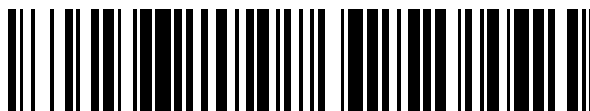


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 654**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/36** (2006.01)  
**A61L 27/54** (2006.01)  
**A61K 38/18** (2006.01)  
**A61K 38/30** (2006.01)  
**A61K 38/39** (2006.01)  
**A61L 15/18** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**C12N 5/077** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2007 PCT/SE2007/000875**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2008 WO08041909**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2007 E 07835077 (4)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2076589**

54 Título: **Un método de producción de componentes nativos, tales como factores de crecimiento o proteínas de la matriz extracelular, mediante cultivo celular de muestras de tejido para la reparación de tejido**

30 Prioridad:

**02.10.2006 SE 0602109**  
**02.10.2006 US 848399 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.07.2017**

73 Titular/es:

**ORTHOCELL LIMITED (100.0%)**  
**SOCIETE A RESPONSABILITE LIMITEE 3-5**  
**PLACE WINSTON CHURCHILL**  
**1340 R.C.S. LUXEMBOURG B 67.72, AU**

72 Inventor/es:

**LIDGREN, LARS**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 625 654 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Un método de producción de componentes nativos, tales como factores de crecimiento o proteínas de la matriz extracelular, mediante cultivo celular de muestras de tejido para la reparación de tejido

5

**Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a una composición médica, a un método de producción de una mezcla de componentes nativos, a un método de producción de dicha composición médica, a un método de tratamiento de un sujeto en necesidad de reparación de tejido, y al uso de dicha mezcla de componentes nativos para la producción de dicha composición médica para la reparación de tejido mediante inyección.

10

**Técnica anterior**

15 La sustitución o reparación de tejido dañado o perdido está entre las terapias médicas más caras y cuesta billones de dólares al año en todo el mundo. Hay una demanda cada vez mayor de nuevos métodos y materiales que puedan aplicarse en la ingeniería de tejido.

20 La experiencia de trasplantar células madre multiplicadas o células madre de donante específico en el cuerpo humano, por ejemplo en articulaciones, corazón, cerebro y órganos endocrinos, no ha sido satisfactoria en mostrar supervivencia a largo plazo significativa de las células trasplantadas. En algunos estudios, sin embargo, se ha informado de algún impacto sobre el crecimiento hacia adentro vascular y la reparación con reclutamiento celular y mejora clínica menor.

25 El motivo más obvio para el efecto a corto plazo informado de células madre trasplantadas sobre la reparación local (Gazit et al. 2006) es en opinión de los presentes inventores que las células trasplantadas durante su corto tiempo de supervivencia actúan de fábrica local de células que produce una cascada de factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular capaces de reclutar células madre progenitoras. Estudios recientes usando factores estimulantes de colonias para potenciar la generación de tejido local que recluta células madre locales o circulantes  
30 existentes fortalecen esta hipótesis. Se ha demostrado que el cerebro humano contiene células con propiedades similares a las células madre y una capacidad para generar nuevas neuronas a partir de células madre generadoras (Brederlau et al 2004). También se ha mostrado recientemente que la combinación de trasplantar células neuroprecursoras junto con factores de crecimiento individuales en médula espinal de rata lesionada en una fase aguda mejorará ligeramente la función nerviosa. No se observó el mismo efecto si el trasplante se llevó a cabo  
35 después de 8 semanas (Karima et al. 2006).

Se ha usado satisfactoriamente tejido de bio-ingeniería para fines de sustitución en un número limitado de aplicaciones clínicas, por ejemplo, en el tratamiento de defectos óseos, úlceras diabéticas y para roturas de tendones. El enfoque más satisfactorio ha sido seleccionar diferentes tipos de células que presentan la función y  
40 características del tejido de interés. Se ha informado de los mejores resultados a largo plazo en la rodilla para defectos condrales aislados usando autoinjertos, es decir, condrocitos cultivados en un biorreactor sobre un armazón usando, por ejemplo, una matriz tridimensional, un vellón de colágeno o hialuronano. Sin embargo, el triturar cartílago y distribuirlo sobre una matriz similar en un procedimiento de una etapa sin cultivo previo da resultados tan buenos como con la implantación de condrocitos autólogos. En ambos casos, un cartílago similar a  
45 hialino será el resultado. El implante se integrará frecuentemente mal con el cartílago de alrededor. Esto casi siempre da un tejido cicatricial que deja una fisura, en el área entre el cartílago sano y el trasplante (Yiling et al 2006).

En el documento WO2002/067762 A2 se describe una construcción de polímero de músculo para la ingeniería de  
50 tejido óseo, en la que se prepara un material de injerto de hueso que comprende un armazón de polímero cargado con proteínas morfogenéticas óseas y poblado con células de músculo para sintetizar tejido óseo.

En el documento US20050019419 se describe una composición de injerto de tejido que comprende membrana basal de hígado y un método de preparación de esta composición de injerto de tejido. La composición de injerto puede  
55 implantarse para sustituir o inducir la reparación de tejidos dañados o enfermos.

El documento US 6 096 347 describe el uso de tejido submucoso de un vertebrado de sangre caliente para fabricar una composición de injerto de tejido que induce la formación de tejidos cardíacos endógenos *in vivo* tras el contacto de los tejidos cardíacos con la composición fabricada.

