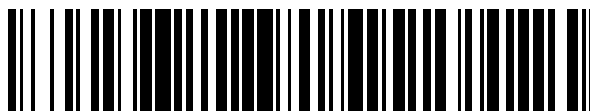


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 280**

51 Int. Cl.:
A61K 35/14 (2006.01)
A61K 33/06 (2006.01)
A61L 27/10 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02761332 .2**
96 Fecha de presentación: **09.08.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1416943**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2004**

54 Título: **Implantes de tejido y método para la preparación y utilización de los mismos**

30 Prioridad:
09.08.2001 US 311216 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2012

73 Titular/es:
Intini, Giuseppe
170 Brookline Avenue, 212
Boston MA 02215 , US y
Andreana, Sebastiano

72 Inventor/es:
INTINI, Giuseppe;
ANDREANA, Sebastiano;
BOBEK, Libuse Anna y
DZIAK, Rosemary

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 386 280 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

Implantes de tejido y método para la preparación y utilización de los mismos.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere de manera general a la reparación de tejidos, y más concretamente a una matriz bioactiva, a métodos de preparación de dicha matriz, y a métodos de utilización de dicha matriz para estimular la formación de tejido duro.

Antecedentes de la invención

10 La formación de hueso es un proceso dinámico que se inicia durante la embriogénesis y continúa, mediante remodelado, durante la vida adulta. Ocasionalmente el hueso también puede regenerarse cuando se requiere la reparación ósea. Para la formación de hueso se requiere una compleja serie de sucesos, incluyendo el crecimiento y diferenciación celulares conjuntamente con la formación de matriz extracelular. Tiene lugar una secuencia similar de sucesos durante la reparación ósea.

15 El proceso de reparación y regeneración óseas es similar al proceso de cicatrización de heridas en otros tejidos. En general, en respuesta a una lesión, las células mesenquimales del tejido circundante migran hacia el sitio de la herida y se diferencian en cartílago o células óseas. Una secuencia típica de sucesos incluye: hemorragia, formación de coágulo, disolución del coágulo con eliminación concurrente de tejidos dañados, crecimiento de tejido de granulación, formación de cartílago, crecimiento capilar y renovación del cartílago, formación ósea rápida (tejido calloso) y, finalmente, remodelado del callo en hueso cortical y trabecular. Por lo tanto, la reparación ósea es un proceso complejo en el que participan muchos tipos celulares y moléculas reguladoras. Entre las diversas poblaciones celulares implicadas en la reparación de fracturas se incluyen células madre, macrófagos, fibroblastos, células vasculares, osteoblastos, condroblastos y osteoclastos.

20 También participan muchos factores de crecimiento en el proceso de regeneración. Entre ellos se incluyen, por ejemplo, miembros de la familia de la proteína morfogénica ósea (BMP), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y miembros de la familia del factor de crecimiento insulínico (IGF). El PDGF, por ejemplo, se ha demostrado que estimula la replicación de las células óseas y la síntesis de ADN tanto en hueso calvaria intacto y en osteoblastos de rata aislados. Entre otros factores de crecimiento u hormonas que se ha informado que presentan la capacidad de estimular la formación de hueso nuevo se incluyen el factor de crecimiento fibroblástico ácido, estrógenos, factor estimulante de las colonias de macrófagos y agentes reguladores del calcio, tales como la hormona paratiroidea (PTH).

25 Entre otros factores reguladores que es conocido que participan en la reparación ósea se incluyen hormonas sistémicas, citoquinas, factores de crecimiento y otras moléculas que regulan el crecimiento y la diferenciación. Se han purificado diversos agentes osteoinductores que se ha demostrado que son moléculas de tipo polipéptido factor de crecimiento. Puede encontrarse una fuente abundante de factores de crecimiento osteogénico en plasma rico en plaquetas. Las plaquetas presentan gránulos que contienen factores de crecimiento tales como PDGF, TGF- β y otros, que ayudan a acelerar la angiogénesis y la osteogénesis.

30 Las técnicas de reconstrucción ósea, tales como las utilizadas para reconstruir defectos que se producen como resultado de un traumatismo, cirugía del cáncer o errores del desarrollo, resultarían mejoradas por nuevos métodos de estimulación de la reparación ósea. Los métodos reconstructivos utilizados actualmente, tales como la utilización de injertos óseos autólogos o injertos óseos con tejido blando y vasos sanguíneos unidos, se asocian a desventajas significativas de tanto coste como dificultad. Por ejemplo, no resulta fácil recolectar una cantidad útil de hueso autólogo, e incluso los injertos autólogos con frecuencia se infectan o sufren de resorción.

35 Los métodos anteriores de inducción del crecimiento óseo han utilizado implantes sintéticos, o matrices, para proporcionar un soporte al crecimiento óseo utilizando materiales tales como el colágeno. Durante el diseño de una matriz bioactiva debe darse particular consideración a las características siguientes: biocompatibilidad, andamiaje (la capacidad de una matriz de permitir la migración y proliferación de células específicas de tejido), relleno (la capacidad de relleno y por lo tanto la conservación de la forma original del sitio de regeneración), efecto barrera (la capacidad de excluir células no relacionadas procedentes de la repoblación del sitio de regeneración) y función portadora (la capacidad del injerto artificial de portar y transportar factores bioactivos). Sin embargo, una de las limitaciones más importantes en el diseño de una matriz bioactiva sigue siendo la incapacidad de determinar qué factores de crecimiento y moléculas de adhesión celular finalmente favorecen y controlan la histogénesis.

