

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 861 385**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/078 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2016** **E 16172608 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2021** **EP 3252143**

54 Título: **Método para producir un gel que contiene un lisado de plaquetas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.10.2021

73 Titular/es:

PL BIOSCIENCE GMBH (100.0%)
Dennewartstrasse 25-27
52068 Aachen, DE

72 Inventor/es:

HEMEDA, HATIM y
WILKES, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 861 385 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

Método para producir un gel que contiene un lisado de plaquetas

5 Antecedentes de la invención

La invención describe el uso de un material de lisado de plaquetas liofilizado para preparar un sustrato gelatinoso tridimensional para cultivar células.

10 Técnica anterior

Las células generalmente se cultivan en medios que se complementan con suero fetal de ternero (SFT) u otros sueros sanguíneos para proporcionar a las células factores de crecimiento esenciales. Aunque ningún tipo de célula necesita realmente suero para crecer, la mayoría de los tipos de células sensibles, por ejemplo, las células madre, todavía dependen de los medios que contienen suero. Sin embargo, a la luz de las aplicaciones terapéuticas, existe un interés creciente por evitar el uso del SFT debido a las posibles reacciones inmunológicas xenogénicas (por ejemplo, los anticuerpos anti-SFT), patógenos bovinos (virus y priones) y una alta variabilidad entre lotes que dificulta la reproducibilidad de los resultados (Heiskanen y otros, 2007; Sundin y otros, 2007). Los medios de cultivo sintéticos químicamente definidos están ahora disponibles comercialmente, pero su composición exacta a menudo no se revela y estos medios usualmente incluyen otros componentes xenogénicos tales como los factores de crecimiento recombinantes.

El lisado de plaquetas humanas (LPH) representa otra alternativa atractiva al SFT. El LPH puede generarse a partir de unidades de plaquetas comunes mediante un simple procedimiento de congelación-descongelación. Es posible incluso utilizar el LPH del mismo donante para minimizar aún más el riesgo de efectos secundarios inmunológicos o infecciones virales. Estos estudios se realizaron con células estromales mesenquimales (CEM) de la médula ósea y recientemente se ha demostrado que el LPH también se puede utilizar para el aislamiento de las CEM a partir del tejido adiposo humano (Blande y otros, 2009).

Se conoce un método para preparar el lisado de plaquetas sanguíneas y un medio LPH a partir del documento EP 0 413 727 B1. De acuerdo con este método conocido, se añade el citrato a la sangre total para evitar la coagulación. El plasma derivado de esta sangre se centrifuga para obtener una pasta rica en plaquetas y luego se añade el Ca^{2+} para lisar las plaquetas y coagular los componentes restantes. El lisado transparente filtrado se mezcla con una composición nutritiva convencional para obtener un medio que contiene el LPH.

Además, el documento WO 2008/034803 A1 describe un suplemento del medio de cultivo celular que comprende lisado de plaquetas sin plasma. El suplemento comprende además sustancias adicionales como la albúmina y el dextrano. Para preparar el suplemento, las plaquetas se lisan mediante congelación y descongelación, y se añade el ácido citrato dextrosa (ACD) o la citrato dextrosa fosfato (CDF) como anticoagulante.

Sin embargo, muchas células, por ejemplo, las células estromales mesenquimales (CEM), crecen en una monocapa adherente al plástico hasta que se inhiben por contacto. Tarde o temprano, la tasa de proliferación de las células decae hasta que finalmente alcanzan un estado senescente. Esto se acompaña de la morfología agrandada, la expresión reducida de marcadores de superficie y el potencial de diferenciación disminuido. Este proceso no ocurre en paralelo en todas las células en cultivo debido a las diferentes subpoblaciones, la apoptosis y, por último, pero no menos importante, la inhibición por contacto dentro de las colonias. La densidad menor de siembra facilita intervalos mayores para el pase de las células y, por lo tanto, la proliferación solo puede ocurrir en el borde de las colonias más grandes. En consecuencia, cuando se usan los cultivos en monocapa adherente al plástico, difícilmente es posible lograr una expansión confiable y minimizar la inhibición por contacto. Además, el pase de las células no es posible sin el uso de un tratamiento con peptidasa que daña a las células. Con los cultivos de células madre, otra desventaja de los cultivos en monocapa adherente al plástico es que la superficie plástica puede causar una diferenciación no deseada de las células.

El documento WO 2013/000672 A1 describe un método para cultivar las células mediante el uso de un medio líquido que comprende un lisado de plaquetas sanguíneas y una sustancia inhibidora de la gelatinización. Las células se cultivan en la superficie y/o dentro de un sustrato gelatinoso tridimensional que comprende un lisado de plaquetas sanguíneas pero que está sustancialmente desprovisto de una sustancia inhibidora de la gelatinización, en donde el medio líquido se coloca en capas sobre el sustrato gelatinoso de manera que se establece un sistema de dos fases. Las células estromales mesenquimales (CEM) cultivadas en este gel muestran tasas de proliferación significativamente más altas en comparación con las CEM cultivadas en plástico para el cultivo de tejidos (PCT). Sin embargo, aunque el sustrato gelatinoso es adecuado para cultivar las células, constituye un inconveniente que el gel tenga que prepararse en el lugar de uso, ya que no se puede transportar a largas distancias y no es estable durante un período más largo de tiempo.

El documento US 2013/0195959 A1 describe un método para preparar una composición adecuada para el uso terapéutico o como medio de cultivo, que comprende las etapas de concentración de plaquetas a partir de una

fuelle de plaquetas, para formar una porción rica en plaquetas de la fuente de plaquetas, y lisar las plaquetas en la porción rica en plaquetas para formar una pluralidad de lisados. Una etapa adicional incluye liofilizar los lisados para formar lisados de plaquetas liofilizados en una composición con concentraciones liberadas de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas disponibles.