60

El documento WO 01/14527 se refiere a una composición de medio acondicionado que contiene agentes de piel producidos de células cultivadas de piel y un agente de vehículo para administración tópica sobre la piel.

El documento US 2002/0049422 A1 desvela una composición tópica que comprende diferentes factores de  
65 crecimiento.

El documento WO 02/24219 se refiere a un complejo de proteína aislada que comprende una proteína de unión a factor de crecimiento, vitronectina y un factor de crecimiento, además de un implante quirúrgico y un medicamento de regeneración de piel que comprende dicho complejo.

- 5 El documento WO 00/69449 se refiere a productos que comprenden composiciones de medio de cultivo celular acondicionado y métodos de uso de los mismos. Las composiciones de medio celular acondicionado del documento pueden estar comprendidas de cualquier medio definido conocido y pueden ser acondicionadas usando cualquier tipo de célula eucariota.
- 10 Bilodeau, K., et al., Tissue Engineering, 2006, 12(8), pp. 2367-2383, se refiere a los principales tipos de biorreactores usados para la ingeniería de tejido y la regeneración, además de sus aplicaciones más comunes.

En vista del estado de la técnica todavía queda la necesidad de mejorar la sustitución y reparación de tejido dañado o perdido dentro del cuerpo de sujetos humanos y animales. Las solicitudes de reparación y sustitución de tejido dañado o perdido son amplias y las afecciones que va a tratarse son muchas.

Como será evidente de lo siguiente, la presente invención se refiere a resolver tales necesidades.

### Sumario de la invención

20 La presente invención se refiere a un método de producción de una mezcla de componentes nativos, incluidos en el grupo que consiste en factores de crecimiento, proteínas de la matriz extracelular y otras sustancias producidas por muestras de célula durante condiciones normales, que comprende las etapas de:

- 25 - añadir una o varias muestras de células diferentes de origen humano o animal y, en el que dichas muestras de células son o se originan de una biopsia de tejido de uno o más de los siguientes tejidos músculo, grasa, cartílago, piel, hueso, nervios, hígado y/o dientes, a un biorreactor que contiene un medio nutritivo, en el que se obtiene un medio de cultivo;
- 30 - cultivar las células durante condiciones normales, en el que el cultivo se lleva a cabo bajo condiciones rotatorias;
- extraer al menos una vez el medio de cultivo que incluye componentes nativos producidos durante el cultivo celular;
- separar los componentes nativos del medio de cultivo obteniendo así una mezcla de componentes nativos,

35 en el que dicho biorreactor tiene dos cámaras interconectadas separadas por un filtro millipore que permite que los componentes nativos producidos difundan en la segunda cámara y para la separación de las células del medio de cultivo que contiene componentes nativos en el biorreactor, y en el que la extracción del medio de cultivo que incluye los componentes nativos producidos tiene lugar a intervalos predeterminados y el medio de cultivo extraído se sustituye por medio nutritivo nuevo.

40 **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 representa una realización del método según la invención, en la que las células se toman de un cierto tipo de tejido y a partir de aquí se cultivan en uno o más biorreactores. Los componentes nativos producidos, tales como los factores de crecimiento y las proteínas de la matriz extracelular (GECM), se combinan entonces con un vehículo químicamente y mecánicamente optimizado, en el que se forma una composición médica. Esto se inyecta entonces en el tejido del huésped donde las células son reclutadas y se potencian la proliferación y diferenciación.

50 La Fig. 2 representa un vehículo con diferentes módulos de elasticidad que se impregnan o precargan con los componentes nativos, tales como GECM producidos según la invención.

### Descripción de realizaciones preferidas de la invención

55 En una realización, el método según la invención comprende además la liofilización de los componentes nativos separados tales como GECM. Puede usarse cualquier método de liofilización convencional conocido para un experto en la materia.

60 Según la presente invención, cada muestra de células es o se origina de una biopsia de tejido de un sujeto humano o animal. Ejemplos de sujetos animales de los que puede tomarse la biopsia de tejido son preferentemente cerdos, vacas y cabra. La biopsia de tejido se toma preferentemente de, pero no se limita a, uno o más de los siguientes tejidos: músculo, grasa, cartílago, piel, nervios, hígado, hueso y/o dientes.

65 En el presente contexto, la expresión "biopsia de tejido" pretende ser una biopsia tomada de cualquier tejido en el cuerpo eliminando directamente la muestra deseada y añadiendo la muestra directamente al biorreactor. Preferentemente, la biopsia de tejido puede ser picada, degradada enzimáticamente, tratada o enriquecida antes de añadirla al biorreactor.

5 En el presente contexto, la expresión "muestra de células de origen humano o animal" pretende significar una muestra de células tomada de un ser humano o animal. Las células que van a cultivarse podrían ser específicas para diana para, por ejemplo, un articulación, cartílago elástico en la oreja, nervios, músculos abductores de la cadera, tendones de la fascia lata, piel de la parte superior del brazo y células mesenquimatosas de la cresta ilíaca, etc.

10 En el presente contexto, la expresión "una o varias muestras de células diferentes" significa que puede usarse una muestra de células específica de un cierto tejido en la etapa de cultivo celular posterior. También puede usarse más de una muestra de células, es decir, dos o más muestras de células de tejidos diferentes, por ejemplo una muestra de células de músculo y una muestra de células de cartílago, etc., pero solo en situaciones específicas o cuando los tejidos diferentes tengan efectos estimulantes adicionales.