40 Varios grupos han investigado la posibilidad de utilizar proteínas y polipéptidos estimulantes óseos para influir sobre la reparación ósea *in vivo*. Sin embargo, existen muchas desventajas asociadas a este tipo de protocolos de tratamiento, incluyendo el tiempo y coste de purificar las proteínas recombinantes. Además, tras su administración en un animal, los polipéptidos pueden ser más inestables de lo deseado generalmente para un agente terapéutico, y

pueden ser susceptibles de ataque proteolítico. Además, la administración de proteínas recombinantes pueden iniciar diversas respuestas inmunológicas de inhibición o de otro modo perjudiciales. Algunas limitaciones adicionales con frecuencia se relacionan con la incapacidad del portador de llevar niveles significativos del agente activo al sitio de crecimiento deseado. Por ejemplo, se han sometido a ensayo muchos materiales para la liberación sostenida de PDGF. El poli-L-láctido (PLLA), aunque se utiliza comúnmente, aparentemente resulta reabsorbido con excesiva rapidez. Se han propuesto modificaciones del PLLA como ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) con una tasa de resorción mejorada y prolongada. Sin embargo, en ambos casos la unión celular puede ser limitada. Además, estos polihidroxiácidos pueden generar productos secundarios de degradación ácida en los sitios de implantación con una reacción no deseable del tejido. Recientemente se han propuesto otras modificaciones, tales como la combinación de PLLA con quitosano (un compuesto sintético estructuralmente similar al glucosaminoglicano de la matriz extracelular) para limitar la reacción del tejido debida al compuesto ácido y para mejorar la unión celular. Además, se han utilizado discos de colágeno o gel de metilcelulosa para administrar el PDGF, con resultados limitados debido a la rápida tasa de resorción. La característica aniónica de los cristales de hidroxiapatito se ha utilizado recientemente para transportar moléculas bioactivas catiónicas tales como el PDGF. El tejido óseo regenerado en este caso resulta cualitativamente alterado por la presencia de hidroxiapatito sintético, un compuesto no reabsorbible. En cada uno de estos casos, falta esencialmente alguna de las propiedades requeridas de una matriz biológica. En algunos casos se sacrifica el andamiaje para favorecer la liberación, mientras que en otros casos se sacrifica el relleno de tejido en favor del andamiaje.

Además de la terapia de factor de crecimiento, los métodos anteriores de inducción del crecimiento óseo han contemplado la utilización de la terapia génica. Sin embargo, en la actualidad existen algunas limitaciones al transporte de ADN plasmídico en tejidos diferentes del hepático y el muscular. Los esfuerzos iniciales de la terapia génica somática se han basado en medios indirectos de introducir genes en los tejidos, denominados terapia génica *ex vivo*, por ejemplo se extraen células diana del cuerpo, se transfectan o se infectan con vectores que portan genes recombinantes y se reimplantan en el cuerpo ("transferencia de células autólogas"). En la actualidad se dispone de una diversidad de técnicas de transfección que pueden utilizarse para transferir ADN al interior de las células *in vitro*, entre ellas la precipitación de ADN con fosfato de calcio, la transfección con DEAE-dextrano, la electroporación, la transferencia de ADN mediada por liposomas o la transducción con vectores víricos recombinantes. Se han propuestos dichos protocolos de tratamiento *ex vivo* para transferir ADN a una diversidad de diferentes tipos celulares, incluyendo las células epiteliales (patente US nº 4.868.116; Morgan y Mulligan, patente WO nº 87/00201; Morgan *et al.*, Science 237:1476-1479, 1987; Morgan and Mulligan, patente US nº 4,980,286), las células endoteliales (patente WO nº 89/05345), los hepatocitos (patente WO nº 89/07136; Wolff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3344-3348, 1987; Ledley *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:5335-5339, 1987; Wilson y Mulligan, patente WO nº 89/07136; Wilson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 87:8437-8441, 1990), fibroblastos (Palmer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:1055-1059, 1987; Anson *et al.*, Mol. Biol. Med. 4:11-20, 1987; Rosenberg *et al.*, Science 242:1575-1578, 1988; Naughton y Naughton, patente US nº 4.963.489), linfocitos (Anderson *et al.*, patente US nº 5.399.346; Blaese, R. M. *et al.*, Science 270:475-480, 1995) y células madre hematopoyéticas (Lim B. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8892-8896, 1989, y Anderson *et al.*, patente US nº 5.399.346).

Para mejorar la eficiencia de transfección en otros tejidos, varios estudios proponen el recubrimiento del ADN plasmídico con diferentes combinaciones de lípidos y polímeros. Por ejemplo, el recubrimiento de una molécula de ADN con lípidos cargados positivamente favorece la incorporación del ADN por parte de las células. Se ha intentado la transferencia génica *in vivo* directa con formulaciones de ADN atrapadas en liposomas (Ledley *et al.*, J. Pediatrics 110:1, 1987) o en proteoliposomas que contienen proteínas receptoras de cubierta vírica (Nicolau *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1068, 1983) y ADN acoplado a un complejo portador de polilisina-glucoproteína. Además, se han utilizado "pistolas génicas" para el transporte de genes al interior de células (patente australiana nº 9068389). Se ha conjeturado incluso que el ADN desnudo o el ADN asociado a liposomas pueda formularse en soluciones portadoras líquidas para la inyección en espacios intersticiales para la transferencia del ADN al interior de las células (Felgner, patente WO nº 90/11092).

La patente EP nº 01 066 838 A1 da a conocer una composición para la regeneración del tejido óseo y un método para la preparación de dicha composición, que se utiliza principalmente, aunque no exclusivamente, en cirugía oral, y que consiste de un gel rico en factores de crecimiento plasmático (gel PRGF) obtenidos a partir de la sangre del paciente. Según el método dado a conocer en dicha patente para producir un gel, se añade cloruro de calcio a plasma rico en factores en forma de una solución acuosa. Alternativamente, puede añadirse cloruro de calcio (junto a trombina humana) en forma de un sólido con el fin de obtener el gel instantáneamente, es decir, en 3 a 10 segundos.