Walenda y otros (2012) describen un lisado de plaquetas humanas (LPH) que puede utilizarse como un sustituto del suero fetal de ternero sin el riesgo de las reacciones inmunológicas xenogénicas o la transmisión de patógenos bovinos. Es necesario añadir heparina como anticoagulante antes de la adición del LPH al medio de cultivo; de lo contrario, el medio LPH forma un gel en una hora. Está demostrado que los geles de LPH recubiertos por un medio de LPH líquido, que - además de la heparina - consta de los mismos componentes que el medio de LPH, proporcionan una matriz 3D adecuada para el cultivo celular. Las células estromales mesenquimales (CEM) crecen en varias capas en la interfaz entre el gel LPH y el medio LPH sin contacto con biomateriales artificiales. La matriz 3D de LPH tiene muchas ventajas sobre las superficies plásticas convencionales, ya que facilita el brote potenciado de UFC-f y permite mayores tasas de proliferación, densidades celulares más altas y procedimientos de pase no enzimático para la expansión del cultivo de las CEM.

El documento WO 2013/076507 A2 describe una composición farmacéutica que comprende un lisado de plaquetas que puede aplicarse terapéuticamente a las heridas, tales como las heridas ulceradas, las fisuras anales, la atrofia vaginal o las arrugas. La composición o lisado se liofiliza para producir un polvo liofilizado estabilizado que contiene factores de crecimiento y que puede usarse para la aplicación terapéutica en la cicatrización de heridas, pero también para otras aplicaciones terapéuticas en las cuales existe una mayor necesidad de suministro de factores de crecimiento naturales.

Resumen de la invención

El objetivo de la invención es proporcionar un uso de un material de lisado de plaquetas liofilizado para preparar un sustrato gelatinoso tridimensional para cultivar las células, que pueda transportarse y almacenarse fácilmente durante un período prolongado sin un impacto significativo en sus propiedades para el cultivo celular.

El objetivo se logra mediante el uso de un material de lisado de plaquetas seco liofilizado, en particular el material de lisado de plaquetas producido en el método que se describe en la presente descripción, como un material listo para usar para preparar un sustrato gelatinoso tridimensional para el cultivo de células, en donde el material de lisado de plaquetas liofilizado está libre de cualquier sustancia inhibidora de la gelatinización. En una modalidad ventajosa de la invención, las células pueden ser, por ejemplo, células estromales mesenquimales.

El método para producir el material para preparar un sustrato gelatinoso tridimensional comprende:

- a) Proporcionar un concentrado de trombocitos;
- b) Recolectar las plaquetas sanguíneas a partir del concentrado de trombocitos;
- c) Lisar las plaquetas sanguíneas para producir un lisado de plaquetas, y
- d) Liofilizar dicho lisado de plaquetas, para proporcionar un material de lisado de plaquetas seco.

Una etapa previa a la formación de un sustrato gelatinoso incluye liofilizar el lisado de plaquetas para formar un material de lisado de plaquetas seco, similar a un polvo. Sorprendentemente, la etapa de liofilización no tiene ningún impacto en las propiedades del gel y proporciona un suplemento más estable al aumentar la vida útil durante un período prolongado en condiciones controladas de calidad. Es decir, el material de lisado de plaquetas liofilizado es estable y puede almacenarse durante un período prolongado. Además, el material liofilizado se puede transportar fácilmente de modo que la composición de gel completa pueda suministrarse al lugar de uso. El usuario no necesita realizar todo el proceso de producción del gel de lisado de plaquetas en el lugar de uso. En cambio, el material de lisado de plaquetas liofilizado se produce en condiciones estandarizadas y controladas en una instalación de producción y el material seco liofilizado se suministra al usuario como una especie de material listo para usar que el usuario puede reconstituir fácilmente.

La gelatinización del lisado de plaquetas humanas puro o una composición que comprende el lisado de plaquetas humanas, la cual está libre de cualquier sustancia inhibidora de la gelatinización tal como la heparina, se produce de forma espontánea a aproximadamente 37 °C en una hora. Es decir, la adición de agentes inductores de la coagulación, como la trombina y/o el gluconato de calcio, no es necesaria para la gelatinización. Por consiguiente, si el material de lisado de plaquetas liofilizado se reconstituye mediante la adición de agua, el material se gelatiniza espontáneamente en el lugar de uso de modo que se produce el gel de lisado de plaquetas completamente funcional.

Se puede añadir al menos un componente del medio al lisado de plaquetas para adaptar el gel de lisado de plaquetas a las necesidades específicas de las células a cultivar. El componente del medio puede comprender, por ejemplo, una composición de medio estandarizada para el cultivo celular, preferentemente el medio Eagles Modificado de Dulbecco (MEMD), en particular MEMD bajo en glucosa (MEMD-BG). Por tanto, se puede

proporcionar un medio que contiene factores de crecimiento esenciales y todos los nutrientes necesarios para los cultivos celulares sin componentes de suero no deseados.

El material del gel de lisado de plaquetas puede comprender del 1-50 % de lisado de plaquetas sanguíneas, preferentemente del 1-40 % de lisado de plaquetas sanguíneas, preferentemente del 1-30 % de lisado de plaquetas sanguíneas, preferentemente del 1-20 % de lisado de plaquetas sanguíneas, preferentemente del 5-15 % de lisado de plaquetas en sanguíneas, en particular, aproximadamente el 10 % de lisado de plaquetas sanguíneas.

Las plaquetas sanguíneas pueden lisarse mediante un proceso de congelación-descongelación. Por ejemplo, las unidades de plaquetas recolectadas pueden congelarse dos veces a -80 °C y descongelarse respectivamente a 37 °C.

Por ejemplo, el material del gel de lisado de plaquetas puede consistir esencialmente en LPH al 10 %, MEMD al 89 % y L-Glutamina 2 mM.