15 En el presente contexto, la palabra "biorreactor" pretender ser un biorreactor convencional disponible para cultivar células. Un experto en la materia puede seleccionar fácilmente un reactor conocido que va a usarse en el método de la invención.

20 En una realización, se hace uso de un biorreactor con dos o más cámaras interconectadas separadas por un filtro millipore que permite que los componentes nativos producidos, tales como factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular (ECM), difundan en la segunda cámara o tercera cámara, etc. A intervalos predeterminados, se extrae el medio de cultivo y los componentes nativos se separan y se liofilizan bajo condiciones estériles.

25 Los componentes nativos producidos pueden esterilizarse usando una cualquiera de varias técnicas de esterilización, por ejemplo por radiación  $\beta$  o  $\gamma$  a al menos 1,2 MRad; por filtración estéril, en la que el proceso completo incluyendo la liofilización y el envasado se realizan en un banco estéril; o usando gasificación con óxido de etileno (OE). Durante la operación de gasificación del envase, por ejemplo una bolsa, en la que se pone el producto médico tratado para el almacenamiento después de la liofilización, tiene que desgasificarse durante varias semanas, normalmente aproximadamente 4-6 semanas, en la que el óxido de etileno dentro del envase se fuga lentamente de las paredes del envase.

30 En el presente contexto, la expresión "medio de cultivo" debe distinguirse de "medio nutritivo". El medio nutritivo es el medio fresco con todos los nutrientes necesarios requeridos para el crecimiento de las células, antes de que se hayan añadido las células. Una vez se han añadido las células al medio nutritivo, el medio se considerará un medio de cultivo con las células incluidas, además de los componentes nativos producidos durante el cultivo celular. Cuando se extrae el medio de cultivo que incluye los componentes nativos, las células normalmente no están presentes en el medio de cultivo, ya que ya han sido separadas del medio de cultivo en el biorreactor con las dos cámaras interconectadas. Sin embargo, es posible que partes de las células y un pequeño número de células estén incluidos en el medio de cultivo después de la filtración. Alternativamente, en otra realización, las células están incluidas en el medio de cultivo cuando se extraen del biorreactor y a partir de aquí se separan del medio de cultivo por cualquier medio convencional.

40 En el presente contexto, la expresión "medio nutritivo" significa un medio nutritivo como se usa en su contexto convencional, es decir, un medio tal como DMEM o medios de crecimiento específicos adecuados para diferentes células y líneas celulares, que permite el crecimiento de células y para la producción de los componentes nativos. El medio nutritivo debe proporcionar ciertas condiciones, tales como hormonas o factores de crecimiento que normalmente se producen *in vivo*. La elección del medio nutritivo depende de la dirección deseada de crecimiento celular y las células usadas. Sustancias que pueden estar presentes en el medio nutritivo son factores de crecimiento, nutrientes tales como glucosa u otros azúcares según se necesite. Otras sustancias que pueden incluirse en el medio nutritivo son, por ejemplo, antibióticos.

50 En el presente contexto, la expresión "condiciones normales" se usa para definir el entorno en el que las células proliferan y permanecen viables en el mismo o esencialmente el mismo modo que en su entorno natural tal como en el cuerpo humano o animal. Un experto en la materia está familiarizado con lo que se indica por condiciones normales y es capaz de fijarlas durante el cultivo. En otra realización, la muestra de células es una línea celular específica. La línea celular puede estar comercialmente disponible. Cualquier línea celular conocida que esté comercialmente disponible puede usarse según la invención y un experto en la materia puede seleccionar fácilmente cualquier línea celular adecuada para producir los componentes nativos según se requiera por la aplicación definitiva. La ventaja de uso de una línea celular comercialmente disponible es que los muchos componentes nativos diferentes de origen diferente pueden producirse y guardarse. Por ejemplo, cuando un paciente necesita sustitución o reparación de tejido inmediata debido a tejido dañado o perdido, tal como infarto cardíaco o hemorragia cerebral, los componentes nativos guardados producidos por las líneas celulares comercialmente disponibles pueden usarse directamente inyectando la composición médica que comprende los componentes nativos con el vehículo deseado, si se necesita. En algunos casos, el acceso inmediato a los componentes nativos y el vehículo se requiere dentro de los primeros días o semanas tras una emergencia o lesión aguda. Hoy en día hay líneas celulares comerciales que podrían usarse para la extracción repetitiva de los componentes nativos, proporcionándolos así instantáneamente en situaciones de emergencia. Podrían usarse marcadores específicos, tales como TGF-beta y IGF-1 y proteínas de la matriz extracelular, como proteínas marcadoras para establecer la concentración. En estos casos, los componentes

nativos son de un tipo aloinjerto, es decir, no los propios componentes nativos del paciente.

En el presente contexto, la expresión "componentes nativos" pretende comprender todos los factores de crecimiento, todas las proteínas de la matriz extracelular (ECM) y todas las sustancias adicionales que se producen por las células en su entorno natural que incluyen polímeros nativos y otras proteínas. En el presente contexto, exactamente los mismos componentes se producen en un biorreactor como en el entorno natural de la célula específica. Dependiendo de los tejidos de los que se toman las células para el cultivo, hay probablemente cientos de diferentes proteínas, biopolímeros, y otras sustancias y moléculas, que se producen. Las proteínas de la matriz extracelular son, por ejemplo, pero no se limitan a, fibronectina, vitronectina, condroadherina y agreganos.

