se describe en este documento y un compuesto activador. La composición VIPCC puede no contener ácido tranexámico y/o aprotinina bovina.

[0132] Los componentes de los kits de reconstrucción columna vertebral, o formulaciones, pueden ser en receptores separados tales como jeringas que se pueden aplicar en cualquier orden, por ejemplo, los componentes se pueden aplicar simultáneamente o uno después del otro y un andamio se forma cuando se mezclan los componentes.

[0133] En una realización de la invención, los receptores separados se pueden configurar para la aplicación de dicho crioprecipitado, una enzima capaz de formar fibrina y células derivadas de notocordiol. En otra realización de la invención, las células derivadas de notocordiol se pueden combinar con dicho crioprecipitado y/o con la enzima capaz de formar fibrina antes de mezclarse los componentes.

[0134] Según la invención, los componentes del kit se pueden proporcionar como una solución y/o en una forma sólida. La solución puede estar en estado de congelación.

[0135] Otro objeto de la invención es el establecimiento de un banco de tejidos o de células de las células derivadas de notocordio cultivadas en un andamio como se especifica anteriormente.

[0136] En una realización, el banco de tejidos o de células se pueden utilizar en la reparación y/o regeneración del disco intravertebral y la reconstrucción del sistema nervioso central. En una realización, las células derivadas de notocordio son células de núcleo pulposo.

[0137] El tejido o el banco de células puede comprender autólogo, alogénico, xenogénico y/o células que albergan el ADN recombinante.

[0138] Como se usa en este documento, "tejido o banco de células" se refiere a un banco de tejidos o de células desarrollado por un método que permita el establecimiento de células derivadas de notocordiol adecuadas para la reparación, regeneración y/o sustitución de la columna vertebral dañada, por ejemplo, tejido del disco intravertebral y tejido del sistema nervioso central, tales como axones y neuronas motoras. Las células en dicho banco de tejidos o de células puede mantener sus características, por ejemplo, propiedades bioquímicas, morfológicas y/o físicas, necesarias para realizar la función especializada. Ventajosamente, las células tienen la capacidad de proliferar y/o diferenciarse en células de núcleo pulposo en dos construcciones de dos o tres dimensiones.

[0139] También se describe aquí un vehículo que puede usarse ventajosamente para la entrega de una composición de células que comprenden células derivadas de notocordiol en una columna vertebral dañada como disco intervertebral dañado y el tejido del sistema nervioso central porque el crioprecipitado, como se describe en el presente documento proporciona un andamio adecuado sobre el cual las células derivadas de notocordiol pueden adjuntar, migrar, crecer, dividir, mantener su función, morfología y/o diferenciarse. El vehículo o construcción comprende crioprecipitado como se describe en este documento y las células derivadas de notocordiol. El ácido tranexámico y aprotinina bovina pueden ser excluidos de la composición de crioprecipitado. En una realización de la invención, las células derivadas de notocordiol son células de núcleo pulposo. El vehículo de suministro celular puede comprender además células de anillo fibroso.

[0140] El término "vehículo" se refiere a un medio para la entrega de las células en un tejido específico in vivo. Las células viables se incorporan en el vehículo de suministro de células y se administran en la columna vertebral dañada como disco intervertebral o del sistema nervioso central que permite la reconstitución, reparación o restauración del sitio dañado. El dispositivo de administración de células puede estar en un estado líquido o como un constructo de curado.

[0141] Las células pueden ser autólogas, alogénicas, xenogénicas y/o células que albergan ADN recombinante. Las células cultivadas en monocapa de disco tienden a des-diferenciar y perder su fenotipo celular típico (Benya y Shaffer "Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels" Cell 1982; 30: 215-224. De acuerdo con la invención se ha encontrado que las células de anillo fibroso y las células derivadas de notocordiol, por ejemplo, núcleo pulposo cultivadas en crioprecipitado descritas aquí mantienen su fenotipo y proporcionan una matriz que puede ser utilizada en una expansión in vitro y in vivo para la cirugía reconstructiva del cartílago intervertebral y sistema nervioso central. Se encontró de acuerdo con la presente invención que VIPCC tiene componentes células conductoras de condro que estimulan la fijación y proliferación del anillo fibroso y las células de núcleo pulposo sembradas en placa de cultivo recubierta con VIPCC. Los resultados según la invención muestran que cambios no morfológicos detectables o daños se hicieron durante sub-cultivo o tripsinización. Por otra parte, a pesar de que las células migraron a través de la placa de cultivo, se observó una fijación diferencial a VIPCC y se observó la fibronectina. Los resultados demuestran que la fibronectina, reconocida como un agente que promueve la adhesión celular, es un componente fundamental en el VIPCC y tiene que estar en una relación específica con el fibrinógeno para facilitar la fijación y proliferación de condrocitos de núcleo pulposo.

[0142] Por lo tanto, también se describe aquí un método para facilitar el crecimiento, la proliferación, diferenciación y/o mantenimiento de las células derivadas de notocordio que comprende la puesta en contacto de la población de células de las células derivadas de notocordio con el VIPCC descrita en este documento. Sin embargo, en otra realización de la invención, las células derivadas de la notocorda son células de núcleo pulposo. La puesta en contacto del núcleo pulposo con el crioprecipitado se puede llevar ex vivo y/o in vivo.

[0143] El VIPCC puede ser activado o no activado. Las células puestas en contacto pueden ser autólogas, alogénicas, xenogénicas y/o células que albergan el ADN recombinante.

[0144] El crioprecipitado descrito en este documento puede tener capacidades conductoras e inductivas.

[0145] La capacidad conductiva o inductiva de dicho crioprecipitado descrito en este documento puede ser determinado después del uso del crioprecipitado y por consiguiente evaluar la mejora de la adherencia, la migración, la proliferación y/o diferenciación del anillo fibroso y las células derivadas de notocordio se cultivaron, por ejemplo, células de núcleo pulposo. Las evaluaciones de estas propiedades se llevan a cabo por cualquier técnica conocida en la técnica, por ejemplo, la proliferación mediante el uso de un haemocitómetro o por tinción con hematoxilina y eosina, la diferenciación, mediante la medición de la expresión de sulfato de condroitina, la migración mediante el uso de prueba de migración como se ejemplifica a continuación.

[0146] Tal como se utiliza aquí, el término "conductor" se refiere a la capacidad del crioprecipitado activado para servir como un andamio en el que las células específicas se pueden unir, crecer, migrar, proliferar y/o diferenciar, incluyendo "condro-conductor" o "neuro-conductor", etc.

[0147] Tal como se utiliza aquí, el término "inductivo" se refiere a la capacidad del crioprecipitado para estimular las células específicas para unir, crecer, migrar, proliferar y/o diferenciar, incluyendo "condro-inductivo", o "neuro-inductivo", etc.

[0148] Otro término usado para "conductor" es "quimiotáctica". El término "quimiotáctica" se refiere a las respuestas fisiológicas que resultan en un movimiento característico o la orientación de las células hacia un estímulo químico.

[0149] Una inyección intradiscal o intratecal puede resultar en un cambio en la estructura típica de la población de núcleo pulposo por ejemplo daño necrótico, núcleos picnóticos y cariólisis. Se encontró según la invención, que este problema puede ser resuelto o disminuido mediante la inclusión del crioprecipitado descrito aquí en la formulación para administrarse a la columna lesionada, por ejemplo, degenerativa del disco y el sistema nervioso central lesionado.

[0150] El kit, la formulación, el andamio, el banco de tejidos o de células y/o el vehículo, puede comprender uno o más aditivos tales como, pero no limitado a: factores bioquímicos que soportan la expansión de las células mientras se mantiene su compromiso de diferenciar los agentes terapéuticos (tales como antibióticos, antiinflamatorios), analgésicos, fármacos anti-tumorales, factores de crecimiento, proteínas, hormonas, factores inductores de cartílago, proteoglicanos tales como agregano, colágeno de tipo I y II, los componentes que contienen oxígeno, enzimas y similares.

[0151] Uno o más de estos componentes pueden estar incluidos en el componente de crioprecipitado, en el componente activador por ejemplo, la trombina, y/o puede estar en un componente separado.

[0152] El kit, la formulación, el andamio, el banco de tejidos o de células y/o el vehículo para administrarse a un sujeto en necesidad de la reconstitución del sistema nervioso central puede comprender inhibidores de Rho quinasa tales como, por ejemplo, Cethrin®, Y-27632, C3, etc.

[0153] También se describe aquí un método para tratar una enfermedad de la columna, trastorno o afección como disco intervertebral y enfermedad del sistema nervioso central que comprende la administración a un sujeto en necesidad de un kit, un VIPCC, las células de un banco de tejidos o de células y/o un vehículo.

[0154] También se describe aquí un concentrado de crioprecipitado inactivado de plasma viral activo para su uso en el tratamiento de una enfermedad de la columna, trastorno o afección. Aprotinina bovina está ausente de la composición de crioprecipitado. En una realización, dicho crioprecipitado comprende una fibronectina inicial: concentración relativa de fibrinógeno de 1:10 a 1:5, o de 1:10 a 1:7.

[0155] El crioprecipitado puede ser utilizado para el tratamiento de una enfermedad del disco intervertebral, trastorno o afección, o un SNC lesionado.

[0156] Se constató de acuerdo con la invención que VIPCC activado restauró sustancialmente la altura IVD en comparación con discos inyectados PBS. Por lo tanto, el VIPCC activado descrito en este documento puede funcionar como matriz o dispositivo con propiedades mecánicas adecuadas que puede servir ventajosamente para restaurar sustancialmente la estructura normal del disco, la altura y permitir retención de espacio de disco bajo carga.

[0157] Por lo tanto, también se describe aquí VIPCC como se describe aquí para su uso en la elevación o la restauración de la altura del disco intervertebral. Por ejemplo, VIPCC activado como se describe en el presente documento se puede inyectar en disco negro para restablecer la altura del disco. En las primeras etapas de la degeneración del disco, cuando las células de núcleo pulposo están todavía presentes en el disco, como se describe aquí VIPCC elevará ventajosamente la altura del disco y servir como andamiaje para las células de núcleo pulposo. En este caso el ácido tranexámico y aprotinina bovina están ausentes del concentrado de crioprecipitado.

[0158] En una realización, dicho crioprecipitado comprende una fibronectina inicial: concentración relativa de fibrinógeno de 1:10 a 1:5, o de 1:10 a 1:7 tal como en la relación de aproximadamente 1:7.