La patente US nº A-5 733 545 da a conocer un concentrado de plasma-capa leucocitaria que comprende plasma, plaquetas y fibrinógeno y un método para preparar dicho concentrado. El concentrado puede combinarse con un activador de fibrinógeno para formar un sellador de heridas de adhesivo plaquetario. Habitualmente se utiliza trombina como activador del fibrinógeno. Para producir trombina a partir de protrombina, se utiliza sal de calcio, por ejemplo en forma de una solución acuosa al 10% de cloruro de calcio.

La patente WO nº 01/43755 A2 da a conocer un adyuvante regenerativo que comprende plasma rico en plaquetas y fosfato de calcio, para la utilización en defectos de la piel y óseos en seres vivos y un método para la preparación de dicho adyuvante.

5 Quizás uno de los mayores problemas asociados a las terapias génicas diseñadas actualmente, sea *ex vivo* o *in vivo*, es la incapacidad de transferir ADN eficientemente a una población celular diana y alcanzar un nivel de expresión elevado del producto génico *in vivo*. Los vectores víricos se consideran el sistema más eficiente, y los vectores víricos recombinantes deficientes en replicación se han utilizado para transducir (es decir, infectar) las células tanto *ex vivo* como *in vivo*. Entre dichos vectores se incluyen vectores retrovíricos, adenovíricos y adenoasociados y virus herpes. Aunque resultan altamente eficientes en la transferencia génica, entre las
10 principales desventajas asociadas a la utilización de los vectores víricos se incluyen la incapacidad de muchos vectores víricos de infectar células que no se encuentran en división, problemas asociados a la mutagénesis por inserción, reacciones inflamatorias contra el virus y la producción potencial de virus ayudantes y/o la producción y transmisión de virus perjudiciales a otros pacientes humanos.

15 Además de la baja eficiencia de la mayoría de tipos celulares en la incorporación y expresión de ADN foráneo, muchas poblaciones celulares diana se encuentran presentes en números tan bajos que la eficiencia de la presentación del ADN a los tipos celulares diana específicos es todavía más reducida. En la actualidad, existe una necesidad de métodos mejorados para incrementar la eficiencia con la que se dirige el ADN a la población celular diana.

20 Los defectos en el proceso de reparación y regeneración óseas se asocian al desarrollo de varias enfermedades y trastornos humanos, por ejemplo la osteoporosis y la osteogénesis imperfecta. El fallo del mecanismo de reparación ósea evidentemente también se asocia a complicaciones significativas en la práctica ortopédica clínica, por ejemplo la no unión fibrosa tras una fractura ósea, los fallos de la interfaz de un implante y los fallos de grandes aloinjertos. Por lo tanto, todavía existe una necesidad de otras matrices, y de métodos más eficientes para preparar dichas matrices, y de métodos de utilización de dichas matrices para inducir el crecimiento óseo, así como para utilizar
25 dichas matrices conjuntamente con terapia génica.

Descripción resumida de la invención

La invención proporciona una familia de matrices biocompatibles biodegradables que pueden utilizarse para estimular el crecimiento de tejidos en un mamífero. Las matrices resultan particularmente útiles para estimular la formación de tejido duro, por ejemplo la formación de hueso o cartílago, y de esta manera pueden utilizarse para
30 reparar defectos en tejido duro. Bajo determinadas circunstancias puede resultar útil incluir plaquetas en la matriz, que, al activarse, liberan factores de crecimiento, por ejemplo PDGF y TGF- β , que potencian la formación de nuevo tejido. Hasta el momento, las plaquetas típicamente se han activado mediante exposición a trombina purificada, por ejemplo trombina bovina purificada. Sin embargo, la activación de las plaquetas con trombina bovina puede resultar no deseable debido a que: (i) la trombina bovina puede no haber sido totalmente caracterizada y puede variar de lote a lote, e (ii) este enfoque presenta el riesgo inherente de transmitir agentes no deseados, por ejemplo priones, desde
35 la fuente de la trombina hasta el receptor pretendido de la matriz.

La invención se basa en parte en el descubrimiento de que resulta posible activar las plaquetas mediante la exposición de las mismas, por ejemplo presentes en plasma rico en plaquetas, a un proceso en el que un sulfato de calcio exotérmico parcial o totalmente deshidrato se rehidrata en solución acuosa. Mediante la utilización de este
40 enfoque no resulta necesario preactivar las plaquetas mediante exposición a trombina. Las matrices resultantes contienen tanto cristales de sulfato de calcio, que puede resultar útil para ayudar al crecimiento óseo, y plaquetas activadas que inducen el crecimiento óseo. Por lo tanto, las matrices resultantes no presentan los problemas inherentes asociados a la activación de plaquetas con trombina.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "plasma rico en plaquetas" se entiende que se refiere a cualquier preparación de plasma que presenta una densidad más alta, más preferentemente dos veces la densidad, y todavía más preferentemente cuatro veces la densidad, de plaquetas que la muestra de sangre a partir de la que se ha derivado el plasma. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "sulfato de calcio exotérmico" se entiende que se refiere a cualquier sal sulfato de calcio que, en combinación con una solución acuosa, incrementa la temperatura de la solución acuosa y produce una red cristalina capaz de dar soporte a la formación de tejido. El
50 sulfato de calcio exotérmico se encuentra parcial o totalmente deshidrato y, por lo tanto, comprende menos de dos moléculas de agua, y más preferentemente menos de una molécula de agua, por cada ión calcio.