En una realización, es de interés producir y aislar solo factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular (ECM). La combinación de estos también se llama GECM (factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular). Estos son los más importantes de los componentes nativos, ya que proporcionan un equilibrio óptimo entre la regulación por disminución y la regulación por incremento del proceso de regeneración de tejido en el que van a implicarse. Sin embargo, en la práctica, todas las moléculas definidas por la expresión "componentes nativos" están automáticamente presentes en la mezcla o combinación obtenida y son eficaces para el posterior proceso de regeneración dentro del cuerpo, aunque también se obtienen resultados altamente satisfactorios con solo la mezcla de GECM.

Una realización adicional de la invención es proporcionar un vehículo, que retiene componentes nativos tales como GECM y los libera lentamente durante un periodo de tiempo prolongado (es decir, días, semanas o meses) y que produce la composición médica que incluye los componentes nativos y el vehículo inyectable en el cuerpo humano y animal. Como se ha establecido antes, el vehículo se selecciona según la aplicación definitiva, es decir, el órgano o sitio en el cuerpo donde va a inyectarse el vehículo.

En el presente contexto, el término "nativo" significa que los componentes nativos, de los que varios son proteínicos, están en su estado no desnaturalizado. Así, se permite cualquier modificación química del componente en tanto que se retenga la actividad biológica.

Ejemplos de componentes proteínicos son una hormona paratiroidea, una prostaglandina (por ejemplo, PGE<sub>2</sub>), una osteoprotegrina (OPG), activador de Indian hedgehog, un ligando de NF-kappa B (RANKL), un esteroide sexual y una citocina.

Un factor de crecimiento es, en el presente contexto, un término general para péptidos o proteínas específicos, que son liberados por ciertas células y se unen a sitios de receptor de la membrana celular específicos para influir en que las células se dividan. Por ejemplo, los condrocitos producen varios factores de crecimiento, que incluyen, por ejemplo, factor de crecimiento transformante (TGF-β<sub>3</sub>), proteína morfogénica ósea (BMP-2), PTHrP, osteoprotegrina (OPG), activador de Indian hedgehog, RANKL, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y factor de crecimiento similar a la insulina (IgF). El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es una glucoproteína que estimula la proliferación celular y la quimiotaxia en cartilago, hueso, y muchos otros tipos de células después de ser producido por células mesenquimatosas. Asimismo, el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) se produce localmente en hueso durante la fase inicial de la consolidación de fracturas y se sabe que estimula las células formadoras de cartilago y de hueso.

La superfamilia de factores de crecimiento transformantes (TGFs) es el factor de crecimiento más ampliamente estudiado en el campo de la biología ósea. Comprende una familia entera de sustancias que incluye las proteínas morfogenéticas óseas (BMP). Estas son sustancias de señalización célula-célula importantes, que inducen la formación de cartilago y hueso, además de promover la diferenciación de células precursoras osteogénicas en osteoblastos. Debe observarse que formas puras de BMP, algunas producidas por ingeniería genética, son no inmunogénicas y no específicas de especie.

El factor de crecimiento también puede ser un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o un factor de crecimiento endotelial vascular.

Una mezcla de factores de crecimiento autólogos, que se deriva de la capa leucocítica de células recogidas durante la cirugía, se produce por Interpore Cross International Inc., Irvine, EE.UU. Se dice que estos leucocitos son especialmente ricos en TGF-β y PDGF. Una mezcla de factores de crecimiento de un extracto de proteína morfogenética ósea derivada de bovino también se produce por NeOsteo, Intermedics Orthopaedics, Denver, EE.UU.

Las cantidades de diferentes componentes en la composición médica dependen de la célula y el origen de tejido de los componentes nativos producidos, además de la aplicación final prevista, es decir, el tipo de tejido u órgano que va a repararse.

Normalmente, la proporción entre los componentes nativos y el vehículo en la composición médica final es aproximadamente 1:10 basado en partes en peso, pero esta proporción puede variar algo.

Preferentemente, las células de origen humano se usan como "fábricas" para producir los componentes nativos. Una mezcla adecuada o combinación de factores de crecimiento, obtenida de condrocitos cultivados, puede tener hasta, por ejemplo, 100 kDa de tamaño o más, tal como entre aproximadamente 70 kDa y 10 kDa, preferentemente entre aproximadamente 60 kDa y 20 kDa, más preferentemente entre 50 kDa y 30 kDa. El tamaño de los componentes no está naturalmente limitado a los anteriores, ya que éstos son solo a modo de ejemplo.

Las expresiones "mezcla de componentes nativos" y "combinación de componentes nativos" usadas en el presente documento pretenden significar un conjunto de todos o una parte de los componentes nativos como se han definido anteriormente producidos a partir de una cierta célula, línea celular o tejido, es decir, todos los componentes producidos en su entorno natural. Si se desea, algunos de dichos componentes nativos podrían eliminarse del medio después de cultivar en vista de mantener solo el componente nativo más importante para la aplicación posterior, por ejemplo factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular (GECM). Como se ha establecido anteriormente, los componentes nativos que se originan de diferentes células, líneas celulares y tejidos pueden estar presentes en la misma mezcla o combinación de componentes nativos. Tales mezclas también pretenden entrar dentro del alcance de la expresión "mezcla o combinación de componentes nativos".