[0159] El kit, formulación, banco de tejidos o de células y/o vehículo para prevenir y/o tratar la columna lesionada puede incluir opcionalmente células autólogas, alogénicas, xenogénicas de anillo fibroso y/o células de anillo fibroso que albergan ADN recombinante.

[0160] La revelación de rangos en la descripción de la invención se entiende fácilmente por el experto en la materia. Esto significa que la divulgación de valores continuos y figuras entre los límites de los intervalos, incluyendo las figuras y valores límite. Por ejemplo, si una gama se da desde 1:11 a 1:5, se quiere decir al menos 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6 y/o 1:5 con todas las combinaciones de intervalos de sub intermedios como 1:11 y 1:10, 1:11 a 1:9, 1:11 a 1:8, 1:11 a 1:7, 1:11 a 1:6, 1:11 a 1:5 o 1:10 a 1:9, 1:10 a 1:8, 1:10 a 1:7, 1:10 a 1:6, 1:10 a 1:5, etc.

[0161] Los siguientes ejemplos son ilustrativos pero no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Preparación de anillo fibroso y condrocitos de núcleo pulposo.

[0162] Este ejemplo ilustra la preparación de un cultivo celular de condrocitos. La columna lumbar de cerdo (L1-L6) se aisló 12 horas después de masacre (transportado a 4°C), se esterilizó con scrab septal durante 10 minutos y se empapó en 70% de etanol durante 5 minutos. El músculo y otros tejidos conectivos se retiraron y cada cuerpo vertebral se diseccionó en el medio de manera que se pudieron obtener los discos intervertebrales (DIV) aislados. Los IVDs aislados se sumergieron en el cilindro graduado que contiene PBS con 200 µg de azida de sodio/ml durante unos segundos. Seguido por inmersión en PBS estéril que contiene 10 U/ml penicillin, 0,1 mg/ml de estreptomycin, 2,5 µg/ml anfotericina, 50 µg/ml de gentamicina, 10 µg/ml de vancomicina, 65,6 µg/ml de cefalosporina y 10% de suero bovino fetal (FBS). Las muestras se transfirieron entonces a un flujo laminar estéril y el procedimiento restante se realizó en condiciones estériles.

[0163] Cada IVD se cortó por la mitad usando un escalpelo y el tejido del núcleo pulposo se separó cuidadosamente y se colocó en una placa de cultivo celular 97 mm. El tejido de núcleo pulposo se enjuagó tres veces en PBS suplementado con los antibióticos y FBS mencionados anteriormente para eliminar los residuos. A continuación, el tejido de núcleo pulposo se sometió a digestión suave (durante 3 horas) mediante una solución de colagenasa (Sigma cat n° C-6885; 3 mg/ml en mezcla 1:1 de medio DMEM/F12 de Ham (Industrias Biológicas) suplementado

con 10 U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina, 0,25 µg/ml anfotericina, 100 mg/µl de gentamicina, 10 µg/ml de vancomicina y 6,56 µg/ml de cefalosporina) durante 3 horas a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂.

[0164] Antes del procedimiento de digestión la solución de collagenasa se transfiere a través de filtro de 0,45 µm (Millipore SLHV033RS).

[0165] El tejido digerido se filtra a través de gasa estéril y se centrifugó a 800g durante 5 minutos. Después de la centrifugación, la fase sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 2 ml de DMEM/F12 de Ham suplementado con 10 U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina, 0,25 µg/ml anfotericina, 100 mg/µl de gentamicina, 10 µg/ml de vancomicina y 6,56 µg/ml de cefalosporina.

[0166] El tejido del anillo fibroso se eliminó de las IVDs abiertas, colocadas en una placa de cultivo celular 97 mm y se lavó dos veces en PBS que contenía 10 U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina, 2,5 µg/ml de anfotericina, 50 µg/gl de gentamicina, 10 µg/ml de vancomicina, 65,6 µg/ml de cefalosporina y 10% de FBS. El tejido del anillo fibroso se desmenuzó en pedazos pequeños (3-5 mm) utilizando un bisturí. El tejido picado se incubó durante la noche a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂. Después de la incubación, el tejido fue digerido con una solución de collagenasa (preparada como se ha mencionado anteriormente) en 5% de CO₂ a 37°C durante 5 horas. Después de completarse la digestión, la suspensión celular se transfiere a través de una gasa estéril. Después, la suspensión se centrifugó a 800g durante 5 minutos y el sedimento que contiene los condrocitos de anillo fibroso se resuspendieron en 2 ml de medio fresco DMEM/F12 de Ham (complementado como se mencionó anteriormente).

Ejemplo 2

Efecto de la trombina, concentrado de crioprecipitado viral en plasma inactivado (VIPCC) y componentes de los mismos sobre la unión celular de anillo fibroso y la proliferación.

[0167] El siguiente ejemplo se llevó a cabo con el fin de investigar el efecto de la trombina, VIPCC, y componentes de los mismos en el anillo fibroso de células de unión, la proliferación y la quimiotaxis. Para este propósito, una placa de cultivo de plástico 97 mm se revistió a la circunferencia con 80 µl de las siguientes soluciones: VIPCC (BAC; Omrix, IL; preparado como se describe en el documento EP-B-534178, en el que la plasmina (plasminógeno) como se describe en el documento EP-B-1390485); fibrinógeno humano purificado (Enzyme Research; n° de cat FIB1 2800L); trombina (Omrix, IL; preparado como se describe en el documento US-B-5.143.838 y en el documento EP-B-378.798); y albúmina de suero humano (Sigma; n° de cat A7030) véase fig. 1. Cada solución contenía 5-20 µg/ml de proteína total. Las diluciones se realizaron en solución salina. El contenido de fibrinógeno en el revestimiento de fibrinógeno purificado y en el revestimiento VIPCC era de aproximadamente 8 µg. Las soluciones se dejaron secar en un flujo laminar en condiciones estériles. Posteriormente, 150 µl de células de anillo fibroso (5x10⁶ se colocaron) suspendidas en medio de crecimiento (DMEM/F12 de Ham suplementado con los antibióticos mencionados anteriormente y 10% de FBS) en el centro del plato (Fig. 1 Origen), el plato se cubrió y se incubó durante la noche a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂. Después de la incubación, el medio se desecha y se reemplaza por 10 ml de medio de crecimiento (DMEM/medio F12 de Ham suplementado con antibióticos y 10% de FBS), y la placa de cultivo se incubó durante 14 días adicionales.

[0168] Evaluaciones histológicas de los dos cultivos dimensionales anteriores se llevaron a cabo mediante el método de tinción con hematoxilina y eosina. Brevemente, los cultivos de condrocitos se fijaron con 95% de etanol durante 15 minutos, se lavaron en H₂O y se expusieron a solución de hematoxilina Gill NR1 (Sigma; n° de cat GHS116) durante 3 minutos. A continuación, los cultivos se lavaron en H₂O, contrarrestar en teñido con eosina Y (Sigma; n° de cat E4382) durante 30 segundos y se enjuagó en 95% de etanol y H₂O. Después, las células se lavaron en H₂O tres veces y se analizaron macroscópicamente y microscópicamente. Como se ve en la Fig. 1, las células de anillo fibroso sembradas en el centro de una placa de cultivo migraron de manera uniforme a través de todo el campo, pero mostraron mejor fijación y proliferación en los puntos revestidos que comprenden VIPCC en comparación con placas sin recubrir o fibrinógeno humano, trombina, o puntos recubiertos de albúmina de suero humano. Los resultados indican que VIPCC tiene componentes condro-conductores que estimula la unión celular de anillo fibroso y la proliferación y puede facilitarse en la reconstrucción de disco intervertebral degenerativo.

Ejemplo 3:

Efecto del procedimiento de tratamiento con tripsina y/o pasaje en VIPCC mediada por la unión de células de anillo fibroso y la proliferación.

[0169] El número de pasaje se refiere a la "edad" de una línea celular o el número de veces que las células han sido subcultivadas. Algunas líneas de células pueden presentar cambios morfológicos después de pasajes. Además, los procedimientos de cultivo celular utilizados para el subcultivo, tales como tripsinización, pueden dañar las membranas celulares que resultan en mal agarre, la formación de grumos o de las membranas de aspecto "irregular". El presente estudio tuvo como objetivo determinar los efectos del tratamiento con tripsina y/o pasaje en la

unión de células de condrocitos de anillo fibroso mediadas por VIPCC y proliferación. Para este propósito, los condrocitos derivados del anillo fibroso (como se describe en el Ejemplo 1) fueron aislados y 500 µl que contiene $0,625 \times 10^5$ células se colocaron en un pocillo de una placa de 24 pocillos sin recubrimiento. El cultivo se incubó durante 11 días en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ a 37°C. Después de la incubación, las células se disociaron enzimáticamente mediante la adición de 100 µl de tripsina (tripsina-EDTA Biological Industries, 03-050-1A) a cada pocillo a 37°C durante 5 minutos. Los condrocitos disociados se obtuvieron de tres pozos en un vial y la suspensión celular se centrifugó a 800g durante 5 minutos. La fase sobrenadante se descartó, las células se resuspendieron en 200 µl DMEM/medio F12 de Ham (suplementado con antibióticos y 10% de FBS) y se colocan en el centro de una placa de cultivo de plástico de 97 mm recubierta en la circunferencia con gotas de 80 µl de las siguientes soluciones: VIPCC que contienen 6,4 µg de proteína total (de la que 4,7 µg es fibrinógeno), 3 µg de fibrinógeno humano purificado, 0,18 µg fibronectina (producido de acuerdo con Miekka et al "Rapid methods for isolation of human plasma fibronectin". Thromb Res 1982; 27: 1-14.), y una mezcla de fibronectina purificada/fibrinógeno humano en una concentración de 0,3:2,7 µg, respectivamente (relación aproximada de 1:10). El cultivo se incubó en 5% de CO₂ a 37°C durante 24 horas, se lavaron dos veces en un medio de crecimiento para eliminar las células no unidas, y se añadió 10 ml de DMEM/ medio de F12 de Ham (suplementado con antibióticos y 10% de FBS). Los cultivos se incubaron durante 9 días adicionales. La evaluación morfológica se realizó mediante tinción de las células con las soluciones de hematoxilina y eosina, seguidas por observación macroscópica y microscópica.

[0170] Los resultados muestran que el sub-cultivo o procedimiento de tripsinización no da lugar a ningún cambio morfológico de las células de anillo fibroso. Por otra parte, es evidente que las células migran a través de la placa de cultivo, pero se observó una unión diferencial a la capa VIPCC y fibronectina (Fig. 2). Los resultados demuestran que la fibronectina, reconocida como agente que promueve la adhesión celular, es un componente fundamental en el VIPCC que estimula la fijación y proliferación de células de condrocitos.