Resultó que el sustrato gelatinoso resultante es un sustrato perfecto para expandir las células adherentes, especialmente las células estromales mesenquimales (CEM) o los fibroblastos. El uso de un sustrato gelatinoso que comprende el lisado de plaquetas sanguíneas evita el riesgo de reacciones inmunológicas xenogénicas o la transmisión de patógenos bovinos y también es más eficaz que el suero fetal de ternero (SFT) para la expansión a gran escala de células, especialmente de CEM del tejido adiposo. Por ejemplo, el lisado de plaquetas humanas (LPH) aumenta significativamente la tasa de proliferación y el número máximo de duplicaciones de la población acumulada de las CEM derivadas del tejido adiposo.

Por ejemplo, las células a cultivar son células madre o progenitoras, particularmente se prefieren las células madre mesenquimales, en particular células estromales mesenquimales. En otra modalidad ilustrativa de la invención, las células son células mesodérmicas, preferentemente fibroblastos o células estromales mesenquimales. Pero, obviamente, también pueden cultivarse otros tipos de células, por ejemplo, las células derivadas de los linajes ectodérmicos o endodérmicos, o incluso las células primarias.

El término "lío-filización" como se usa en la presente descripción se refiere a un proceso de "secado por congelación" que comprende la conversión de agua de un estado congelado a un estado gaseoso sin pasar por un estado líquido. El proceso de secado por congelación elimina la humedad de un material que contiene agua mientras que el material permanece congelado. El proceso básico de liofilización comprende las siguientes etapas: congelación, secado primario (sublimación) y secado secundario (desorción). Al principio, una sustancia disuelta y/o suspendida se congela a baja temperatura (por ejemplo, -60 °C). La congelación lenta produce cristales más grandes que permiten que escape el material sublimante. Algunos productos forman un material vítreo y es posible que se requiera el templado durante el proceso de congelación. El templado, primero mediante el descenso de la temperatura, luego el aumento de la temperatura y después el descenso nuevamente, bloquea los componentes en su lugar y luego permite que los cristales crezcan. La congelación puede variar entre 1 hora y 24 horas, según la aplicación. En la etapa 2 (secado primario), el agua o el diluyente se extrae mediante el vacío, lo cual da como resultado una "torta" seca y porosa. La sublimación se produce al vacío con la temperatura del producto por debajo de su temperatura crítica. Este suele ser el proceso más largo. Al final del ciclo de secado primario, el producto tendrá un contenido de humedad del 3 al 5 %. Hay una etapa de secado final (secado secundario) para eliminar las moléculas de agua no congeladas residuales. Esto se hace mediante el calentamiento del producto. El secado secundario puede dar como resultado niveles de humedad de aproximadamente 0,5 %.

La invención se describe más ampliamente con referencia a las figuras.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un diagrama de barras que muestra la tasa de proliferación de las CEM en un gel de LPH convencional y derivadas de un gel de LPH a partir de un material de LP seco liofilizado. Las células se cultivaron en un gel de LPH normal o en un gel de LPH derivado de un material de LP seco liofilizado (gel de LPH-Lio) durante 15 días. Las mediciones de la proliferación celular revelaron tasas de proliferación similares en ambos sustratos.

La Figura 2 muestra un diagrama de barras que muestra la tasa de proliferación de las CEM después de un cultivo a largo plazo en un gel convencional del LPH y un gel de LPH derivado de un material de LP seco liofilizado. Las células se cultivaron en un gel de LPH normal o en un gel de LPH derivado de un material de LP seco liofilizado (gel de LPH-Lio) durante 5 y 10 días. Las mediciones de la proliferación celular revelaron tasas de proliferación similares en ambos sustratos.

La Figura 3 muestra un diagrama de barras que muestra la tasa de proliferación de las CEM cultivadas en un gel de LPH recién preparado, derivado de un material de LP seco liofilizado y un gel de LPH de una semana, derivado de un material de LP seco liofilizado. Se prepararon placas de gel y se almacenaron a temperatura ambiente,

4 °C y a 37 °C. Las células se cultivaron en un gel de LPH derivado de un material de LP seco liofilizado (gel de LPH-Lio) durante 7 días.

Descripción de las modalidades ilustrativas y preferidas de la invención

Las células estromales mesenquimales (CEM) son una población celular biológicamente importante que es capaz de mantener la hematopoyesis, puede diferenciarse en linajes mesenquimales y no mesenquimales *in vitro*, es capaz de suprimir las alorrespuestas y parece ser no inmunogénica. Estas propiedades sugieren roles emergentes para las células estromales mesenquimales en la terapia celular.

Las CEM se aislaron del caput femoris tras la fractura de cadera, después del consentimiento por escrito mediante el uso de las directrices aprobadas por el Comité de Ética de la Universidad de Aquisgrán. Los fragmentos de hueso se lavaron abundantemente con PBS y posteriormente las células mononucleares (CMN) se aislaron mediante un gradiente de densidad en Biocoll (Biochrom AG, Berlín, Alemania). Las células se cultivaron en placas de cultivo celular recubiertas con fibronectina (Greiner, Kremsmunster, Austria) en Medio Eagles Modificado de Dulbecco Medio o Bajo en Glucosa (MEMD-BG; PAA, Pasching, Austria) con L-glutamina 2 mM (Sigma Aldrich, San Luis, MO, EE. UU.) y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (pen/estrep; Lonza, Basilea, Suiza). El medio de cultivo se complementó con SFT (HyClone, Bonn, Alemania) o LPH como se indicó. El medio de cultivo siempre se cambió dos veces por semana. Cuando alcanzaron el 80 % de confluencia, las células se trataron con tripsina, se contaron en una cámara de recuento de Neubauer (Brand, Wertheim, Alemania) y se volvieron a sembrar a 10^4 células/cm². Se calcularon las duplicaciones de la población acumulada desde el primer pase en lo adelante.