En una realización de la invención, el cultivo de las células se lleva a cabo bajo condiciones rotatorias. La rotación produce un mejor flujo nutricional, que hace que las células proliferen y produzcan GECM. La rotación puede implementarse por cualquier medio de rotación convencional usado en el cultivo celular convencional. En ciertas realizaciones, la rotación puede naturalmente excluirse. Es además adecuado, pero no necesario, que una matriz tridimensional esté presente bajo el cultivo celular con el fin de aumentar la producción de los componentes nativos. Es beneficioso si la matriz es esférica, por ejemplo perlas de almidón, que tienen un sistema de poros interconectados para el flujo nutricional dinámico. La matriz puede elegirse de, pero no se limita a, perlas, perlas de almidón, perlas de polímero y perlas de alginato, colágeno, ácido hialurónico y quitosano. Cualquier matriz conocida tal como las matrices tridimensionales que son adecuadas para su uso en el cultivo de las células puede usarse naturalmente según la invención. Un experto en la materia se da cuenta de qué tipo de matrices pueden usarse para el crecimiento beneficioso.

En una realización de la invención, la extracción del medio de cultivo que incluye componentes nativos tiene lugar continuamente y el medio de cultivo extraído se sustituye por medio nutritivo nuevo. En una realización, pueden usarse dos cámaras interconectadas separadas por un filtro millipore para el cultivo celular, que permite que los componentes nativos, por ejemplo factores de crecimiento y moléculas de proteínas ECM, difundan en la segunda cámara. A intervalos predeterminados, los medios de cultivo podrían extraerse y los componentes nativos separarse y liofilizarse bajo condiciones estériles, véase la Fig. 1. El cultivo celular se lleva a cabo durante al menos 7 semanas, preferentemente al menos 5 semanas, más preferentemente al menos 3 semanas, y lo más preferentemente al menos 1 semana, o menos, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días, antes de realizar la etapa de extracción.

En una realización de la invención, los componentes nativos producidos se separan del medio de cultivo por su tamaño o peso o por afinidad, por ejemplo por centrifugación o se separan en una columna.

Después de la separación, los componentes nativos individuales separados pueden combinarse en una mezcla o combinación antes de la liofilización, como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, cada uno de los componentes nativos separados se enriquece adicionalmente antes de la liofilización. Después de la liofilización, la mezcla o combinación liofilizada puede almacenarse en una bolsa hasta uso. Como se ha establecido anteriormente, también es posible enriquecer cualquiera de los componentes separados, combinarlos en una combinación y entonces liofilizar los mismos. Así, es posible obtener uno o más componentes nativos de biopsias de diferente origen (es decir, de diferentes tejidos) y entonces combinar los componentes obtenidos después de cultivar en una combinación novedosa y entonces opcionalmente liofilizar la combinación.

Según la presente invención, se añade un vehículo a los componentes nativos separados antes o después de la liofilización. En otra realización, la liofilización no es necesaria, por ejemplo en situaciones agudas en las que una inyección va a prepararse inmediatamente. Así, depende de la aplicación definitiva si un vehículo va a incluirse o no antes de la liofilización. El vehículo tiene que ser inyectable en el cuerpo humano y animal cuando se mezcla con los componentes nativos, y se elige en vista de la aplicación definitiva, de otro modo el cuerpo del paciente humano o animal podría tener dificultades en aceptar el producto de vehículo de componente nativo. El término "inyectable" usado en el presente documento significa que la composición médica, es decir, la mezcla de componentes nativos y el vehículo, y cualquier componente auxiliar farmacéuticamente aceptable adicional, por ejemplo antibióticos y componentes de mejora de la reología necesarios, que van a introducirse en el cuerpo humano o animal, pueden inyectarse en el cuerpo mediante una aguja o tubo que tiene un diámetro interno de 0,2-6 mm, preferentemente 0,4-2 mm. Esto significa que parámetros tales como la viscosidad y el tamaño de material de vehículo de la composición médica según la presente invención debe optimizarse para cumplir este fin, que es familiar para un experto en la materia. Ciertos vehículos son solo adecuados para ciertas aplicaciones, que es obvio para un experto en la materia. El vehículo debe, por supuesto, ser aceptable por el cuerpo humano y animal y se elige del grupo que consiste en polímeros naturales o sintéticos, y materiales cerámicos que son muy conocidos en la técnica por ser inyectables. El vehículo puede elegirse de ácido hialurónico, cola de fibrina, quitosano, dextrano, colágeno, alginato y biopolímeros

de diferentes materiales que tienen diferentes módulos de elasticidad. El biopolímero de diferentes materiales que tienen diferentes módulos de elasticidad puede prepararse soldando/uniendo juntos dos materiales diferentes, por ejemplo un metal y un plástico, o un material polimérico natural y sintético. Otros materiales que pueden usarse en este biopolímero son, por ejemplo, cualquier material orgánico e inorgánico. También es posible que el biopolímero sea un biopolímero con un gradiente de elasticidad dentro del mismo material.

En una realización de la invención se preparará el desarrollo de modificaciones de polímeros naturales, polímeros sintéticos y/o materiales cerámicos con diferentes propiedades elásticas y viscoelásticas, véase la Fig. 2. Los vehículos podrían ser empapados o pre-cargados o fabricados con componentes nativos preparados tales como GECM y/o combinarse con otros factores tales como bisfosfonatos o antibióticos y con el tiempo combinarse con la administración sistémica de factores estimulantes de colonias o fármacos para potenciar el reclutamiento de células progenitoras circulantes y proteínas de unión a célula.