Ejemplo 4:

Efecto de fibrinógeno: relación de fibronectina en anillo fibroso y unión celular de núcleo pulposo y proliferación.

[0171] El ejemplo anterior ilustra el papel de la fibronectina presente en el componente VIPCC en la estimulación de la migración, la proliferación y la fijación de los condrocitos de anillo fibroso. El presente experimento se diseñó para investigar el efecto de diferentes relaciones de fibronectina: las mezclas de fibrinógeno en fijación y proliferación de células de núcleo pulposo y condrocitos de anillo fibroso. Para este propósito, un pocillo de una placa de veinticuatro pocillos se recubrió con 200 µl de uno de los siguientes componentes: 0,626 µg de fibronectina purificada; 10 µg de fibrinógeno humano purificado (FGN); o con una mezcla de fibrinógeno y fibronectina en la siguiente concentración: 0,626 µg: 3,13 µg, 0,626 µg: 6,26 µg, o 0,626 µg: 12,52 µg (proporciones de 1:5, 1:10 y 1:20, respectivamente). Por lo tanto, en los componentes la cantidad de fibronectina se mantuvo constante, mientras que se incrementa la cantidad de fibronectina.

[0172] Las soluciones se dejaron adherir a los pocillos en un flujo laminar en condiciones estériles. Después de 3 horas, el exceso de solución se eliminó y la placa se volvió del revés durante 2 horas adicionales de incubación para permitir el secado. 500 µl de células de núcleo pulposo o anillo fibroso recién aisladas se suspendieron en medio DMEM/F12 de Ham (suplementado con los antibióticos mencionados anteriormente y 10% de FBS) y se sembraron en los pocillos recubiertos de arriba a una concentración de 6×10^4 células por pocillo. Los cultivos se incubaron en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ a 37°C durante 5 y 12 días.

[0173] Evaluaciones histológicas de los cultivos de dos dimensiones anteriores se llevaron a cabo después de 5 y 12 días in vitro. Los condrocitos cultivados se fijaron y se expusieron a soluciones de hematoxilina y eosina Y, como se ha especificado anteriormente. Después, el cultivo se tiñó con violeta cristal (1 g en 100 ml de ácido acético) durante 10 minutos y se lavó en H₂O.

[0174] Con el fin de cuantificar el nivel de fijación de las células, el color se extrajo de las células con 100 µl 70% de etanol durante 10 minutos. 75 µl de alícuotas se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm. La absorbancia de las células cultivadas en pocillos recubiertos de fibronectina se consideró como la unión de células de 100%.

[0175] Los resultados de núcleo pulposo y la fijación de células de anillo fibroso después de 5 días en cultivo sobre los diferentes revestimientos son presentados en las Figuras 3A y B, respectivamente. Sorprendentemente, se encontró que en contraste con la unión de células de anillo fibroso, la unión de células del núcleo pulposo se vio afectada por los diferentes revestimientos. Los resultados muestran que un aumento en la concentración de fibrinógeno redujo significativamente la unión de células de núcleo pulposo de una manera dependiente de dosis. Mientras que un aumento de la relación de fibronectina:fibrinógeno llevan al resultado opuesto (Fig 3A), por ejemplo, una mezcla purificada de la fibronectina:fibrinógeno en una relación de 1:5 mostró una mayor tasa de fijación de las células del núcleo pulposo, en comparación con mezclas purificadas en proporciones de 1:10 y 1:20 (Fig 3A). Estos

resultados demuestran que fibronectina:fibrinógeno en una relación de 1:5 es más adecuada para la unión por células y la proliferación de células de núcleo pulposo de mezclas que comprenden una relación inferior de fibronectina:fibrinógeno.

5 **[0176]** Estos resultados indican el papel clave de la relación de fibronectina:fibrinógeno en la unión de las células del núcleo pulposo y demostrar la ventaja de utilizar una relación de alto nivel de fibronectina:fibrinógeno para las células de núcleo pulposo.

10 **[0177]** El efecto de VIPCC que contiene una fibronectina: se evaluó el fibrinógeno en una proporción de 1:10 en el núcleo pulposo y la proliferación celular de anillo fibroso: relación de fibrinógeno en el intervalo de 1:10 a 1:5 y una mezcla purificada de la fibronectina. La proliferación celular se calculó restando el porcentaje de células vinculado en día 5 a partir del porcentaje de células vinculado en día 12. Los resultados se basan en las mediciones llevadas a cabo en el experimento anterior. Los resultados se resumen en la Tabla 1 que muestra el porcentaje de células unido después de 5 y 12 días de cultivo.

15 **Tabla 1: El porcentaje de células vinculadas a núcleo pulposo y anillo fibroso en VIPCC y revestimientos de mezcla de fibronectina/fibrinógeno (1/10).**

		Una mezcla purificada de fn/fgn (1/10)	VIPCC
	Día del cultivo	Células unidas (%)	
Núcleo pulposo	5	22	56
	12	14	77
Anillo fibroso	5	65	62
	12	71	88

20 **[0178]** Los resultados de la Tabla 1 se presentan como porcentajes de células unidas en relación con células unidas en el recubrimiento de la fibronectina en el mismo experimento (considerada como 100%).

25 **[0179]** Los resultados obtenidos indican que en el día 5 unión de células del núcleo pulposo fue significativamente más alta en recubrimiento de VIPCC en comparación con una mezcla purificada de fibronectina:fibrinógeno en una relación de 1:10 (unión de las células 56% y 22% para VIPCC y la mezcla purificada, respectivamente) (Figura 3A y Tabla 1). Por el contrario, la unión celular de los condrocitos de anillo fibroso era similar en ambos recubrimientos (unión de células 62% y 65% para VIPCC y la mezcla purificada, respectivamente) (Fig. 3B y la Tabla 1).

30 **[0180]** Además de los resultados obtenidos en el día 12 se muestra que el cultivo de células de anillo fibroso sembró en recubrimiento VIPCC exhibió un aumento significativo en el número de células (62 y 88% en el día 5 y 12, respectivamente; $\Delta = 26\%$) en comparación con un revestimiento de mezcla purificada fibronectina:fibrinógeno (65 y 71% en el día 5 y 12, respectivamente; $\Delta = 6\%$). El cultivo de células de núcleo pulposo mostraba un efecto similar, aunque pronunciado. El recubrimiento VIPCC resultó en un incremento de 21% en número celular (56 y 77% en el día 5 y 12, respectivamente), mientras que el revestimiento de mezcla de fibronectina:fibrinógeno resultó en una disminución de células unidas (22 y 14% en el día 5 y 12, respectivamente; $\Delta = -8\%$). Estos resultados demuestran que la proliferación de células de células de núcleo pulposo y anillo fibroso era mayor en un revestimiento VIPCC que en un revestimiento compuesto de la fibronectina purificada y la mezcla de fibrinógeno y que los condrocitos de núcleo pulposo fueron más afectados por los diferentes revestimientos.

50 Ejemplo 5:

El efecto de VIPCC y mezclas de fibronectina:fibrinógeno purificado en núcleo pulposo cultivado.

55 **[0181]** El efecto sobre la unión de las células del núcleo pulposo y la viabilidad de las diferentes concentraciones de fibronectina y la mezcla de fibrinógeno se evaluó adicionalmente usando el ensayo de XTT. El ensayo se basa en la capacidad de células viables para reducir 2,3-Bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfenilo)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT) a partir de una sal de tetrazolio amarilla a un compuesto de formazano de naranja soluble.

60 **[0182]** Se prepararon las células de núcleo pulposo usando el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Una parte inferior y placa plana 96 se recubrió con 30 μ l de una de las siguientes soluciones: 0,626 μ g fibronectina purificada, 10 μ g de fibrinógeno purificado humano, VIPCC diluida (contiene aproximadamente 1,57 μ g fibronectina y 10 μ g fibrinógeno), y la fibronectina/mezcla de fibrinógeno (0,626 μ g; 6,26 μ g; 1/10). Las soluciones se dejaron secar en un flujo laminar en condiciones estériles y después la suspensión celular de 100 μ l se dispensó en los pocillos pre-recubiertos a una densidad de 1×10^4 células por pocillo. Pocillos no recubiertos sirvieron como grupo de control. Después de un período de incubación de 4 h, el medio de crecimiento (medio DMEM/F12 de Ham suplementado con los antibióticos mencionados anteriormente y 10% de FBS) se reemplazaron con medio fresco

para eliminar las células no unidas. Los cultivos se incubaron en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ y 95% de aire a 37°C durante 24 horas. Al final del periodo de incubación, 50 µl del reactivo XTT (Kit de proliferación de células XTT; Biological Industries; n° de cat 20-300-1000) se añadió a cada pocillo, y los cultivos se colocaron en una incubadora a 37°C durante 4 horas. El color desarrollado se leyó por un lector de espectrometría ELISA de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se desechó el sobrenadante y se añadió medio de crecimiento fresco. El ensayo se repitió 5 días más tarde. La intensidad de la absorbancia es proporcional a la cantidad de células activas metabólicas. Los resultados se presentan como porcentaje de células activas metabólicas relativas a las células activas metabólicas en recubrimiento de fibronectina (100%).

[0183] Como se ve en la Fig. 4, el recubrimiento de fibrinógeno resultó en una disminución significativa en el nivel de células activas metabólicas de núcleo pulposo en comparación con recubrimiento de fibronectina (86,4 y 19,6% en el día 1 y 5, respectivamente; $\Delta = -66,8\%$). Un revestimiento VIPCC, que comprende el mismo contenido de fibrinógeno y una relación de fibronectina:fibrinógeno en el intervalo de 1:5-1:10 y una mezcla purificada de fibronectina:fibrinógeno en una proporción de 1:10 fueron capaces de mitigar la disminución de células activas metabólicas observadas en el revestimiento de fibrinógeno. Este efecto fue especialmente pronunciado en el recubrimiento VIPCC. Estos resultados confirman los resultados anteriores y muestran las ventajas de utilizar VIPCC como un revestimiento para las células de núcleo pulposo en lugar de una mezcla pura de fibronectina/fibrinógeno. Por lo tanto, un andamio para la ingeniería de tejidos de núcleo pulposo preparado con VIPCC activado puede ser superior a los preparados con fibronectina/fibrinógeno activado puro.