El lisado de plaquetas humanas (LPH) se generó a partir de unidades de plaquetas de donantes sanos como describen Horn y otros (2010). En particular, el LPH se generó por aféresis mediante el uso del sistema de recolección Trima Accel (CaridianBCT, Garching, Alemania). Dichos concentrados de trombocitos tenían un contenido de plaquetas de $2,0$ a $4,2 \times 10^{11}$ plaquetas en 200 mL de plasma suplementado con Ácido-Citrato-Dextrosa (ACD) (1:11 v/v). Las unidades de plaquetas se dividieron en alícuotas, se congelaron dos veces a -80 °C, se descongelaron a 37 °C y se centrifugaron a 2600 g durante 30 min a 4 °C para eliminar los fragmentos de células y se reunieron en cantidades iguales. El sobrenadante se filtró a través de un dispositivo de filtro DG/X FPVD de 0,22 µm (Whatman, Dassel, Alemania), opcionalmente suplementado con 2 U/mL de heparina para evitar la gelatinización, y se almacenó a -80 °C.

Las células se cultivaron en placas de cultivo celular (Greiner, Kremsmunster, Austria) en Medio Eagles Modificado de Dulbecco Medio o Bajo en Glucosa (MEMD-BG; PAA) con L-glutamina 2 mM (Sigma Aldrich, San Luis, MO, EE. UU.) y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (pen/estrep; Lonza, Basilea, Suiza). El medio de cultivo/sustrato se complementó con LPH como se indica en la descripción. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía un 5 % de dióxido de carbono con cambios de medio dos veces por semana.

La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo de bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo (MTT). Las CEM se sembraron en una placa de 96 pocillos (3000 células/pocillo) en medio de cultivo/sustrato suplementado con 0, 1, 5, 10 o 20 % de LPH como se indica en la descripción. Después de 7 días de cultivo, las células se lavaron con PBS (PAA) y se incubaron con MTT 1 mM (Sigma-Aldrich) en PBS durante 3,5 h. El exceso de la solución se desechó y los cristales se resolvieron en HCl 4 mM en isopropanol (ambos de Roth, Karlsruhe, Alemania). La densidad óptica (DO) se midió a una longitud de onda de 590 nm con un lector de placas Tecan Infinite 2000 (Tecan Trading, Mannedorf, Suiza).

Ejemplo

Generación del lisado de plaquetas humanas:

Las unidades de plaquetas se proporcionaron amablemente por el Instituto de Medicina Transfusional, de la Facultad de Medicina de la Universidad Técnica de Aquisgrán después de su fecha de caducidad (5 días después de la recolección). Las unidades de plaquetas se generaron por aféresis mediante el uso del Sistema de Recolección Trima Accel (CaridianBCT, Garching, Alemania) y comprenden de $2,0$ - $4,2 \times 10^{11}$ plaquetas en 200 mL de plasma suplementado con Ácido-Citrato-Dextrosa (ACD) (1:11 v/v). Las alícuotas de 45 mL se congelaron dos veces a -80 °C y se descongelaron a 37 °C y luego se centrifugaron a $2600 \times g$ durante 30 minutos. El sobrenadante se filtró a través de filtros de PVDF GD/X de 0,2 µm (Whatman, Dassel, Alemania) y se almacenó a -80 °C hasta su uso. Los experimentos de este estudio se realizaron con tres conjuntos de LPH, cada uno de los cuales consistió en lisados de cuatro donantes, pero también se observaron resultados similares mediante el uso de LPH derivados de donantes individuales. Los LPH consistieron predominantemente en sangre del tipo A, pero un análisis sistemático no reveló ningún impacto del grupo sanguíneo.

Medio de cultivo y gel de LPH:

El medio de cultivo consistió en Medio Eagles Modificado de Dulbecco Medio o Bajo en Glucosa (MEMD-BG; PAA, Pasching, Austria) con L-glutamina 2 mM (Sigma Aldrich, San Luis, MO, EE. UU.) y 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (pen/strep; Lonza, Basilea, Suiza) y LPH (10 % si no se indicó lo contrario). Las células se cultivaron en plástico para cultivo de tejidos (PCT; Greiner, Kremsmünster, Austria). Para la preparación del gel, se cargó medio de cultivo de células que contiene LPH sin heparina en las placas de cultivo celular. Debido al calcio comprendido en el medio, se inició la cascada de coagulación y el medio LPH se gelatinizó en una hora a 37 °C. Es decir, el lisado de plaquetas sanguíneas, puro o diluido, se gelatiniza espontáneamente a aproximadamente 37 °C sin necesidad de añadir ningún agente inductor de la coagulación como, por ejemplo, la trombina y/o el gluconato cálcico. El gel de LPH resultante se usó como sustrato de cultivo celular, el cual se sembró con la misma cantidad de CMN. A modo de comparación, se usaron geles que consistían en un 80 % de colágeno G (3 mg/mL de colágeno de tipo I/III en HCl 12 mM; Biochrome, Berlín, Alemania) como se describió anteriormente. Las células se cultivaron a 37 °C en placas de 6 pocillos o frascos de cultivo de tejidos T75 (Nunc Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Alemania).