El (Los) componente(s) nativo(s) producido(s) según el método de la invención son de un carácter de autoinjerto o aloinjerto o ambos. Se realizan las ventajas de los autoinjertos para un paciente, ya que éstos son los componentes nativos propios de los pacientes que se usan, por lo que se evita, por ejemplo, el rechazo. Otros problemas que se evitan son infecciones debido a diferentes virus que se transfieren al huésped, aunque se esterilice el implante transferido. Así, pueden evitarse infecciones por virus tales como el VIH e infecciones producidas por priones o cualquier otra especie cuando el implante es un tipo de autoinjerto.

La reparación de tejido podría tener lugar, por ejemplo, en articulaciones, partes vasculares, músculos, tendones, la médula espinal, nervios, tejido óseo, tejido adiposo, corazón, cerebro y órganos endocrinos. Se prevé que los componentes nativos específicos preparados puedan inyectarse a vehículos biológicos como ácido hialurónico que va a usarse para lesiones de articulaciones, cola de fibrina para lesiones del tendón de Aquiles, fosfato de  $\alpha$ -tricalcio bi-fásico (sustituto óseo inyectable) para fracturas vertebrales y fusión espinal, dextrano para lesiones de la médula espinal, etc., a condición de que el vehículo se haya implantado de antemano en el sitio del proceso de reparación de tejido. Otras áreas donde los componentes nativos podrían usarse son accidente cerebrovascular, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer usando vehículos biológicos comprobados disponibles.

### 30 Ejemplos

Se han realizado estudios preliminares (véanse los detalles a continuación) con condrocitos como muestras de células tomadas de seis rodillas humanas en cirugía, se cultivaron en un biorreactor con los medios de cultivo obtenidos y la GECM producida se separó de las células a las 3 semanas. Se incorporaron tres concentraciones diferentes de la combinación de GECM en un material inyectable y se implantaron en músculo abdominal de rata. Se usó un sustituto de hueso cerámico bifásico como vehículo, y las mediciones con TGF-beta e IGF-1 como marcadores mostraron una clara curva de respuesta a dosis. Podría demostrarse crecimiento hacia adentro vascular y nuevo hueso en el material sintético en un músculo. Esto es solo posible por el reclutamiento de células madre de células progenitoras circulantes o locales - que diferenciaron células de músculo en hueso.

En otro estudio (véanse los detalles a continuación), los presentes inventores han probado si un tipo de ECM, condroadherina, una proteína de cartílago no colagenoso con propiedades de unión a célula, podría usarse en el mismo sustituto de hueso bifásico cerámico para inducir hueso.

Se ha llegado a la conclusión temprana que la condroadherina puede desempeñar una función en mantener las células de hueso sobre matrices de colágeno. Los presentes inventores usaron un sustrato de hueso de fosfato de  $\alpha$ -tricalcio y sulfato de calcio en un modelo animal de conejo con una cámara de recogida de hueso bien descrita. Se estudió la farmacocinética, que muestra una liberación significativa de condroadherina y aumento durante las dos primeras dos semanas. Sin embargo, no fue posible mostrar ningún aumento significativo en hueso nuevo tanto como aposición como crecimiento en el material. Mirando la actividad específica que cuenta, por ejemplo, el número de osteoclastos sobre el material otra vez, no se mostró diferencia con el sustituto de hueso simple.

Podría especularse que un vehículo diferente o ECM marcaría la diferencia. Sin embargo, es más probable que tanto la concentración de condroadherina fuera demasiado baja para mostrar cualquier efecto o que una combinación de proteínas de la matriz extracelular y factores de crecimiento fuera necesaria para aumentar significativamente el reclutamiento de células progenitoras circulantes o locales para transformar e inducir hueso.

Descripción detallada del experimento preliminar 1

### 60 Mezcla de factores de crecimiento

Se produjo una combinación de condrocitos de factores de crecimiento autólogos (AGFCC) a partir de células de cartílago humano cultivado *ex vivo*. Durante el examen artroscópico, el cirujano tomó una biopsia del área que no porta peso de la parte proximal del cóndilo medial o lateral. La esquirra de cartílago tuvo 8 a 10 mm de largo y se extendió hacia la placa de hueso subcondral. La biopsia contuvo aproximadamente 200-300 mg de cartílago. El material de biopsia se colocó inmediatamente en el medio nutritivo y se remitió a un laboratorio de células y se puso

en una solución de nutriente especial (DMEM F-12).

Producción de mezcla de factores de crecimiento

5 El medio nutritivo de células consistió en DMEM F-12. Las células se cultivaron en un medio durante aproximadamente 2 semanas, donde después se recogió el medio de cultivo y se guardó como una porción 100 x. TGF- $\beta$  e IGF-1 sirvieron como proteínas marcadoras para establecer la concentración de la combinación de factores de crecimiento. La cantidad de TGF- $\beta$  en la concentración más alta del medio fue aproximadamente 50-300 ng/ml y la de IGF-1 fue aproximadamente 100-300 ng/ml. Las combinaciones se produjeron de 7 pacientes.

10 Mezcla de sustituto de hueso

Se mezcló el  $\alpha$ -TCP con 20 % de CaS con las combinaciones respectivas, la combinación de alta concentración (100 veces) se diluyó 10 veces y 100 veces con 1 % de BSA-PBS. Con las concentraciones, los materiales se dividieron por IBS-GF1 (concentración alta), IBS-GF3 (concentración baja). Después de mezclar el material se inyectó en un molde (5 mm de diámetro x 4 mm de espesor) y se dejó hasta que fraguó (12 h). Los pellets asentados hechos del material inyectable se implantaron en músculos de rata.