Ejemplo 6:

Efecto de los niveles de fibronectina y fibrinógeno en el porcentaje de células de núcleo pulposo y anillo fibroso metabólicamente activas.

[0184] El presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de los niveles de fibrinógeno y fibronectina en el porcentaje de células de núcleo pulposo y anillo fibroso cultivadas metabólicamente activas. Para este propósito, se prepararon células derivadas del núcleo pulposo y anillo fibroso como se describe en el Ejemplo 1. Una placa de fondo plano de 96 pocillos se recubrió con 30 µl de fibronectina/fibrinógeno-recubrimiento. El revestimiento se compone de una cantidad constante de fibronectina (0,626 µg) y cantidades crecientes de fibrinógeno purificado como sigue: 0,3,13 (una proporción de 1:5), 6,26 (una proporción de 1:10), 12,5 (una proporción de 1:20) y 146 µg (una proporción de 1:233). Otro conjunto de experimentos se realizaron en fibronectina/fibrinógeno de recubrimiento compuesto de una cantidad constante y alta de fibrinógeno (9,125 µg) y cantidades crecientes de fibronectina purificada como sigue: 0,0313 (una proporción de 1:291), 0,042 (una proporción de 1: 217), 0,0626 (una proporción de 1:145) y 0,125 µg (una proporción de 1:73).

[0185] Las soluciones se dejaron secar en un flujo laminar en condiciones estériles y suspensión celular de 100 µl (que contiene 1×10^4 células por pocillo para ambas preparaciones de células) se colocó en los pocillos.

[0186] El cultivo se incubó durante 4 h y el medio de crecimiento (DMEM/ medio F12 de Ham suplementado con los antibióticos mencionados anteriormente y 10% FBS) fue sustituido para eliminar las células no unidas. Los cultivos se incubaron durante 24 horas adicionales en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ y 95% de aire a 37°C. El efecto de fibrinógeno en la unión celular se evaluó en los días 7, 10-13 y 16 mediante el ensayo XTT como se describe anteriormente. La intensidad de la absorbancia es proporcional a la cantidad de células activas metabólicas. Los resultados se presentan como porcentaje de la intensidad de absorbancia de fibronectina (100%). Los datos se presentan como media $\pm$ S.D. de al menos tres experimentos separados (en cada experimento las células fueron cosechadas a partir de tres vértebras de cerdos diferentes).

[0187] La figura 5 muestra el porcentaje de células de núcleo pulposo metabólicas activas en una cantidad constante de fibronectina y el aumento de cantidades de fibrinógeno en la matriz de revestimiento (A) y en una cantidad constante y alta de fibrinógeno y el aumento de cantidades de fibronectina en la matriz de revestimiento (B). Los resultados en la Fig. 5A muestran que a una cantidad constante de la fibronectina, el aumento de las cantidades de fibrinógeno a la cabeza de revestimiento a una disminución en el porcentaje de células activas de núcleo pulposo metabólicas. Células de anillo fibroso se vieron menos afectadas por la adición de fibrinógeno (resultados de cultivos de condrocitos de anillo fibroso no se muestran). Cantidades aumentadas de fibronectina en presencia de una concentración de fibrinógeno fija no mejoraron el porcentaje de las células de núcleo pulposo activas metabólicas. Además, los resultados están en línea con los resultados anteriores que indican que la relación de fibronectina:fibrinógeno de aproximadamente 1:5 es más adecuada para la unión de las células de condrocitos de núcleo pulposo en comparación con otras proporciones de fibronectina:fibrinógeno.

Ejemplo 7:

Efecto de una construcción tridimensional preparada con VIPCC activado en la morfología y la función de los condrocitos cultivados en la construcción.

[0188] Los estudios (Haudenschild et al "Differential expression of multiple genes during articular condrocyte

redifferentiation" Anat Rec 2001; 263: 91-98; Li et al. "Condrocyte phenotype in engineered fibrous matrix is regulated by fiber size". Tissue Eng 2006; 12: 1775-1785; Peretti et al. "A biomechanical analysis of an engineered cell-scaffold implant for cartilage repair". Ann Plast Surg 2001; 46: 533-537) indican que la expansión de resultados de condrocitos in vitro en los cambios de fenotipo, y en una disminución de la síntesis de proteoglicanos. Los ejemplos anteriores muestran que VIPCC tiene una relación de fibronectina:fibrinógeno de aproximadamente 1:5 es más adecuado para células de núcleo pulposo en crecimiento. Por lo tanto, el presente experimento fue dirigido para determinar la morfología de las células de condrocitos cultivados en una matriz tridimensional compuesta de VIPCC activado. Para este propósito, 750 µl de anillo fibroso o suspensión de células de núcleo pulposo se preparó usando un VIPCC diluido en 5 veces, que contiene 14 mg/ml de fibrinógeno coagulable. Para activar el componente VIPCC y formar un coágulo, la suspensión mencionada anteriormente se colocó de forma simultánea con un volumen equivalente de solución de trombina (2 IU, Omrix biopharmaceuticals LTD, IL) en una placa de cultivo de placa de 6 pocillos. Una construcción de condrocitos tridimensional se formó, conteniendo 6×10^5 células por pocillo.

[0189] Después de la formación del coágulo del constructo celular se complementó con 0,5 ml de medio DMEM/F12 de Ham que contiene los antibióticos mencionados anteriormente y 10% de FBS. La placa se cultivó a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂. Después de 12 horas, se retiró el medio y algunas de las construcciones se separan de la pared lateral usando un bisturí con el fin de disminuir las condiciones de tensión. Construcciones adjuntas, las cuales fueron consideradas como cultivadas bajo condiciones de alta tensión, sirvieron como grupo de control. Los constructos se cultivaron en medio DMEM/F12 de Ham que contiene los antibióticos mencionados anteriormente y 10% de FBS y se incubaron durante otros 8 o 14 días, para anillo fibroso o núcleo pulposo, respectivamente. El medio se desechó y los cultivos se fijaron con solución de paraformaldehído al 3,7% durante 10 minutos, y se tiñeron con azul alciano (Sigma; n° de cat A5268) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tinción con azul alciano está diseñada para mostrar mucopolisacáridos o glicosaminoglicanos (GAG) producen característicamente por los condrocitos. El sulfato de condroitina, que pertenece a la familia de los GAG, se encuentra generalmente en forma de proteoglicanos, que comprende la sustancia fundamental en la matriz extracelular del tejido de cartílago.

[0190] Los resultados se resumen en la Fig. 6 y muestran la tinción con azul alciano tanto en el anillo fibroso (Fig. 6, panel superior) y condrocitos de núcleo pulposo (Fig. 6, panel inferior). Los resultados demuestran que tanto condrocitos de anillo fibroso como de núcleo pulposo son funcionales y capaces de fabricar el sulfato de condroitina. Los andamios independientes (Fig. 6B y D) exhiben fenotipo filamentosos y ramificado similar mientras que andamios adjuntos y más tensos (Fig. 6A y C) asumen un fenotipo de esfera. Por lo tanto, los resultados demuestran que los condrocitos cultivados en un andamio tridimensional de VIPCC activado son funcionales y que la tensión del andamio formada influye en la diferenciación fenotípica.

Ejemplo 8:

El efecto de diferentes formulaciones tridimensionales preparados con VIPCC activado en la capacidad condro-conductora del VIPCC.

[0191] El objetivo del presente experimento fue investigar el efecto de la formulación sobre la característica condro-conductora del VIPCC. La suspensión de condrocitos de núcleo pulposo aislada se preparó usando tres soluciones de VIPCC diluido (1:2,5, 1:5, 1:10, que contenía una concentración final de 28, 14 y 7 mg/ml de fibrinógeno coagulable, respectivamente) en medio DMEM/F12 de ham que contenía los antibióticos mencionados anteriormente. Después, las suspensiones mencionadas anteriormente se mezclaron con un volumen equivalente de componente de trombina (1 UI/ml, se describe en US-B-6121232). El volumen final de las construcciones fueron 30, 60 o 90 µl con una dilución VIPCC final de 1:5, 1:10 o 1:20 y de 0,5 UI de trombina/ml. Todas las diluciones contenían $1,6 \times 10^5$ células de núcleo pulposo. Cada mezcla se colocó en el centro de un pocillo de una placa de cultivo de placa de 24 pocillos. Después se formó un coágulo, 200 µl de una mezcla compuesta de 0,5 trombina UI/ml y 20 veces VIPCC diluido, se añadió a la circunferencia. Después de la formación del coágulo (aproximadamente 30 minutos), 0,5 ml de medio de crecimiento (medio DMEM/F12 de Ham suplementado con antibióticos y 10% de FBS) se añadió y la placa se incubó a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ durante 22 días. La característica condro-conductora del VIPCC se evaluó mediante la evaluación de la capacidad de los condrocitos de núcleo pulposo para transmigrar a partir del constructo [(compuesto de diferentes diluciones de VIPCC y diferentes volúmenes (30, 60 o 90 µl)] para el andamio periférico de VIPCC. Después de 22 días de cultivo el medio se desechó y los cultivos se fijaron con solución de paraformaldehído al 3,7% durante 10 minutos, y se tiñeron con azul alciano durante 10 minutos a temperatura ambiente. Mediante el control de la localización de las células en la placa se encontró que la migración se produjo exclusivamente en los volúmenes 60 µl de 10 veces VIPCC diluido activado (que contiene 7 mg/ml fibrinógeno coagulable) Fig. 7 muestra la migración de los condrocitos de núcleo pulposo como se observa bajo el microscopio con una ampliación de X100 en el volumen de 60 µl de 10 veces de VIPCC diluido activo (panel izquierdo; las células alinearon y formaron una estructura en forma de cinta) en comparación con los condrocitos de núcleo pulposo en volumen de 30 µl de 20 veces de VIPCC activado diluido que no pudieron migrar (derecha). Además, los condrocitos en todos los grupos experimentales fueron capaces de proliferar en el constructo central y eran capaces de producir sulfato de condroitina (resultados no mostrados). Estos resultados muestran que los condrocitos de núcleo pulposo detectan un gradiente quimiotáctico y

transmigración se produce sólo en presencia de un gradiente químico.

Ejemplo 9:

5 Biocompatibilidad del VIPCC en la inyección de disco intervertebral.

[0192] El ejemplo anterior muestra que VIPCC es adecuado para su uso con células de núcleo pulposo. Por lo tanto, VIPCC se puede utilizar para el cultivo de células de núcleo pulposo ex-vivo o puede ser inyectado en el espacio de disco intervertebral para promover el crecimiento de las células de núcleo pulposo in vivo. El siguiente experimento fue diseñado para investigar la biocompatibilidad de VIPCC de Omrix comercial activado por inyección en el espacio del disco intervertebral. Para este propósito, VIPCC y trombina se inyectaron en el disco intervertebral de un cerdo.