En un aspecto, la invención proporciona un método *ex vivo* para activar las plaquetas. El método comprende proporcionar una muestra fluida que contiene plaquetas, por ejemplo plasma rico en plaquetas, a una primera temperatura. A continuación, se añade sulfato de calcio exotérmico a la muestra en una cantidad suficiente para
55 incrementar la temperatura de la muestra hasta un umbral. Tras alcanzar la solución una temperatura igual o superior al umbral, se activa una parte de las plaquetas en la muestra. La matriz resultante contiene plaquetas

activadas por sulfato de calcio. La matriz puede encontrarse sustancialmente libre de actividad de trombina, y sustancialmente libre de plaquetas activadas por trombina.

5 La expresión "plaquetas activadas con sulfato de calcio" se entiende que se refiere a una muestra o preparación de plaquetas en la que las plaquetas han sido activadas, por ejemplo estimuladas para producir factor de crecimiento derivado de plaquetas, mediante exposición de las mismas a sulfato de calcio exotérmico. Tal como se utiliza en la presente memoria, una muestra o preparación que contiene plaquetas se entiende que se encuentra "sustancialmente libre de actividad de trombina" en el caso de que la preparación o muestra no contenga suficiente actividad de trombina para inducir un incremento detectable de concentración de un complejo de monómero de fibrina soluble en una solución que contiene fibrinógeno al someterla a ensayo mediante prueba de aglutinación en látex.

10 En una realización, la muestra se proporciona a temperatura ambiente, por ejemplo a temperatura de laboratorio, más concretamente a aproximadamente 20°C. Sin embargo, la adición de la sal preferentemente provoca que la muestra se caliente hasta una temperatura comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 50°C, y más preferentemente una temperatura comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 45°C. Las plaquetas entonces resultan activadas por la exposición a la temperatura elevada y liberan determinados factores de crecimiento, por ejemplo PDGF y TGFβ.

15 En otro aspecto, la invención proporciona una matriz bioactiva que comprende sulfato de calcio cristalino y plaquetas activadas con sulfato de calcio, para la utilización en un método de estimulación de la formación ósea en un sitio preseleccionado en un mamífero. El método comprende la etapa de proporcionar en el locus la matriz bioactiva, en el que la matriz bioactiva estimula la formación de hueso en el sitio. La matriz preferentemente se encuentra sustancialmente libre de actividad de trombina y/o se encuentra sustancialmente libre de plaquetas activadas por trombina.

20 En una realización, la matriz bioactiva puede utilizarse para estimular la formación de hueso en el sitio de un defecto óseo, por ejemplo una cavidad o fractura. Se contempla que los dispositivos de la invención puedan resultar particularmente útiles para tratar la no unión de fracturas óseas.

25 En otra realización, la matriz comprende además un aditivo, tal como un factor de crecimiento, un antibiótico u otro agente farmacéuticamente activo, o un agente para la terapia génica. En una realización preferente, la matriz comprende además un factor de crecimiento. La matriz puede contener un factor de crecimiento seleccionado de entre el grupo que consiste de BMP, FGF, PDGF e IGF. Sin embargo, en una realización preferente, la matriz comprende además uno o más de entre PDGF y VEGF.

30 En otra realización, la matriz bioactiva comprende además un ácido nucleico, por ejemplo un vector, que presenta una secuencia de nucleótidos codificante de un gen preseleccionado expresable en el sitio. El ácido nucleico preferentemente es capaz de transfectarse en células y expresarse en las mismas en el sitio preseleccionado. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, las matrices de la invención pueden utilizarse para administrar un ácido nucleico codificante de una secuencia de nucleótidos de sentido o antisentido con el fin de facilitar la terapia génica en un sitio preseleccionado en el mamífero.

35 Sin embargo, se contempla que las matrices de la invención puedan comprender uno o más de entre un ácido nucleico para facilitar la terapia génica, un medicamento, por ejemplo un agente bioactivo tal como un antibiótico, y un factor de crecimiento. Se contempla que la elección de dichos aditivos dependa del uso pretendido de la matriz.

40 En otra realización, la matriz preferentemente es una red cristalina dimensionada para que permita la infiltración, proliferación y diferenciación de las células, por ejemplo las células progenitoras óseas, por ejemplo los osteoblastos, en el sitio preseleccionado. La matriz resultante es flexible y puede manipularse para producir cualquier forma de interés en el sitio preseleccionado. Por ejemplo, la matriz puede insertarse en una cavidad ósea o fractura y después conformarse para imitar y/o encajar con la estructura ósea original.

45 En otro aspecto, la invención proporciona una matriz bioactiva que comprende una mezcla de sulfato de calcio y plaquetas activadas con sulfato de calcio. La matriz se encuentra sustancialmente libre de actividad de trombina y/o se encuentra sustancialmente libre de plaquetas activadas por trombina. La actividad formadora de tejido de la matriz puede incrementarse mediante la incorporación de un factor de crecimiento, por ejemplo PDGF o una BMP, en la matriz. Además, o alternativamente, la matriz puede comprender además un ácido nucleico codificante de, por ejemplo, un gen preseleccionado expresable en el sitio.