20 Experimentos en animales

Se usaron 64 ratas Sprague-Dawley hembra con pesos corporales de 200-230 g para el experimento. La operación se realizó con anestesia con hidrato de cloral (300 mg/kg, B.W. intraperitoneal). Los especímenes preparados hechos del material inyectable se implantaron en bolsas de músculo abdominal de ratas. Se sacrificaron 8 ratas en cada grupo en cada uno de los siguientes intervalos de tiempo; 3, 6, 12 y 24 semanas.

25 Preparación y evaluación de especímenes

Se recogieron los sustitutos de hueso con músculos de alrededor. Los especímenes de muestra con tejido y materiales se fijaron en 4 % de formalina en tampón, se descalcificaron y se incorporaron en parafina. Se cortaron en secciones de 5  $\mu$  y se tiñeron con tinción H&E. El análisis histológico se hizo observando osteoblastos, mineralización y hueso trabecular en y alrededor de los materiales.

35 Se contó el tamaño del área de formación de hueso nuevo usando un microscopio con un sistema de obtención de imágenes por ordenador (Kontron Bildanalyse, Alemania). La puntuación de la inducción ósea se hizo por un patrón de puntuación bajo microscopio.

40 Se combinaron el experimento de ECM individual, biomaterial de condroadherina como vehículo y condroadherina como componente nativo con la ayuda de una solución acuosa al 2,5 % de hidrogenofosfato de sodio formando una pasta. La pasta se distribuyó entonces en moldes para formar pequeños pellets cilíndricos cada uno de 1 mm de diámetro y altura. Durante las pruebas *in vitro*, una vez secados, los pellets se sumergieron en 100 microlitros de solución salina tamponada con solución de fosfato y se dejaron disolver a temperatura ambiente. A intervalos periódicos que oscilaban de 15 minutos a 2 semanas, la solución de baño se sacó, se centrifugó y se ensayó en un espectrofotómetro de UV-Vis (a 280 nm) para registrar las lecturas de absorbancia.

45 Cada solución se volvió a poner entonces en el vial apropiado y se dejó que continuara el proceso de disolución. Se esperó que las lecturas de absorbancia reflejaran la proporción y posterior velocidad de liberación de condroadherina en la solución de alrededor como pellets gradualmente disueltos. Durante las pruebas llevadas a cabo *in vivo*, un único pellet hecho del material inyectable se implantó bilateralmente en las tibias proximales de 6 conejos con la ayuda de una cámara de hueso. Un lado contuvo un pellet con condroadherina incorporada mientras que el otro sirvió de control. El crecimiento hacia adentro del hueso se evaluó entonces mediante análisis histológico tras la recogida a intervalos de 2 y 3 semanas. No se observó crecimiento hacia adentro de hueso.



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método de producción de una mezcla de componentes nativos, incluidos en el grupo que consiste en factores de crecimiento, proteínas de la matriz extracelular y otras sustancias producidas por muestras de células durante condiciones normales, que comprende las etapas de:
- 10 - añadir una o varias muestras de células diferentes de origen humano o animal y en el que dichas muestras de células son o se originan de una biopsia de tejido de uno o más de los siguientes tejidos músculo, grasa, cartílago, piel, hueso, nervios, hígado y/o dientes, a un biorreactor que contiene un medio nutritivo, en el que se obtiene un medio de cultivo;
  - cultivar las células durante condiciones normales, en el que el cultivo se lleva a cabo bajo condiciones rotatorias;
  - 15 - extraer al menos una vez el medio de cultivo que incluye componentes nativos producidos durante el cultivo celular;
  - separar los componentes nativos del medio de cultivo obteniendo así una mezcla de componentes nativos,
- en el que dicho biorreactor tiene dos cámaras interconectadas separadas por un filtro millipore que permite que los componentes nativos producidos difundan a la segunda cámara y la separación de las células del medio de cultivo que contiene componentes nativos en el biorreactor, y en el que la extracción del medio de cultivo que incluye componentes nativos producidos tiene lugar a intervalos predeterminados y el medio de cultivo extraído se sustituye por medio nutritivo nuevo.
- 20 2. El método según la reivindicación 1, en el que dicha biopsia de tejido se obtiene de un sujeto animal seleccionado de cerdos, vacas y cabras.
- 25 3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que el método comprende además la liofilización de los componentes nativos separados.
- 30 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que está presente una matriz durante el cultivo de las células con el fin de aumentar la producción de los componentes nativos.
- 35 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que los componentes nativos producidos se separan del medio de cultivo por tamaño o peso o por afinidad.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que cada uno de los componentes nativos separados se enriquece además antes de la liofilización.
7. El método según la reivindicación 6, en el que la muestra de células es una línea celular.
- 40 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que un vehículo se añade a la mezcla de componentes nativos producidos antes o después de una etapa de liofilización opcional.
9. El método según la reivindicación 8, en el que el vehículo se elige del grupo que consiste en polímeros naturales o sintéticos, y materiales cerámicos.
- 45 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proporción entre los componentes nativos y el vehículo es aproximadamente 1:10 partes en peso.
- 50 11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichos factores de crecimiento nativos son factor de crecimiento transformante, proteína morfogénica ósea (BMP-2), PTHrP, osteoprotegrina (OPG), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento similar a la insulina, activador de Indian hedgehog, un ligando de NF-kappa B (RANKL), un factor de crecimiento endotelial vascular y factores de crecimiento autólogos; en el que las proteínas de la matriz extracelular (ECM) son fibronectina, vitronectina, condroadherina o agreganos; y en el que dichas otras sustancias producidas por dicha una o más muestras de células durante condiciones normales son una hormona paratiroidea, una prostaglandina, una osteoprotegrina, un esteroide sexual o una citocina.
- 55