[0193] La cerda femenina ($n = 1$) con un peso de 74 kg y en la edad de 6 meses fue alojada en una instalación autorizada de acuerdo con los requisitos éticos actuales. La anestesia fue inducida con una mezcla de ketamina intramuscular de (10 mg/kg) y xilazina (2 mg/kg).

[0194] Una exploración física se llevó a cabo antes del procedimiento quirúrgico (peso corporal, temperatura, frecuencia cardíaca y respiratoria). ECG, pulso y presión arterial se monitorizaron durante el procedimiento.

[0195] El procedimiento quirúrgico: El animal fue colocado lateralmente y doblado hacia adelante. Un agente de contraste se utilizó y se sirve como una guía visual para localizar la cavidad IVD utilizando fluorografía. El agente de contraste utilizado fue de yodo (0,37 g/ml de yodo; Tel Hashomer, IL). Las inyecciones se preformaron usando una jeringa conectada a aguja espinal 23G de 90 mm ("phoenix" Kobayashi Shoji K.K Tokio, Japón).

[0196] Con el fin de practicar el procedimiento de inyección, vertebrados torácicos IVDs 10-11 (T_{10} - T_{11}) se llenaron con yodo diluido (1:1 con solución salina).

[0197] Una vez que el procedimiento de inyección era satisfactorio, la secuencia de inyecciones IVD era la siguiente:

1. IVD L₁-L₂ y L₃-L₄ se inyectó a ~ 200-300 µl de solución salina.
2. IVDs L₂-L₃ y L₄-L₅ fueron inyectados con VIPCC y trombina (descritos en US-B-7125569) aplicada
3. simultáneamente (cantidad similar en el volumen total de ~ 200-300 µl) utilizando un dispositivo de inyección Omrix para formar un gel sólido.

[0198] Antes de cada inyección, una cantidad muy pequeña (presente en la punta de la aguja) de agente de contraste diluido 1:10 se inyectó en el espacio IVD con el fin de verificar el sitio de aplicación exacta (una pequeña cantidad se inyectó de manera que suficiente espacio intradiscal se dejó por inyección activada por VIPCC).

[0199] La Fig. 8 muestra una imagen de control de fluorografía (A; solución salina) y discos intervertebrales inyectados por VIPCC activado (B). El agente de contraste se volvió invisible en IVD inyectado por VIPCC activado.

[0200] Las fotografías y grabaciones de vídeo digitales fueron tomadas después del procedimiento de inyección.

[0201] El cuidado post-operatorio: El animal recibió analgésicos no esteroideos (30 mg/kg dipiron) y antibióticos (0,02 ml/kg marbocilo) durante los primeros 2 días después de la operación. El animal fue hospitalizado durante 14 días y una observación de actividades ambulatorias (por ejemplo, de pie, caminando), patrones de beber y comer y características de comportamiento fueron monitoreadas. Durante el periodo de observación los animales bebieron y comieron normalmente. En los primeros seis días, se mejoró la capacidad del animal para despertarse. El animal mostró la debilidad de las patas traseras y cruzó las piernas al caminar. Para el sexto día, el animal era capaz de caminar de manera constante. No se detectó la fiebre durante el periodo de observación. En el día 13 el peso del animal fue de 77,5 kg (ganó 4,5 kg).

[0202] La recogida de muestras: El animal fue sacrificado 14 días después de la cirugía y la columna lumbar se retiró para el análisis histológico.

[0203] La columna vertebral de madera aislada inyectada no mostró ningún signo de daño o inflamación en el tejido circundante (Fig. 9).

[0204] Las muestras IVDs inyectadas fueron aisladas, de acuerdo con el procedimiento anterior (Ejemplo 1), y descalcificadas en 8% de ácido fórmico hasta que el tejido era lo suficientemente suave para la evaluación histológica.

[0205] Fig. 10 muestra control de solución salina inyectado (A) y muestras IVDs descalcificadas (B) de VIPCC activado inyectado. Evaluaciones histológicas fueron hechas por tinción con hematoxilina y eosina de la región del

núcleo pulposo. Control de solución de salina inyectada IVD mostraron grupos de condrocitos con un daño necrótico típico, núcleos picnóticos y cariólisis (Fig. 11A, 13A). IVDs inyectados de VIPCC activado mostraron grupos de condrocitos viables en la región periférica con una estructura de citoplasma típicamente vacuolado (Fig. 11B, 13B). La región central del núcleo pulposo mostraba una coloración intensa en comparación con la región periférica en ambos grupos experimentales (Fig. 12A-control y inyecciones de VIPCC activado por B). En el grupo de control, las diferencias fueron más pronunciadas. El color de baja intensidad en la región periférica indica una estructura normal con los racimos celulares dispersos, mientras que el color intenso presenta células necróticas. Los resultados arriba mostrados indican que la inyección con VIPCC activado no da ningún cambio estructural como resultado y conserva la estructura típica de los tejidos de los condrocitos.

Ejemplo 10:

Efecto de un andamio tridimensional preparado con VIPCC activado en la morfología y la función de los condrocitos de núcleo pulposo en un IVD cultivo de órganos ex-vivo.

[0206] El objetivo del experimento era el de determinar la morfología y la funcionalidad de los condrocitos de núcleo pulposo cuando está dispuesto en Omrix comercial de constructo de VIPCC activado dentro de una IVD aislada.

[0207] Dos espinas lumbares de cerdo (L1-L6) se utilizaron en este experimento, una para recoger células y la otra para la obtención de los DIV separadas que carecen de tejido del núcleo pulposo.

[0208] La primera columna se esterilizó como se describe en el Ejemplo 1 y los cuerpos vertebrales fueron disecados en el medio de modo que se podían obtener los discos intervertebrales aislados. A continuación, las células se recogieron como sigue: 250 µl de solución de digestión que contiene 6 mg/ml de collagenasa y 2 mg/ml de hialuronidasa en PBS (Sigma nº de cat C-6885 y H-2126, respectivamente) se inyectó en el tejido de núcleo pulposo usando una jeringa de 1 ml conectada a la aguja 16G. Los discos intravertebrales que contienen la solución de digestión se incubaron a 37°C durante 1 h. Después del período de incubación, se extrae el tejido del núcleo pulposo digerido y la viabilidad se evaluó usando el método de exclusión con colorante azul Trypan como sigue: 80 µl de solución de azul de tripano (Sigma nº de cat T8154; 0,15% diluido en PBS) se mezcló con 20 µl de suspensión de células y la viabilidad celular se midió usando un hemocitómetro. La viabilidad celular se define por la relación entre el número de células viables para el número total de células. En todos los experimentos la viabilidad es superior al 80%.

[0209] La segunda columna se cortó en los órganos mediados vertebrales con una sierra eléctrica para huesos y el tejido de núcleo pulposo se aspiró con fuerza (0,2 - 0,5 ml) a través de una aguja 16G (sin el uso de enzimas proteolíticas) para obtener IVDs separadas que carecen de tejido del núcleo pulposo. Las células cosechadas anteriormente mencionadas (extraídas por una solución de digestión) se suspendieron en 20 veces VIPCC diluido (en DMEM/F12 de Ham suplementado con los antibióticos anteriormente mencionados) componente (5×10^5 células por ml) y se inyectaron simultáneamente con 1000 UI/ml solución de trombina (igual cantidad en el volumen total de ~ 200-500 µl) en los IVDs que carecen de tejido del núcleo pulposo a través de una aguja 16G unida a un dispositivo de inyección (Omrix, IL). Después se formó un coágulo, los IVDs inyectados se colocaron en una plataforma de plástico dentro de una caja plástica prellenada de con 1 cm PBS que contiene antibióticos (0,2% PenStrep). De esta manera se proporciona un ambiente húmedo (los IVD no tenían contacto directo con el PBS).

[0210] Los IVDs inyectados por células se incubaron a 37°C durante 2, 3 o 6 días. IVDs incubados durante 1 hora sirvieron como grupo de control. Después de la incubación, los discos se partieron en dos usando un escalpelo y el contenido de área de núcleo pulposo se retiró y se fijó con solución de formaldehído al 3,7% durante al menos 24 horas. Este paso fue seguido por inmersión en PBS (10 minutos x 3 veces). Las muestras se deshidrataron en una serie ascendente de alcoholes, 70%, 85%, 95% y 3 veces con 100% de etanol (20 minutos cada lavado), seguido por lavado en histoclear (Gadot Biochemical Industries Ltd. nº de cat L80033240) tres veces durante 30 minutos cada uno. A continuación, las muestras se colocaron en una mezcla 1:1 de histoclear y parafina y se calentó en un horno a 60°C durante 1 hora x 2. Las muestras se sometieron entonces a las siguientes inmersiones de parafina: 2 horas a 60°C, durante la noche a 60°C y dos veces a 60°C durante 2 h. El tejido se incrusta en casetes de histología de plástico llenos de parafina caliente y se deja enfriar a 4°C.

[0211] Los tejidos integrados en parafina se seccionaron en serie a 8 µm de espesor y se tiñeron para el uso de sulfato de condroitina de azul alciano como se ha descrito anteriormente. Para la contratinción rojo rápido nuclear se utilizó (Sigma nº de cat 8002) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0212] Fig. 14 muestra la morfología de las células de núcleo pulposo y la producción de sulfato de condroitina de condrocitos dispuestos en tres andamios dimensionales formados de VIPCC diluido de 20 veces y mezcla de trombina dentro de los discos intervertebrales aislados. Una evaluación histológica se realizó usando un microscopio de fluorescencia invertido 1 hora, 3 y 6 días después del procedimiento de inyección.

[0213] El grupo de control no mostró ninguna expresión de sulfato de condroitina en las células que rodean el

ambiente (Fig. 14A). La expresión de sulfato de condroitina puede verse desde el tercer día en adelante. En la tercer (Fig. 14 B) y sexto día (no mostrado) después de la inyección de una expresión significativa de sulfato de condroitina es evidente en todo el coágulo y alrededor de la célula. En el sexto día un gran espacio se observó en la zona que rodea a la célula, al parecer como resultado de un aumento en el número de células que conduce a la secreción de enzimas proteolíticas y, finalmente, a la lisis de la construcción (no se muestra).