Mediciones de elasticidad de los geles de LPH:

Para las mediciones de la elasticidad, se formaron los geles de LPH en concentraciones del 5 %, 10 % y 20 % mediante el uso de cilindros de plástico (14 mm de diámetro y 2 mm de altura) como molde encima de cubreobjetos delgados. Después de la gelatinización como se describió anteriormente, se retiraron los cilindros de molde y los geles de LPH se cubrieron con un cubreobjetos de masa conocida. El grosor del gel se determinó mediante el uso de un microscopio confocal láser de barrido (LSM 510 Meta, Zeiss, Alemania) equipado con un objetivo Achroplan 40x de larga distancia (NA 0,6, PH 2). La colocación de cubreobjetos adicionales de peso conocido y la posterior medición del grosor se repitieron al menos dos veces para cada cilindro de gel de LPH. A partir de las cantidades medidas de grosor del gel (h), la masa total de cubreobjeto(s) (m), la reducción del grosor debido a la carga (Dh) y la sección transversal del gel (A), calculamos los módulos elásticos del gel de acuerdo con $E = (m \cdot g) / A \cdot (h / \Delta h)$ donde g denota la aceleración debida a la gravitación.

Aislamiento de las células estromales mesenquimales humanas a partir de la médula ósea:

Se aislaron las CEM a partir de las células mononucleares (CMN) mediante adherencia al plástico. En resumen, los fragmentos de hueso del *caput femoris* de los pacientes sometidos a la prótesis de la cabeza femoral se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Posteriormente, las CMN se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll (solución de Separación Biocoll, densidad 1,077 g/l, Biochrom AG, Berlín, Alemania) y se lavaron dos veces con PBS. Al menos 5×10^5 CMN se resuspendieron en medio de cultivo sobre PCT, gel de LPH o geles de colágeno en placas de 6 pocillos. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. El primer cambio de medio se realizó después de 48 horas para eliminar las células no adherentes. A partir de entonces, se realizaron cambios de la mitad del medio dos veces por semana y se realizaron pases adicionales a las CEM como se describe a continuación.

Aislamiento de los fibroblastos dérmicos humanos:

Los fibroblastos se aislaron a partir de muestras de la piel de pacientes sometidos a cirugía estética. Inicialmente, las células se expandieron en MEMD-BG suplementado con glutamina (PAA), penicilina/estreptomicina (PAA) y SFT al 10 % (Biochrom, Berlín, Alemania). A continuación, las células en los pases del 3 al 5 se transfirieron a condiciones de cultivo de LPH como se describió anteriormente.

Microscopía electrónica de barrido:

La matriz de gel de LPH/CEM humanas se fijó en glutaraldehído al 3 % durante al menos 1 hora a temperatura ambiente, se lavó con PBS y se deshidrató al incubar consecutivamente en etanol al 30 %, 50 %, 70 %, 90 % y 100 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, los geles de LPH se secaron al punto crítico en CO₂ líquido y se recubrieron por pulverización catódica con una capa de oro de 30 nm mediante el uso de un dispositivo de recubrimiento por pulverización catódica de iones (LEICA EM SCD 500). Las muestras se analizaron mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido ambiental en la instalación del microscopio electrónico, de la Universidad Técnica de Aquisgrán (ESEM XL 30 FEG, FEI, Philips, Eindhoven, Países Bajos).

Tinción de cortes histológicos con HE:

Para el análisis histológico, los geles de LPH con las células cultivadas en la superficie, se fijaron en formaldehído al 3,7 % durante 24 horas. Las construcciones se incorporaron en parafina, se orientaron en el plano perpendicular, se cortaron con un micrótopo rotatorio de 2 µm de grosor (Leica, Wetzlar, Alemania) y se tiñeron con hematoxilina y eosina de acuerdo con los protocolos de histología de rutina.

Ensayo de proliferación y análisis de vitalidad:

La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo de metil tiazolil tetrazolio (MTT). Brevemente, las CEM de los pases del 3-6 se sembraron en placas de 96 pocillos (3000 células/cm²) en geles de LPH en medio de cultivo suplementado con LPH al 1 %, 5 %, 10 % o 20 %. Después de 7 días, las células se lavaron con PBS y se incubaron con MTT 1 mM (Sigma Aldrich, San Luis, MO, EE. UU.) durante 3,5 horas a 37 °C. El exceso de solución se desechó y los cristales de formazán se resolvieron en HCl 4 mM en isopropanol (ambos de Roth, Karlsruhe, Alemania). La absorbancia se midió a 590 nm mediante el uso de un lector de placas Tecan Infinite 200 (Tecan Trading, Suiza). Cada medición incluyó cuatro réplicas técnicas. Alternativamente, la proliferación se estimó mediante la tinción con éster de N-succidimil carboxifluoresceína diacetato (CFSE) como se describió anteriormente. Además, la tinción nuclear o la tinción de muertas y vivas se realizó con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; Molecular Probes) o con 5 µg/mL de diacetato de fluoresceína (Sigma) y 0,5 µg/mL de yoduro de Propidio (BD Pharmingen) respectivamente, después de 7 días de cultivo en PCT o en geles de LPH y se analizaron con un microscopio de fluorescencia Leica DM IL HC.

Ensayo de unidad formadora de colonias de fibroblastoides (UFC-f):

El ensayo UFC-f se realizó al colocar CMN en una serie de dilución limitante en placas de 96 pocillos (330 000; 100 000; 33 000; 10 000; 3000; y 1000 células por pocillo; al menos 24 pocillos por etapa de dilución en cada experimento) en paralelo tanto en PCT como en el gel de LPH. El medio se cambió después de 48 horas por primera vez y luego dos veces por semana. Después de 14 días en cultivo, las células se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con MTT. Todos los pocillos con crecimiento celular obtuvieron resultados positivos y la frecuencia de UFC-f se determinó mediante estadísticas de Poisson (L-calc; Stem Cell Technologies; Vancouver, Canadá).