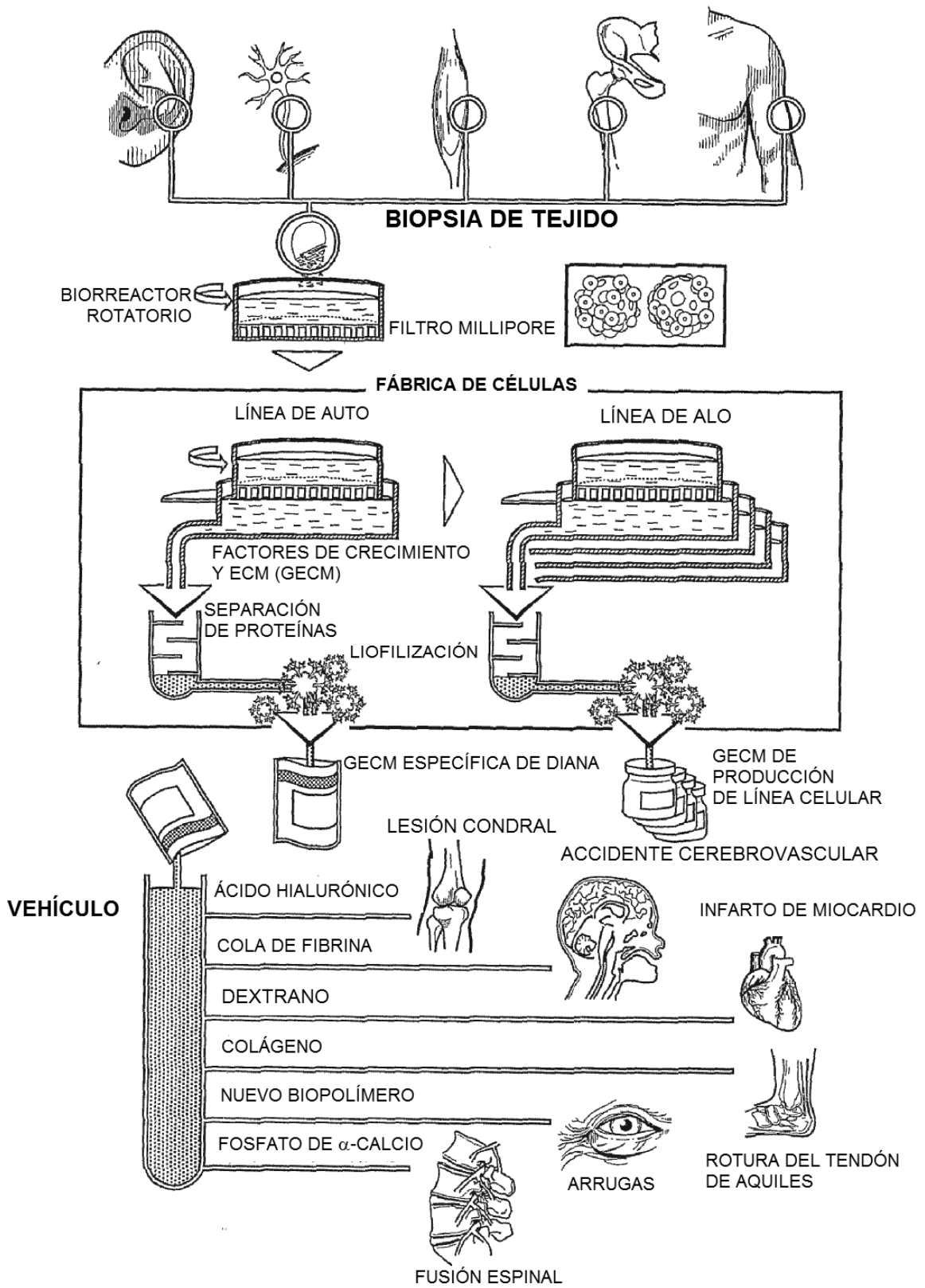
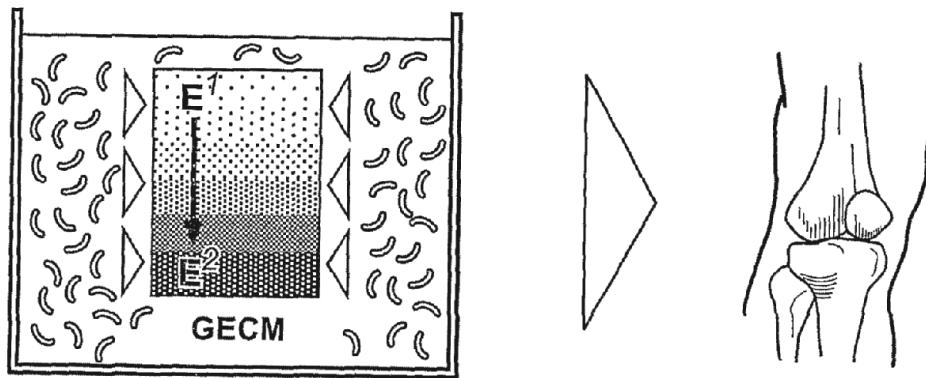


Fig. 1



*Fig. 2*