50 En otro aspecto, la invención proporciona una matriz bioactiva multifuncional. La matriz comprende un primer dominio que define otra superficie externa y que comprende sulfato de calcio cristalino y plasma rico en plaquetas. El primer dominio opcionalmente comprende además un primer factor de crecimiento. Dispuesto sobre el primer dominio, y preferentemente en torno a la superficie externa del mismo, se encuentra un segundo dominio que comprende sulfato de calcio cristalino y plasma rico en plaquetas. El segundo dominio opcionalmente comprende

además un segundo factor, diferente, de crecimiento. Sin embargo, por lo menos uno de los dos dominios, aunque preferentemente ambos, comprenden además un factor de crecimiento, en los que el plasma rico en plaquetas del primer dominio comprende plaquetas activadas con sulfato de calcio y/o el plasma rico en plaquetas del segundo dominio comprende plaquetas activadas con sulfato de calcio. Uno de los dominios, aunque preferentemente ambos, se encuentran sustancialmente libres de actividad de trombina y/o se encuentra sustancialmente libre de plaquetas activadas por trombina. Además, el primer dominio y/o el segundo dominio es una red cristalina dimensionada para permitir la infiltración, proliferación y diferenciación de las células progenitoras, por ejemplo las células progenitoras óseas, por ejemplo los osteoblastos. En una realización, el primer dominio opcionalmente comprende un factor de crecimiento, por ejemplo VEGF, que estimula la formación de vasos sanguíneos. En otra realización, el segundo dominio o dominio externo opcionalmente comprende un factor de crecimiento, por ejemplo PDGF y TGF- β , o cualquier otro factor de crecimiento que pueda estimular o incrementar la migración de células, por ejemplo células progenitoras óseas, hacia el interior de la matriz. Sin embargo, la elección de los factores de crecimiento para la incorporación en cada dominio o capa depende de qué tejido se creará en el sitio de interés. Este tipo de dispositivo permite la regeneración de hueso estratificado mediante la atracción de las células progenitoras óseas apropiadas. Tras migrar las células a su localización preferente, seguidamente pueden diferenciarse en el tipo celular apropiado.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico de columnas que muestra la proliferación de los osteoblastos humanos primarios en presencia de diferentes formulaciones de matriz de sulfato de calcio.

La figura 2 es un gráfico de columnas que muestra la proliferación de los osteoblastos humanos primarios en presencia de diferentes formulaciones de matriz de sulfato de calcio.

La figura 3 es un gráfico de columnas que muestra la proliferación de osteoblastos humanos primarios en matrices de sulfato de calcio pretratadas o no pretratadas con una combinación de anticuerpos anti-PDGF y anti-TGF- β .

La figura 4 es un gráfico de columnas que muestra la proliferación de osteoblastos primarios en matrices de sulfato de calcio y Grafton[®] Putty.

25 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona una familia de matrices bioactivas para estimular la formación de tejido, más preferentemente la formación de tejido duro, en un mamífero. Todas las matrices bioactivas comprenden una matriz cristalina de sulfato de calcio y opcionalmente comprenden uno o más de entre una diversidad de aditivos. En una realización, las matrices cristalinas contienen como aditivo, plaquetas activadas, preferentemente plaquetas activadas con sulfato de calcio, en forma de plasma rico en plaquetas. En otra realización, las matrices cristalinas contienen un agente bioactivo, por ejemplo un antibiótico, un factor de crecimiento u otro agente farmacéuticamente activo, que induce o provoca un efecto deseado al implantar la matriz en el receptor. En otra realización, las matrices cristalinas contienen un ácido nucleico, por ejemplo un vector que contiene una secuencia de nucleótidos de interés, para facilitar la terapia génica al implantar la matriz en el receptor. Se contempla que la elección de aditivos para una matriz particular dependa finalmente de la función prevista para la matriz.

La matriz cristalina de sulfato de calcio útil en la práctica de la invención puede generarse utilizando una diversidad de materias primas. Durante la práctica de la invención, se combina sulfato de calcio exotérmico, por ejemplo sulfato de calcio parcial o totalmente deshidratado, con una solución acuosa. Esto resulta en una reacción exotérmica y en la formación de nuevo sulfato de calcio cristalino.

El sulfato de calcio parcial o totalmente deshidrato que resulta útil en la práctica de la invención puede prepararse mediante calcinado de sulfato de calcio dihidrato ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). El calcinado puede controlarse para producir una deshidratación parcial o completa. Dependiendo del método de calcinado, pueden obtenerse diferentes formas del hemihidrato. Estas formas se denominan α -hemihidrato o β -hemihidrato. La forma β es un agregado fibroso de cristales finos con poros capilares, mientras que la forma α consiste de fragmentos de rotura y cristales en forma de barra o prisma. En el caso de que se mezcle el α -hemihidrato con agua, el producto obtenido es más resistente y duro que el resultante del β -hemihidrato.

El hemihidrato de sulfato de calcio también se conoce como yeso de París, hemihidrato de yeso y sulfato de calcio seco. El hemihidrato de sulfato de calcio puede obtenerse a partir de una diversidad de fuentes. Por ejemplo, el hemihidrato de sulfato de calcio de grado médico se encuentra comercialmente disponible de la U.S. Gypsum Company (Chicago, IL). Además, la forma α del hemihidrato de sulfato de calcio puede obtenerse de LIFECORE Biomedical, Chaska, MN, bajo la marca comercial CAPSET[®].

Las matrices de sulfato de calcio se han utilizado durante muchos años como soportes para la formación de tejidos. Además, el sulfato de calcio se ha utilizado de modo seguro en ortopedia durante más de 100 años y en odontología durante aproximadamente 30 años (Peltier, Am. J. Surg. 97:311, 1959; Calhoun *et al.*, J. Dent. Res. 42:1244, 1963;

Sidqui *et al.*, *Biomaterials* 16:1327, 1995; Sottosanti, *Compend. Contin. Educ. Dent.* III 226, 1992; Sottosanti, *Pract. Periodontics Aesthetic. Dent.* 5:61, 1993; Andreana, J. *Periodontal* 69:601, 1998; Andreana, S., Covani, U., *Periodontal Insights* 5:5, 1998; Sato *et al.* *Biomaterials* 19:1895, 1998; Pecora *et al.*, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 84:424, 1997; Anson D., *Compendium* 17:895, 1996; Shaffer C.D., App, G.R., *J Periodontal* 42:685, 1971; y Sottosanti, J. *Dent. Implantol. Update* 4:69, 1993). Estos estudios no muestran efectos adversos del sulfato de calcio, tales como una reacción inflamatoria en el sitio de regeneración.