Pases y cultivo a largo plazo de CEM:

Las CEM se expandieron continuamente sobre PCT después de alcanzar un nivel de confluencia del 80 % mediante el uso de una solución de tripsina-EDTA al 0,25 % (Sigma Aldrich, San Luis, MO, EE. UU.). Las células en gel de LPH se colectaron junto con el gel mediante pipeteo. De ese modo, la mezcla de gel-CEM se diluyó con medio de cultivo y luego se sembró en placas con pocillos recubiertos con el gel de LPH reciente. Para determinar el número de células CEM, se sembró una fracción de la mezcla de CEM/gel de LPH en PCT durante 24 horas para facilitar la adhesión a la superficie del plástico. A continuación, las células adherentes al plástico se tripsinizaron y finalmente se determinó el número de células mediante el uso de una cámara de recuento de Neubauer (Brand, Wertheim, Alemania). Se calcularon las duplicaciones de la población celular por pase (DPP) y las duplicaciones de la población acumulada (DPa) como se conoce en la técnica. Alternativamente, la mezcla de gel de CEM/gel de LPH se incubó con 20 µg de plasmina (solución madre a 2,76 mg/mL; Enzyme Research Laboratories, Indiana, EE. UU.) durante 18 horas a 37 °C.

Las CEM en el gel de LPH se colectaron mediante pipeteo con o sin incubación adicional con la tripsina/EDTA durante 5 minutos, o con la plasmina como se describió anteriormente. Todas las células se volvieron a sembrar en PCT y después de 1 día se estimó el número de células adherentes y no adherentes mediante el uso del ensayo de MTT.

Análisis inmunofenotípico:

Para la caracterización de las CEM se usó un panel de marcadores de superficie. Las CEM se aislaron y cultivaron durante tres pases en PCT o en el gel de LPH. Para eliminar el gel de LPH antes del análisis por citometría de flujo, hemos sembrado las células para un pase adicional en PCT o hemos recolectado el gel de LPH mediante pipeteo y lavado las células una vez en medio de cultivo. Cada preparación celular se tiñó en paralelo con los siguientes anticuerpos monoclonales: anti CD14 humano de ratón-APC (clon M5E2), CD29-PE (clon MAR4), CD31-PE (clon WM59), CD34-APC (clon 8G12), CD45-APC (clon HI30), CD73-PE (clon AD2), CD90-APC (clon 5E10) (todos de BD Bioscience, Heidelberg, Alemania) y anti CD105-FITC (clon MAR-226; ImmunoTools, Friesoythe, Alemania). El análisis se realizó mediante el uso de un citómetro FACS Canto II (BD Bioscience, Heidelberg, Alemania) y los datos recolectados se analizaron con el programa WinMDI 2.9 (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry). Para la comparación estadística de las diferentes mediciones, se normalizaron las intensidades de fluorescencia a las correspondientes mediciones de autofluorescencia.

Diferenciación *in vitro*:

Las CEM recién aisladas se sembraron directamente en geles de LPH o PCT y se expandieron durante tres pases antes de la diferenciación *in vitro*. A continuación, se indujo la diferenciación hacia el linaje osteogénico, adipogénico y condrogénico, como se conoce en la técnica. Esta diferenciación de las CEM-gel de LPH se realizó en el gel de LPH o luego de la transferencia a PCT. La diferenciación condrogénica se realizó en el cultivo de sedimentos 3D luego de la centrifugación a 400 x g durante 7 min. Después de tres semanas, se analizó la diferenciación mediante la tinción con Rojo de Alizarina (diferenciación osteogénica), con el colorante verde fluorescente BODIPY (4,4-difluoro-1,2,5,7,8-pentametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno; Molecular Probes, Eugene, EE. UU.; diferenciación adipogénica), o con

azul Alcian y rojo nuclear rápido (para las secciones de muestras diferenciadas condrogénicas) de acuerdo con los protocolos de histología de rutina, y se analizaron con un microscopio de fluorescencia Leica DM IL HC (Leica, Wetzlar, Alemania). Además, la diferenciación adipogénica se cuantificó en PCT y en gel de LPH por contratinción de todas las células con DAPI y el recuento directo de las células no diferenciadas en relación con las células diferenciadas (al menos 300 células por experimento).

Estadísticas:

Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar de los experimentos independientes. Para estimar la probabilidad de las diferencias, hemos adoptado la prueba T de Student bilateral de datos emparejados.

Liofilización:

La congelación se realiza al colocar el gel en un frasco de liofilización y rotar el frasco en un congelador de carcasa, el cual se enfría mediante refrigeración mecánica, hielo seco y metanol, o nitrógeno líquido. A mayor escala, la congelación se puede lograr mediante el uso de una máquina liofilizadora. En esta etapa, es importante enfriar el material por debajo de su punto triple, la temperatura más baja a la que pueden coexistir las fases sólida y líquida del material. Esto garantiza que ocurrirá la sublimación en lugar de la fusión en las siguientes etapas. Los cristales más grandes son más fáciles de liofilizar. Para producir cristales más grandes, el producto debe congelarse lentamente o se puede subir y bajar la temperatura en un ciclo (templado). Las temperaturas de congelación se encuentran entre -50 °C y -80 °C.

Durante la fase de secado primario, la presión se reduce (hasta el intervalo de unos pocos milibares) y se suministra suficiente calor al gel congelado para que el hielo se sublime. En esta fase de secado inicial, se sublima aproximadamente el 95 % del agua en el material. Esta fase puede ser lenta porque, si se añade demasiado calor, la estructura del material podría alterarse. En esta fase, la presión se controla mediante la aplicación del vacío parcial. El vacío acelera la sublimación, lo cual lo hace útil como proceso de secado deliberado. Además, una cámara de condensador fría y/o placas de condensador proporcionan una superficie para que el vapor de agua se vuelva a solidificar. Las temperaturas del condensador suelen estar por debajo de -50 °C (-60 °F).