[0214] Además, los resultados demuestran que las células de condrocitos supone un fenotipo redondeado típico en el andamio 3D formado de VIPCC activado en todos los puntos de tiempo después de la inyección (Fig. 14 B).

[0215] Estos resultados indican que el VIPCC activado apoya el crecimiento y la funcionalidad de la célula de núcleo pulposo que se inyecta dentro de los discos intervertebrales, permitiendo a las células mantener su ámbito como la morfología de tipo salvaje y para producir sulfato de condroitina.

Ejemplo 11:

Restauración de la altura del disco intravertebral usando VIPCC activado inyectable.

[0216] El núcleo pulposo es capaz de resistir cargas de compresión y el anillo fibroso es resistente a la tensión y da resistencia mecánica (Revell et al "Tissue engineered intervertebral disc repair in the pig using injectable polymers" J Mater LME Mater Med 2007; 18: 303-308). El siguiente ejemplo ilustra la capacidad de utilizar Omrix VIPCC activado comercial para resistir la carga de compresión y sustancialmente retener la altura original del disco. Con el fin de obtener discos intervertebrales aislados, cuerpos vertebrales lumbares de cerdo se cortaron en el medio utilizando una sierra eléctrica para huesos. Después, los discos intravertebrales aislados se aplanan utilizando una lijadora eléctrica para producir superficies lisas y paralelas simétricas superior e inferior. Los discos intravertebrales aisladas se colocaron en maquinas de ensayo de tensión y compresión (LF plus, LLOYD Instruments Ltd, Hampshire, Reino Unido) y se midió la compresión bajo cargas gradualmente crecientes (desde 25 hasta 500 N).

[0217] Cada disco intravertebral se midió a una carga de 10 N con el fin de determinar la altura de la muestra inicial, seguido de mediciones de compresión en 25 a 500 N. A continuación, los discos intravertebrales se vaciaron por inyección de una solución de digestión como se describe en el Ejemplo 10. A continuación, dos jeringas conectadas a las agujas 16G se aplicaron en los extremos opuestos del IVD aislado y hasta 2 ml de PBS se inyectó en el IVD. El espacio de disco se vació y se llenó varias veces y después se desechó el contenido de IVD. Este último procedimiento se llevó a cabo tres veces. Este procedimiento se repitió una vez utilizando aproximadamente 2 ml EDTA (10 mM; Riedel-de-Haen nº de cat 34549). Posteriormente, la compresión de los discos vacíos se midió bajo cargas cada vez mayores. La compresión en 500 N se consideró como el posible valor de compresión máxima. Los discos vaciados se pincharon dos veces utilizando una aguja 16G que resulta en un total de 4 orificios 16G.

[0218] Los discos vacíos perforados fueron inyectados con PBS o VIPCC y trombina (aplicado simultáneamente en volúmenes equivalentes; OMRIX biopharmaceuticals LTD IL) usando el dispositivo de inyección Omrix. Las soluciones se inyectaron en las perforaciones existentes hasta que el exceso de solución se derrame fuera del sitio de la inyección. Los discos intravertebrales rellenos se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Tras el período de incubación, las mediciones de compresión del disco lleno se llevaron a cabo en las diferentes cargas. Todas las mediciones se repitieron 5 veces.

[0219] La figura 15 demuestra el porcentaje de compresión de disco bajo carga de fuerza creciente del disco sin tratar, disco vacío, y discos rellenos (PBS o VIPCC y trombina). Los resultados se expresan como la delta en compresión a una carga específica (compresión de disco no tratado bajo carga 10 N - compresión de disco relleno bajo carga XN) se dividen al valor posible de compresión máxima de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{Compresión de disco no tratado bajo carga de 10 N}) - (\text{Compresión de disco relleno bajo carga de X N})}{(\text{Compresión de disco vacío bajo carga de 500 N}) - (\text{Compresión de disco vacío no tratado bajo carga de 10 N})} \times 100$$

[0220] Fig 16 demuestra la recuperación de la altura de los discos inyectados con VIPCC o PBS activado. Los resultados se basan en mediciones mostradas en la Fig. 15 (compresión bajo 500 N). Los resultados se presentan como porcentaje de la compresión máxima posible de disco no tratado en 500 N de carga en el mismo experimento (100%) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{Compresión de disco no tratado bajo carga de 500 N}) - (\text{Compresión de disco relleno bajo carga de 500 N})}{(\text{Compresión de disco vacío bajo carga de 500 N}) - (\text{Compresión de disco vacío bajo carga de 500 N})} \times 100$$

[0221] Los resultados demuestran que en todos los grupos analizados un aumento en la fuerza aplicada al disco dio lugar a un aumento de la compresión del disco. El comportamiento de compresión de discos inyectados de VIPCC

activado como una función del aumento de la fuerza es similar a los discos no tratados.

[0222] Los resultados también muestran que discos inyectados de VIPCC activado recuperaron su altura inicial en comparación con discos inyectados de PBS.

- 5 **[0223]** Esto muestra claramente que VIPCC activado puede funcionar para preservar la altura del disco normal y es capaz de resistir cargas de compresión como núcleo pulposo natural.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 1. Un kit que comprende: un primer recipiente que comprende concentrado de crioprecipitado de plasma inactivado viral (VIPCC) que tiene una fibronectina: concentración relativa de fibrinógeno de 1:10 a aproximadamente 1:5, un segundo recipiente que comprende una enzima capaz de formar fibrina cuando reacciona con fibrinógeno, y un tercer recipiente que comprende una enzima proteolítica seleccionada de entre el grupo que consiste en peptidasas de serina, peptidasas de cisteína, peptidasas de aspártico, peptidasas de metalo, hialuronidasa y combinaciones de los mismos.
10
2. El kit según la reivindicación 1, en el que la enzima proteolítica se selecciona del grupo que consiste en tripsina, quimotripsina, elastasa pancreática, papaína, quimopapaína, pepsina, colagenasa, gelatinasa, pronasa condroitinasa, hialuronidasa y combinaciones de las mismas.
15
3. El kit según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el kit comprende además un agente de contraste.
20
4. El kit según la reivindicación 3, en el que el agente de contraste es el yodo.
25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