La capacidad del sulfato de calcio de dar soporte a la formación de tejido (actividad conductora) puede diferenciarse de la capacidad de una matriz de injertación de soportar la inducción de tejido (actividad inductora). Una matriz de regeneración ideal es generadora de tejido, de manera que se permite la formación de tejido (actividad conductora), y además se estimula (actividad inductora).

Una matriz de sulfato de calcio preferente comprende plaquetas activadas, por ejemplo plaquetas activadas con sulfato de calcio, derivadas de plasma rico en plaquetas.

El plasma rico en plaquetas es plasma que contiene plaquetas concentradas y puede prepararse a partir de sangre completa, más preferentemente sangre completa autóloga, utilizando una diversidad de métodos conocidos de la técnica. Por ejemplo, el plasma rico en plaquetas que resulta útil en la práctica de la invención puede prepararse sometiendo sangre completa a centrifugación para separar el plasma rico en plaquetas de los glóbulos rojos. La fracción de plasma rico en plaquetas seguidamente se somete a una segunda ronda de centrifugación para producir un pellet de plaquetas y un sobrenadante de plasma pobre en plaquetas. La mayor parte del plasma pobre en plaquetas puede eliminarse, dejando plaquetas concentradas y una pequeña proporción de plasma pobre en plaquetas. A continuación puede utilizarse el plasma pobre en plaquetas para resuspender las plaquetas concentradas. Las centrifugas utilizadas para preparar el plasma rico en plaquetas pueden obtenerse de una diversidad de fuentes, incluyendo, por ejemplo, la centrífuga PLACON™, que puede obtenerse de OCT USA Inc., Torrence, CA.

Los recuentos de plaquetas de sangre completa se encuentran comprendidos, de media, entre 150×10^3 y $350 \times 10^3/\mu\text{l}$ de sangre: sin embargo, en plasma rico en plaquetas puede conseguirse un incremento de tres o cuatro veces de la concentración de plaquetas. En estado activado, por ejemplo activadas mediante exposición a un agonista, las plaquetas liberan el contenido de cuerpos densos y gránulos α , sintetizan sustancias de fosfolípidos membranales e inician los sucesos de la cascada de la coagulación (Hoffman *et al.*, *Hematology: Basic Principles and Practice*. Philadelphia: Churchill Livingstone Edition, 2000). Los agonistas de plaquetas típicamente se clasifican en fuertes o débiles (Hoffman *et al.*, *supra*, 2000, y Blockmans *et al.*, *Blood Reviews* 9:143, 1995). En una definición, los agonistas fuertes son aquellos que pueden inducir la secreción de gránulos incluso en el caso de que se encuentre bloqueada la agregación. La trombina y el colágeno se consideran ejemplos de agonistas fuertes. En contraste, los agonistas débiles, tales como la adenosina difosfato (ADP) y la epinefrina, requieren la agregación para que se produzca la secreción. Se ha informado de que el calor puede actuar como un agonista débil en la activación plaquetaria (Kurabayashi *et al.*, *Amer. J. Hematol.* 56:244, 1997, y Gader *et al.*, *Brit. J. Hematol.* 74:86, 1990). Tras la activación, los cuerpos densos de las plaquetas, los orgánulos plaquetarios secretados con mayor rapidez, liberan ADP, así como ATP y serotonina. Los gránulos α pueden liberar PDGF, TGF- β 1, péptido III activador de tejido conectivo (CATP III), tromboespondina, factor V, fibrinógeno, factor XI, inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-I) y proteínas adhesivas, tales como fibrinógeno, fibronectina, factor de von Willebrand (vWF) y selectina P (también denominado GMP-140, estructuralmente similar a las selectinas E y L). Los factores citoplasmáticos que pueden encontrarse en las plaquetas son el factor XIII y el factor de crecimiento celular endotelial derivado de plaquetas (PDECGF).

Aunque los cristales de sulfato de calcio sirven de soporte al crecimiento óseo, se ha encontrado que la combinación del sulfato de calcio con plasma rico en plaquetas proporciona a la matriz los factores de coagulación y reparación que habitualmente proporcionan *in vivo* las plaquetas. Se ha demostrado que muchos de dichos elementos de matriz y factores de crecimiento participan en la regulación de la proliferación y diferenciación de las células y en la formación de tejidos. Se ha encontrado en la presente memoria que, al combinar el plasma rico en plaquetas con sulfato de calcio, la reacción exotérmica resultante, que puede calentar la solución hasta una temperatura de entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 50°C, y más preferentemente de entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 45°C, resulta en la formación de cristales de fosfato de calcio que presentan plaquetas activadas dispuestas sobre los mismos. Este enfoque evita la necesidad de preactivar las plaquetas en el plasma rico en plaquetas mediante exposición a trombina u otros agonistas.

Otra matriz de sulfato de calcio preferente comprende sulfato de calcio cristalino y un factor de crecimiento. Entre los factores de crecimiento preferentes se incluyen, por ejemplo, BMP, FGF, PDGF, IGF y VEGF. El PDGF induce actividades multifuncionales en una diversidad de células. El PDGF es mitogénico de las células derivadas del mesoderma, tales como fibroblastos, células musculares lisas vasculares, células gliales y condrocitos. Además, el PDGF es un potente quimioatrayente y activador de neutrófilos, monocitos y fibroblastos. Entre otras actividades del PDGF se incluyen su capacidad de regular la síntesis y degradación de las proteínas de la matriz extracelular y de

estimular la síntesis de factores de crecimiento adicionales. Por lo tanto, el PDGF desempeña un papel esencial en la respuesta celular a la lesión de un tejido, como estimulante del crecimiento y actividad de las células mesodérmicas, y como quimioatrayente de otras células que participan en el proceso de reparación.