La fase de secado secundario tiene como objetivo eliminar las moléculas de agua no congeladas, ya que el hielo se eliminó en la fase de secado primaria. En esta fase, la temperatura se eleva por encima de la fase de secado primario, e incluso puede estar por encima de 0 °C, para romper cualquier interacción fisicoquímica que se haya formado entre las moléculas de agua y el material congelado. La presión también puede reducirse en esta etapa para estimular la desorción (por ejemplo, en el intervalo de los microbars o las fracciones de pascal).

Luego de que se completa el proceso de liofilización, se rompe el vacío con un gas inerte, como el nitrógeno, antes de sellar el material. Al final de la operación, el contenido final de agua residual en el producto es extremadamente bajo, de alrededor del 1 % al 4 %.

Resultados:

Las células cultivadas en el gel de LPH derivado de un material de LP seco liofilizado muestran tasas de proliferación y expansión celular similares, y no se puede observar ningún efecto de la liofilización sobre el potencial de diferenciación y el perfil del inmunofenotipo de las CEM sembradas en comparación con el gel de LPH recién preparado sin liofilización (Figura 1). Mediante el uso del gel de LPH derivado de un material de LP seco liofilizado, el cultivo de las CEM a largo plazo reveló los mismos resultados sin diferencias en las propiedades de crecimiento celular (Figura 2). Las mediciones de la proliferación celular revelaron un gel estable en diferentes condiciones de almacenamiento. En particular, un gel de LPH derivado de un material de LP seco liofilizado que se almacenó durante una semana a temperatura ambiente (TA), a 4 °C o a 37 °C es aún estable y la proliferación celular incluso parece aumentar mediante el uso de dicho gel (Figura 3). En total, este método facilita el transporte del material de gel y garantiza una mayor vida útil del gel de lisado de plaquetas sin ningún impacto en las propiedades del cultivo celular.

Por ejemplo, el método de acuerdo con la invención, comprende las siguientes etapas: Al principio, las unidades de plaquetas sanguíneas humanas se lisan mediante un proceso de congelación-descongelación. Luego de la centrifugación y la filtración, se colecta el lisado de plaquetas. A continuación, el lisado de plaquetas se seca mediante la liofilización para producir un material de lisado de plaquetas humanas seco (gel de LPH-Lio). El material de LP seco liofilizado puede reconstituirse fácilmente mediante la adición de agua en el lugar de uso para proporcionar un gel de lisado de plaquetas (gel de LPH) completamente funcional que puede usarse para cultivar células vivas sin ninguna limitación. La gelatinización del lisado de plaquetas, la cual está libre de cualquier sustancia inhibidora de la gelatinización, tal como la heparina, se produce de forma espontánea a aproximadamente 37 °C, lo cual da como resultado el gel de lisado de plaquetas. Por consiguiente, el lisado de plaquetas sanguíneas se deja gelatinizar a aproximadamente 37 °C para obtener un gel de lisado de plaquetas humanas (gel de LPH). Para modificar el gel de LPH, puede añadirse un medio de cultivo celular adecuado y/o suplementos adecuados al material del gel, luego de que el gel de LPH-Lio se haya disuelto con agua.

Literatura diferente de patentes

- 5 Blande, I.S.; Bassaneze, V.; Lavini-Ramos, C.; Fae, K.C.; Kalil, J.; Miyakawa, A.A.; Schettert, I.T.; Krieger, J.E.: Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. *Transfusion* 49: 2680-2685; 2009.
- 10 Heiskanen, A.; Satomaa, T.; Tiitinen, S.; Laitinen, A.; Mannelin, S.; Impola, U.; Mikkola, M.; Olsson, C.; Miller-Podraza, H.; Blomqvist, M.; Olonen, A.; Salo, H.; Lehenkari, P.; Tuuri, T.; Otonkoski, T.; Natunen, J.; Saarinen, J.; Laine, J.: N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem Cells* 25:197-202; 2007.
- 15 Horn, P.; Bokermann, G.; Cholewa, D.; Bork, S.; Walenda, T.; Koch, C.; Drescher, W.; Hutschenreuther, G.; Zenke, M.; Ho, A.; Wagner, W.: Comparison of Individual Platelet Lysates for Isolation of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Cytotherapy* 12: 888-898; 2010.
- Sundin, M.; Ringden, O.; Sundberg, B.; Nava, S.; Gotherstrom, C.; Le Blanc K.: No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica* 92: 1208-1215; 2007.
- 20 Walenda, G.; Hemeda, H.; Schneider, R.K.; Merkel, R.; Hoffmann, B.; Wagner, W.: Human platelet lysate gel provides a novel three dimensional-matrix for enhanced culture expansion of mesenchymal stromal cells. *Tissue Engineering Part C, Volumen 18, No. 12*, 924-934; 2012.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un material de lisado de plaquetas seco liofilizado como material listo para usar para preparar un sustrato gelatinoso tridimensional para cultivar células, en donde el material de lisado de plaquetas liofilizado está libre de cualquier sustancia inhibidora de la gelatinización.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células son células estromales mesenquimales.