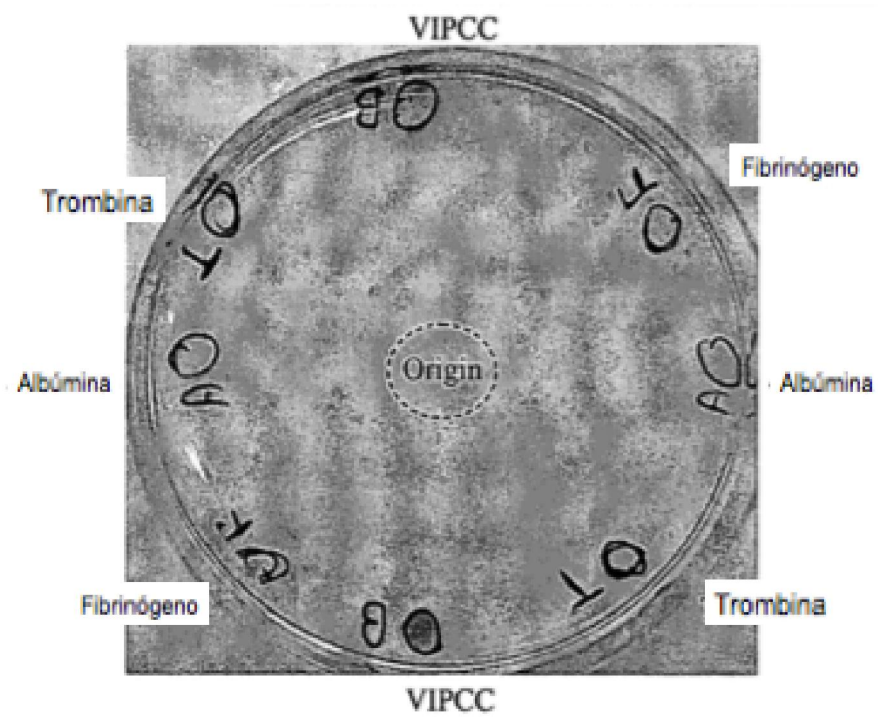


Fig. 1

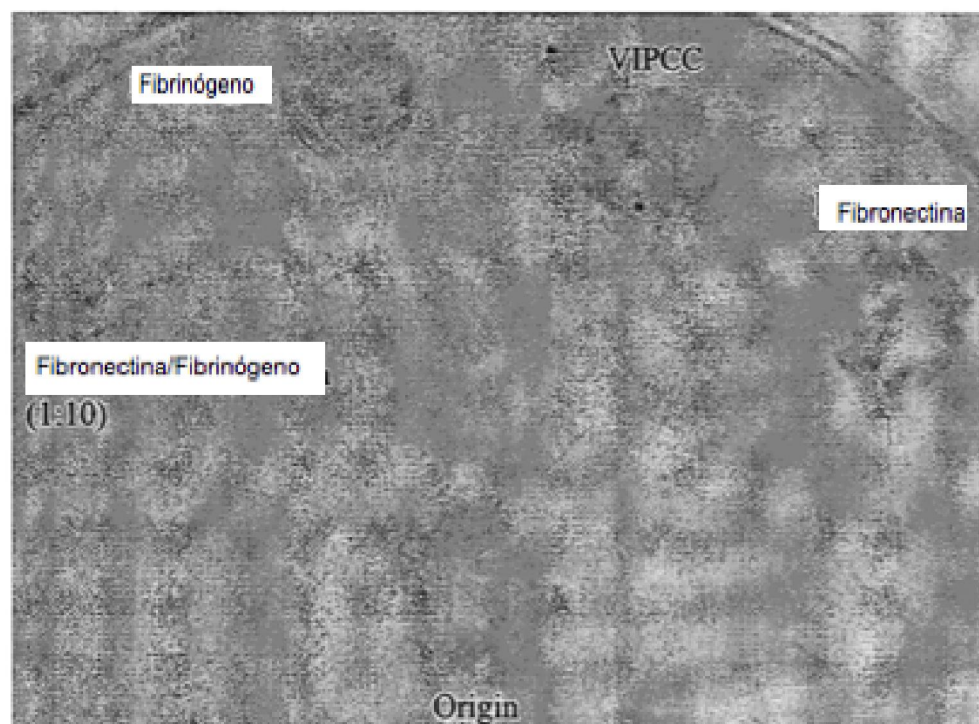


Fig. 2

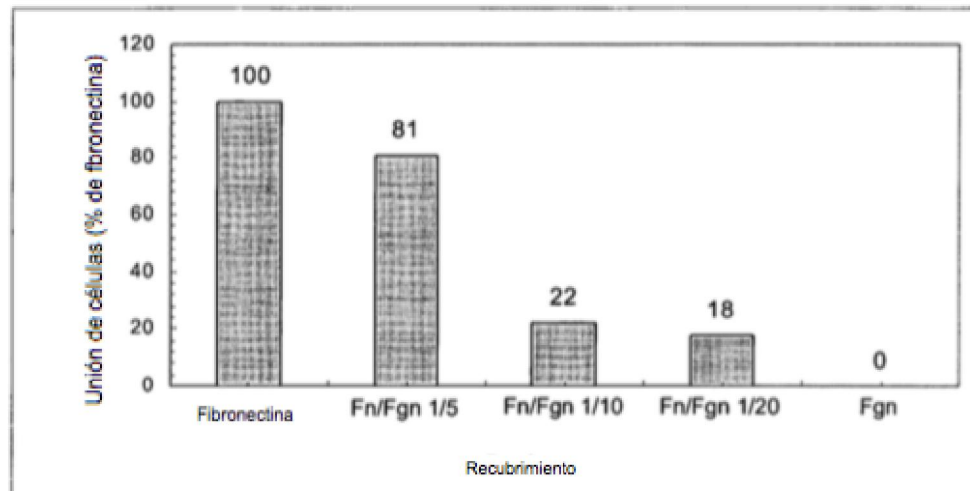


Fig. 3A

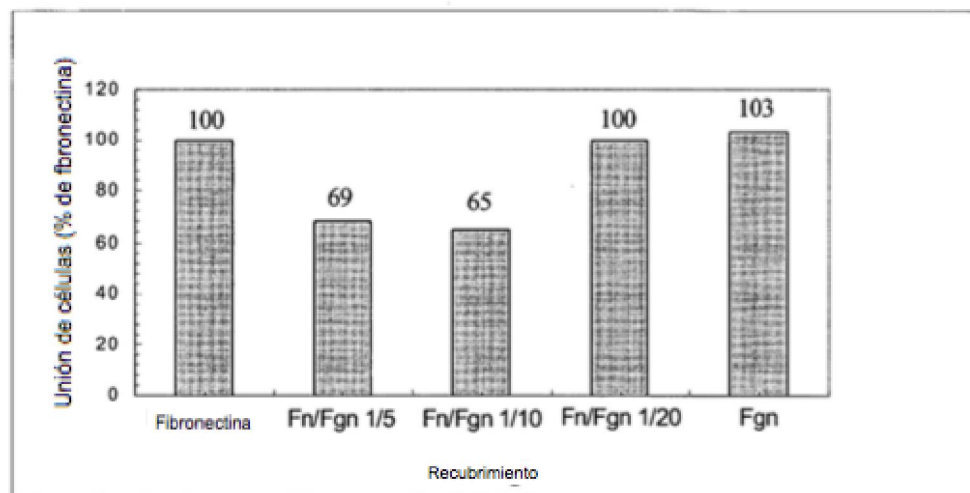


Fig. 3B

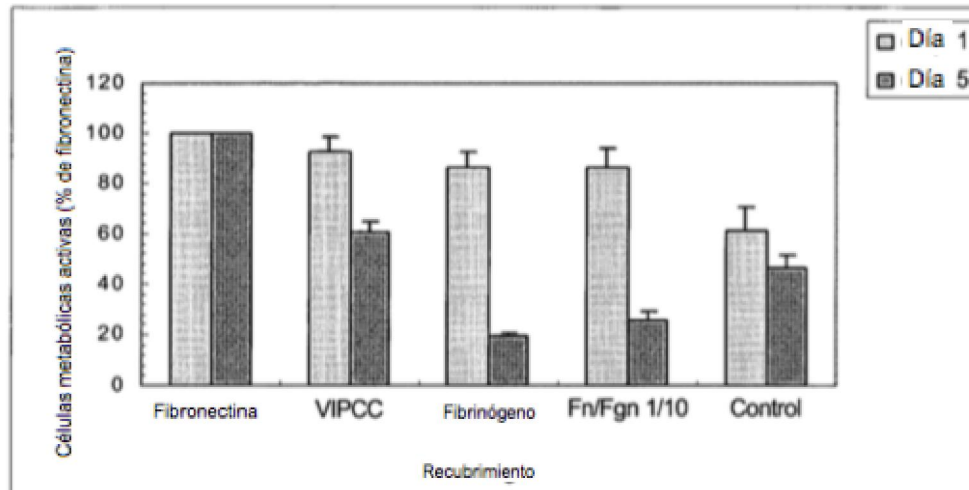


Fig. 4

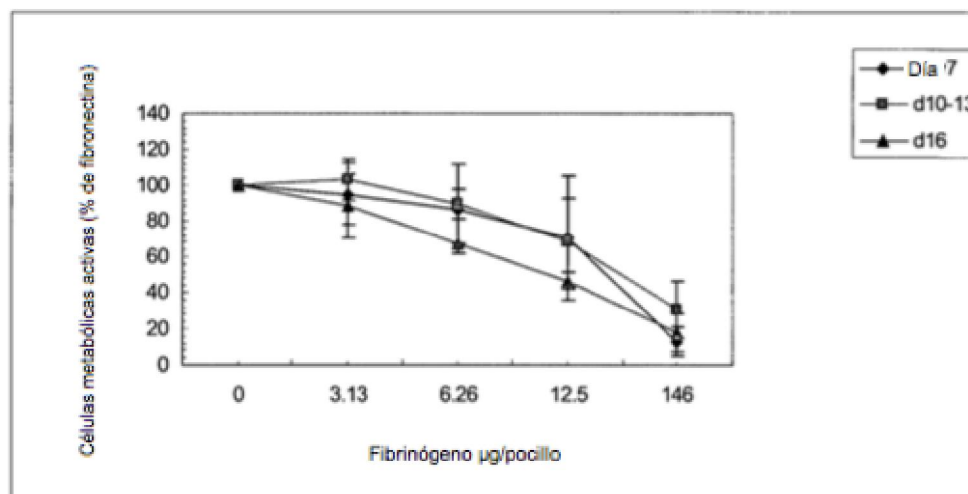


Fig. 5A

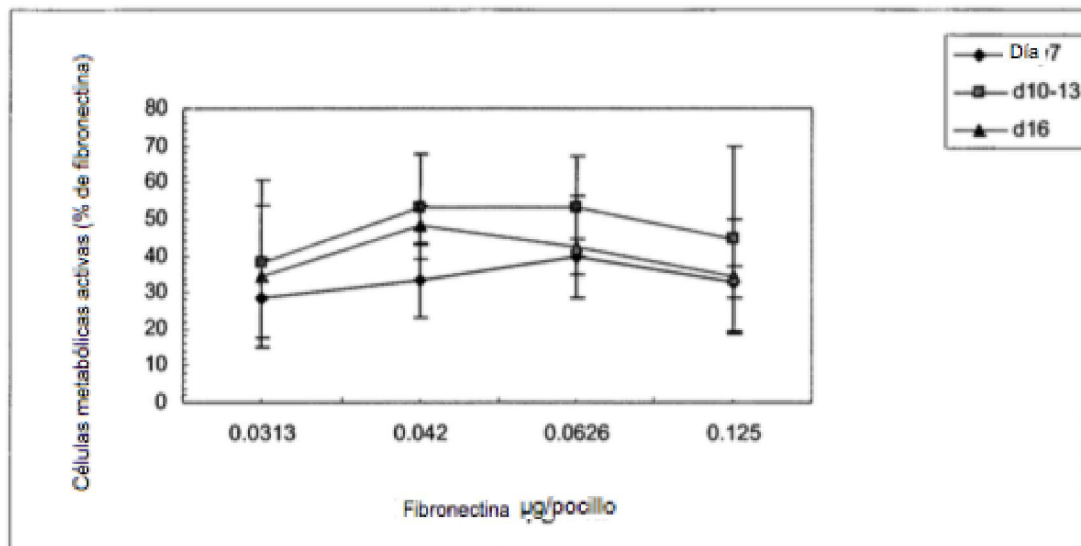


Fig. 5B

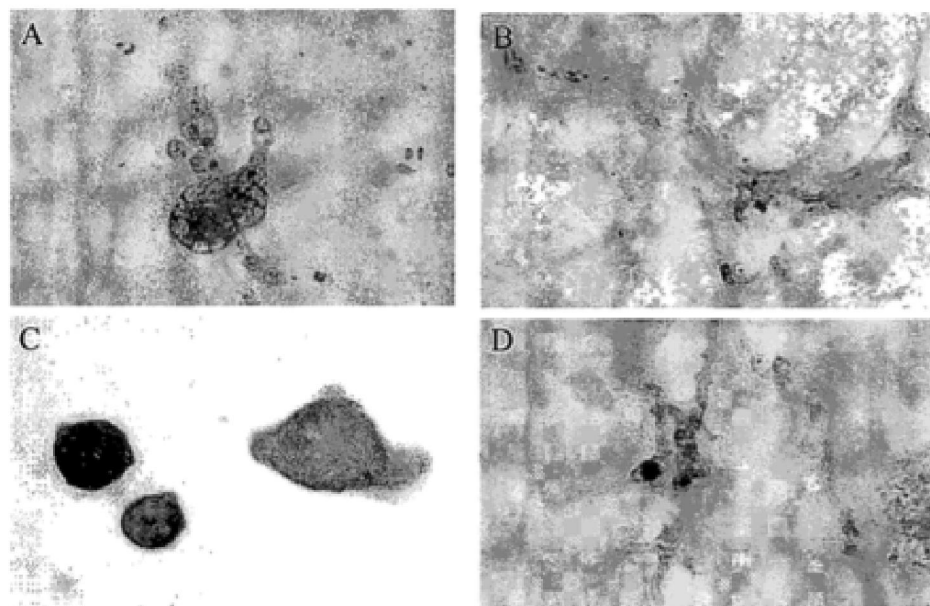


Fig. 6

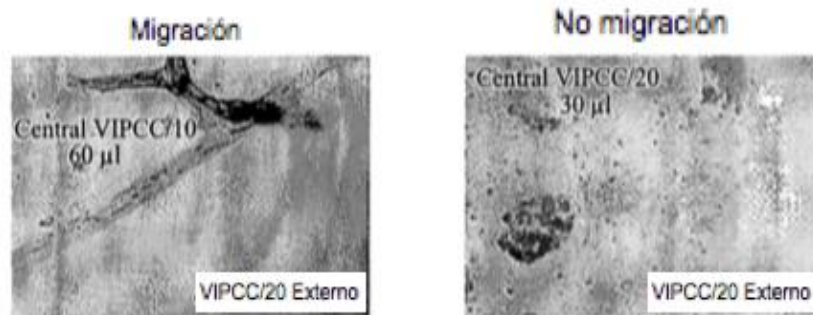


Fig. 7