- 5 Las matrices que comprenden sulfato de calcio cristalino y un factor de crecimiento pueden formarse mediante combinación de sulfato de calcio exotérmico con el factor de crecimiento en una solución acuosa. La reacción exotérmica resultante, que puede calentar la solución hasta una temperatura de entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 50°C, y más preferentemente de entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 45°C, resulta en la formación de cristales de fosfato de calcio que contienen el factor de crecimiento dispuesto sobre los mismos.
- 10 Otra matriz de sulfato de calcio preferente comprende sulfato de calcio cristalino y un ácido nucleico. En una realización preferente, un vector de ácidos nucleicos codificante de un gen de interés, por ejemplo un gen codificante de un factor estimulante del crecimiento tisular, se combina con la matriz de sulfato de calcio. Dichas matrices pueden formarse mediante la combinación de sulfato de calcio exotérmico y un ácido nucleico de interés en una solución acuosa. La reacción exotérmica resultante, que puede calentar la solución hasta una temperatura de entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 50°C, y más preferentemente de entre aproximadamente 40°C y
- 15 aproximadamente 45°C, resulta en la formación de cristales de fosfato de calcio que presentan el ácido nucleico dispuesto sobre los mismos. Las matrices resultantes, tras su implantación, pueden utilizarse para transfectar células en el sitio de implantación con el fin de facilitar la terapia génica. Aunque la presente realización resulta útil para estimular el crecimiento óseo, también puede utilizarse para estimular el crecimiento de otros tejidos, tales como el tejido vascular o cardiovascular.
- 20 Dentro del contexto de la presente invención, el ácido nucleico de interés puede ser un oligonucleótido, ácido ribonucleico, ácido desoxirribonucleico o ácido peptidil-nucleico de sentido o antisentido. Estas denominaciones son utilizadas convencionalmente en la biología molecular. Brevemente, el término "sentido" se refiere a un ácido nucleico que presenta una secuencia que es homóloga o idéntica a una secuencia diana, mientras que "antisentido" se refiere a un ácido nucleico que presenta una secuencia que es homóloga o idéntica a una secuencia que es
- 25 complementaria a una secuencia diana. De conformidad con los objetivos perseguidos por la presente invención, el ácido nucleico de interés contiene por lo menos un gen de interés y elementos que permiten su expresión en una célula o en un organismo huésped. El ácido nucleico de interés se encuentra ventajosamente en forma de ADN plasmídico o en un vector vírico (el cual se deriva de un adenovirus, retrovirus, poxvirus, en particular de un virus Vaccinia o de un virus MVA, virus herpes, virus asociado a adenovirus, etc.).
- 30 El abanico de plásmidos que pueden utilizarse dentro del contexto de la presente invención es amplísimo. Puede ser de cualquier origen (procariótico o eucariótico) o pueden formarse mediante ensamblaje de elementos diversos. De modo general, los plásmidos son conocidos por el experto en la materia. Aunque un gran número de ellos se encuentra disponible comercialmente, también resulta posible construirlos mediante técnicas de manipulación genética (Sambrook *et al.*, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.,
- 35 1989). El plásmido puede ser un vector de clonación o de expresión que se derive, por ejemplo, de pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pBluescript (Stratagene), pREP4 ó pCEP4 (Invitrogen). A título indicativo, el ADN plasmídico que se utiliza en la presente invención puede amplificarse y purificarse según las prácticas generales de la técnica. Dado que ésta es una tecnología que ahora es ampliamente conocida, sólo se proporcionará una breve descripción del procedimiento, que consiste en la introducción del plásmido en células productoras (por ejemplo
- 40 *Escherichia coli*), el cultivo de estas células bajo condiciones apropiadas (fácilmente determinadas por el experto en la materia basándose en sus conocimientos generales en este campo y en el sistema de selección que porta el plásmido) y la recuperación del ADN plasmídico utilizando las técnicas habituales (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*, 1989). También puede contemplarse una etapa de purificación, por ejemplo llevando a cabo el método descrito en la solicitud de patente francesa FR nº 9611075 ó cualquier otro método publicado en la literatura.
- 45 El ácido nucleico de interés puede codificar un ARN antisentido y/o un ARNM que después se traducirá en un polipéptido de interés terapéutico. El ácido nucleico puede ser ADN genómico complementario (ADNc) o de tipo mixto (minigén del que se ha delecionado por lo menos un intrón) y puede ser homólogo o heterólogo en relación a la célula huésped. El polipéptido que codifica puede corresponder a la totalidad o parte de una proteína tal como se encuentra naturalmente (proteína nativa o truncada) o un mutante que muestre propiedades biológicas mejoradas
- 50 y/o modificadas. El polipéptido también puede ser un polipéptido quimérico que sea el resultado de fusionar secuencias de origen diverso. El ácido nucleico de interés puede obtenerse mediante síntesis química o mediante clonación (cribado de bibliotecas de ADN utilizando sondas adecuadas, PCR, etc.) y puede modificarse utilizando las técnicas convencionales de la biología molecular.
- 55 Puede resultar ventajoso, dentro del contexto de la presente invención, utilizar un gen de interés que codifique un promotor del crecimiento tisular, por ejemplo un factor de crecimiento, tal como PDGF o una BMP. Se indica que dicha lista no es limitativa y que también pueden utilizarse otros genes.