10

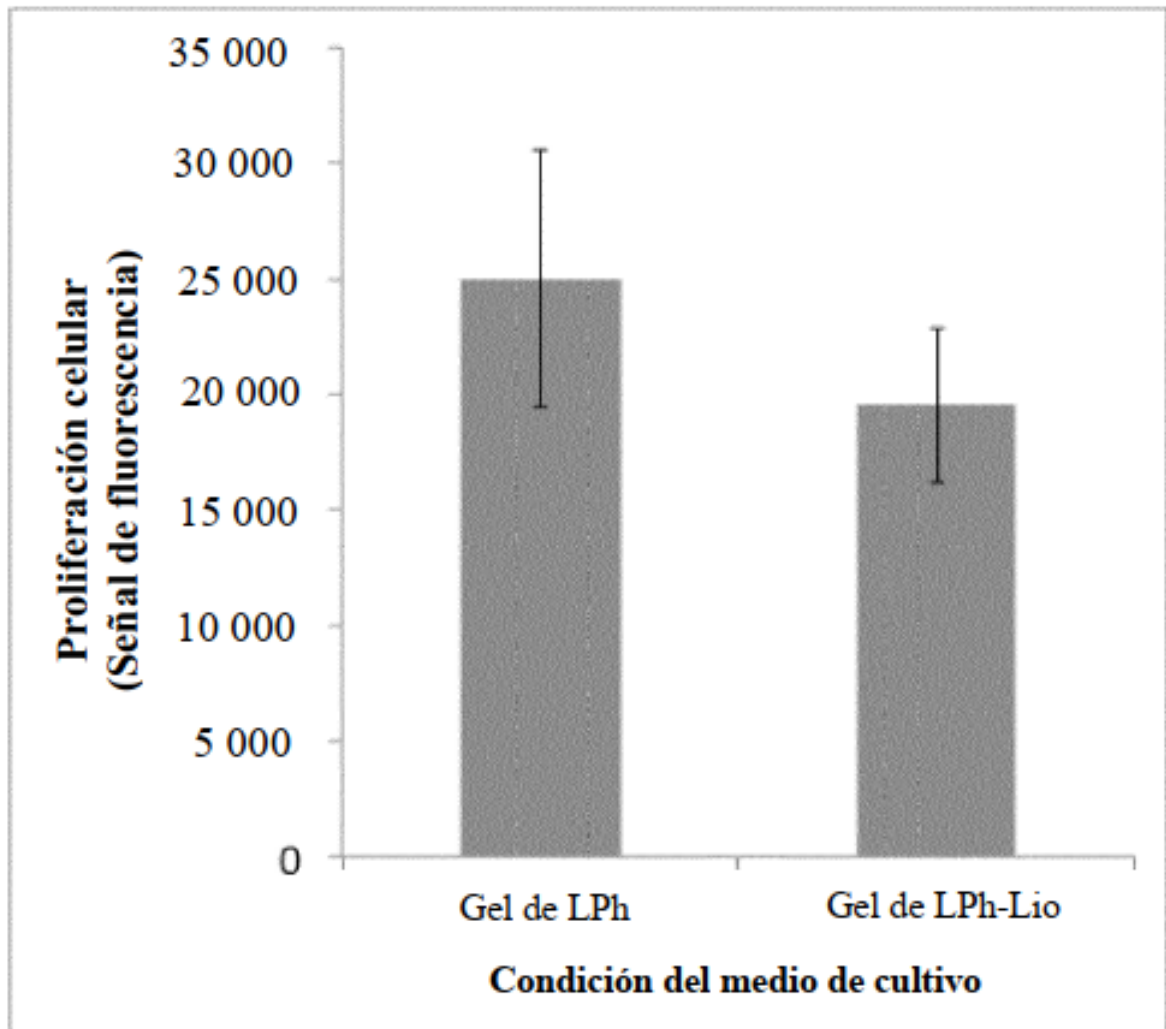
Figura 1

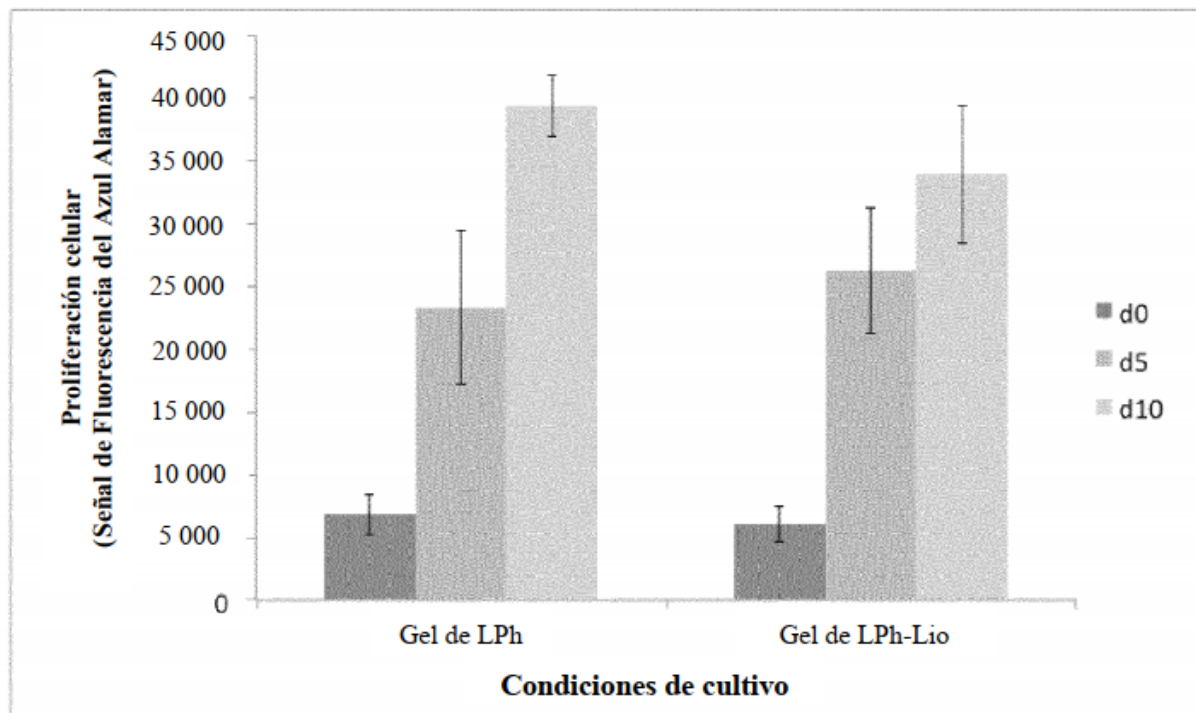
Figura 2

Figura 3