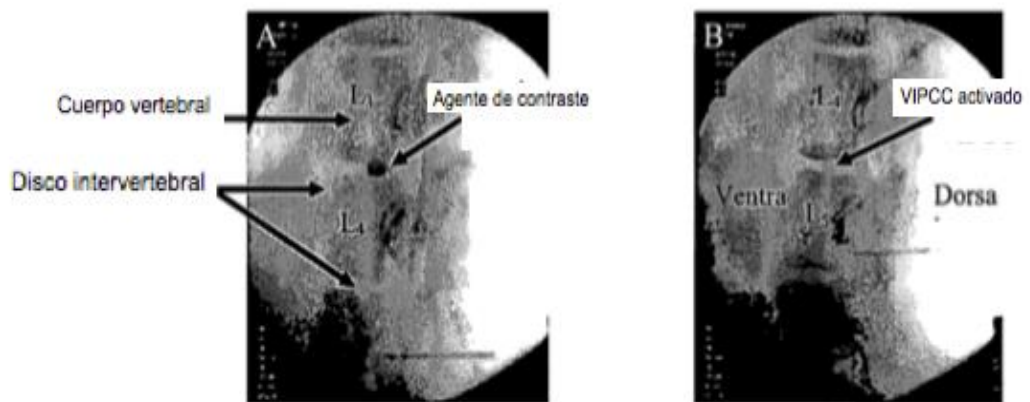


Fig. 8

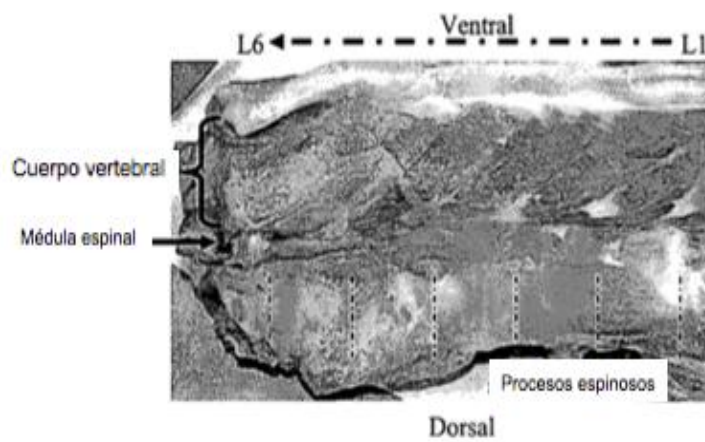


Fig. 9

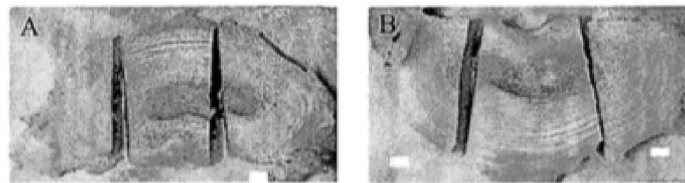


Fig. 10

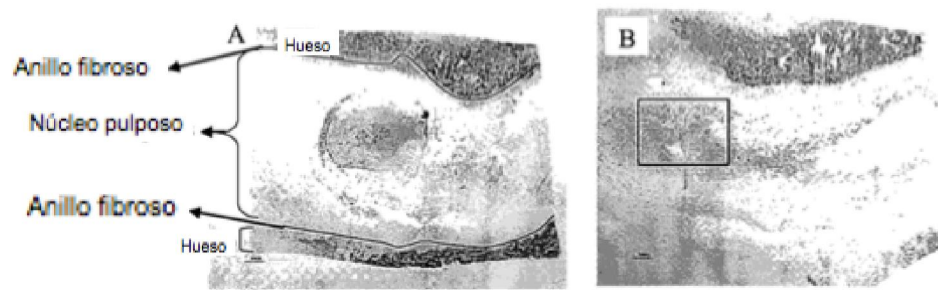


Fig. 11

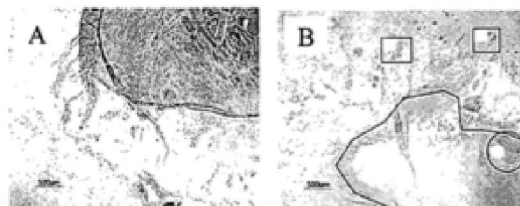


Fig. 12

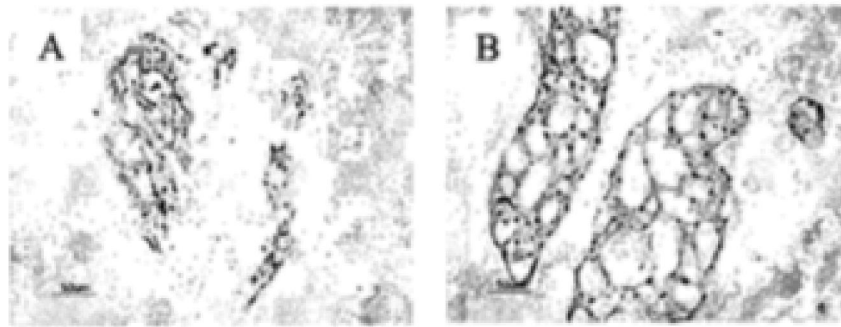


Fig. 13

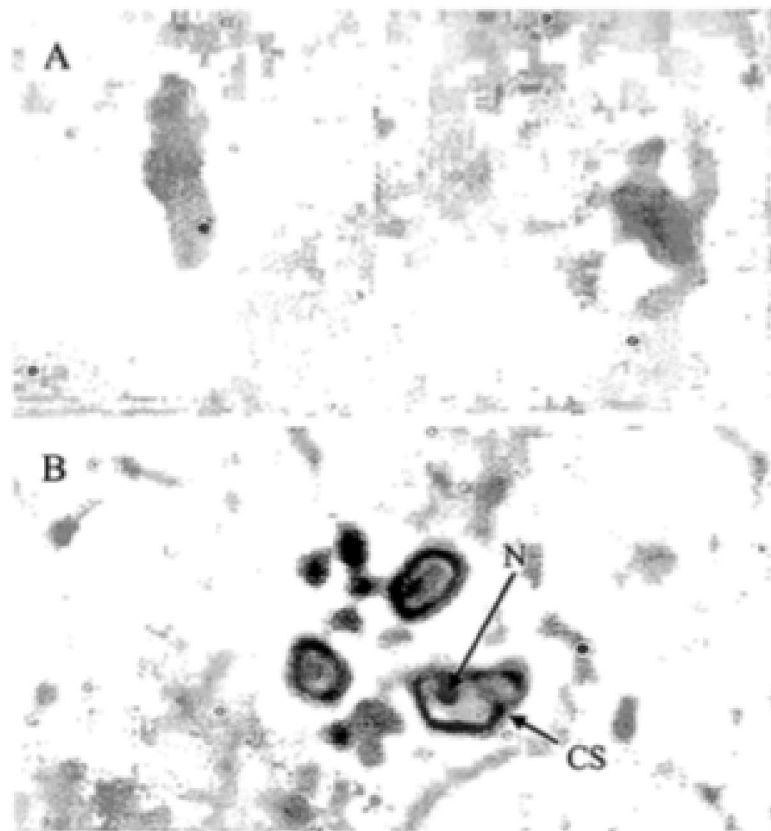


Fig. 14

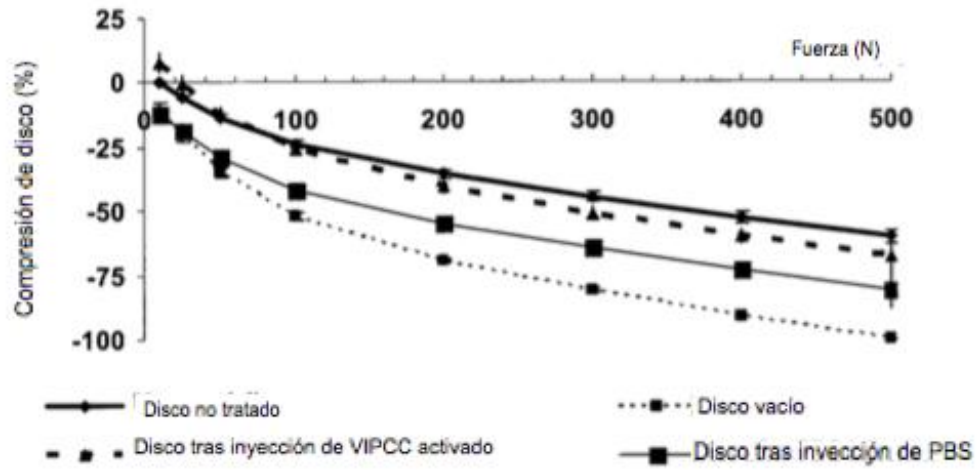


Fig. 15

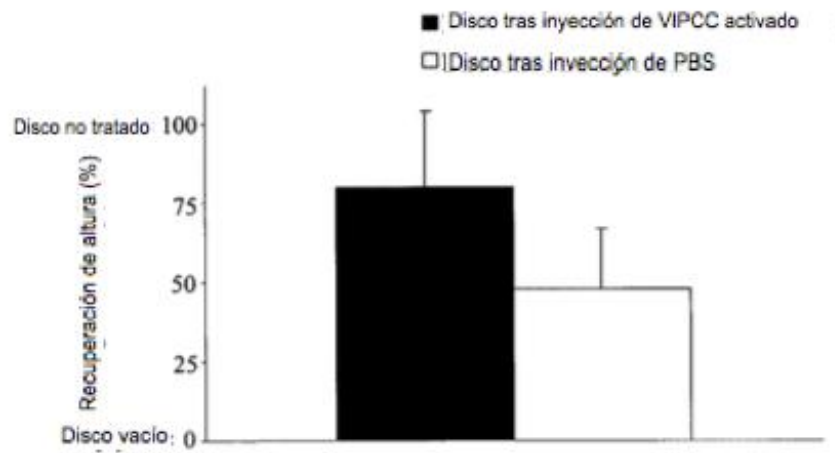


Fig. 16