El gen o genes que porta el ácido nucleico de interés se sitúan bajo el control de los elementos que resultan

necesarios para expresarlos en la célula u organismo huésped. Estos elementos son elementos que permiten que los genes se transcriban en ARN y que un ARNm se traduzca en polipéptido.

De estos elementos, el promotor resulta particularmente importante. Puede aislarse a partir de cualquier gen de origen eucariótico o incluso vírico y puede ser constitutivo o regulable. Alternativamente, el promotor puede ser el promotor natural del gen en cuestión. Además, el promotor puede modificarse de manera que modifique su actividad promotora, para suprimir una región que inhibe la transcripción, para convertir un promotor constitutivo en regulable o viceversa, para introducir un sitio de restricción, etc. Pueden resultar útiles en la práctica de la invención una diversidad de promotores víricos, por ejemplo: el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), el promotor del gen TK del virus HSV1, el promotor temprano del virus 40 del simio (SV40) y el promotor tardío mayor adenovírico (MLP), o los promotores eucarióticos de los genes de la fosfoglicerato quinasa (PGK) murina o humana, 1-antitripsina (específico del hígado), inmunoglobulina (específico de los linfocitos), surfactante, CFTR (específico del pulmón) o actina (específico muscular). Naturalmente el ácido nucleico de interés puede comprender además elementos que mejoran la expresión (secuencia de intrón, secuencia de señal, secuencia de localización nuclear, secuencia de terminación de transcripción, sitio de inicio de traducción del IRES u otro tipo, etc.) o el mantenimiento del ácido nucleico en la célula huésped (origen de replicación, etc.). Dichos elementos son conocidos por el experto en la materia.

En otra realización, la invención proporciona una matriz multifuncional que comprende múltiples componentes. Por ejemplo, la matriz multifuncional puede comprender una matriz interna o núcleo de sulfato de calcio cristalino y, opcionalmente, un primer factor de crecimiento, tal como, VEGF. Dispuesto en torno a la matriz o núcleo interno puede encontrarse una matriz externa que comprende sulfato de calcio cristalino y, opcionalmente, un segundo factor, diferente, de crecimiento, tal como PDGF y/o TGF- β . Este tipo de matriz puede facilitar la formación de tejido heterogéneo que imita el tejido que debe sustituirse. Además, uno o más de matriz interna y matriz externa puede comprender además un ácido nucleico, por ejemplo el codificante de una proteína de interés para la expresión en el tejido.

A la luz del comentario general anteriormente proporcionado, los ejemplos específicos presentados a continuación son sólo ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención. Otras configuraciones genéricas y específicas resultarán evidentes para el experto en la materia.

Ejemplo 1

El presente Ejemplo demuestra que el sulfato de calcio puede utilizarse para activar plaquetas en plasma rico en plaquetas.

(a) Materiales

En el presente Ejemplo, y en los Ejemplos siguientes, se obtuvo sulfato de calcio exotérmico de LIFECORE Biomedical, Chaska, MN, USA, bajo el nombre comercial CAPSET[®], α -hemihidrato de sulfato de calcio en polvo de grado médico. Se obtuvo plasma rico en plaquetas de la Cruz Roja Americana, Buffalo, NY. Se obtuvieron trombina bovina y colágeno de tipo 1 (procedente de cola de rata) de Sigma (Saint Louis, Missouri). Se obtuvo factor de crecimiento derivado de plaquetas recombinante humano (rePDGF-BB) de Oncogene Research Products (Cambridge, MA). Se obtuvo anticuerpo anti-factor β 1 de crecimiento transformante humano (fracción IgG de antisuero, cultivado en ratones) de Oncogene Research Products (Cambridge, MA). Se obtuvieron anticuerpo anti-factor de crecimiento derivado de plaquetas humano (fracción IgG de antisuero, cultivado en cabras), IgG de ratón purificada y IgG de cabra purificada de Sigma (Saint Louis, Missouri). Se obtuvieron insertos de placa de cultivo de 0,4 μ m Millicell[®]-PC de Millipore Corp. (Bedford, MA). Extrude PS[®], un material de impresión de polivinilsiloxano, se obtuvo de Kerr Corp. (Romulus, MI). Los moldes de polivinilsiloxano se enviaron a un centro de radiología para la irradiación gamma (Oregon State University, Corvallis, OR). Se obtuvo ³H-timidina (actividad específica: 1 mCi/ml) de ICN Radiochemicals (Irvine, CA). El medio de cultivo tisular y los suplementos se obtuvieron de GIBCO (Grand Island, NY).

Todos los demás compuestos químicos eran del grado más alto disponible y se obtuvieron de diversas fuentes comerciales.

(b) Métodos

Se utilizaron los métodos siguientes tanto en el presente Ejemplo como en los Ejemplos posteriores.

50 (i) Obtención de plasma rico en plaquetas

El plasma rico en plaquetas (unidades de plaquetas) para fines de investigación se obtuvo de la Cruz Roja Americana. Una unidad de plaquetas es un concentrado de plaquetas separado a partir de una sola unidad de sangre completa y suspendido en una pequeña cantidad del plasma original. La unidad de plaquetas habitual

contiene por lo menos 1.100×10^9 plaquetas/l. Por consistencia, los experimentos se llevaron a cabo utilizando unidades del mismo grupo sanguíneo, el más común (O Rh-positivo).

(ii) Aislamiento de células osteoblásticas humanas y condiciones de cultivo

- 5 Se obtuvieron cultivos de osteoblastos primarios humanos a partir de muestras de hueso esponjoso humano (Schmidt R., Kulbe K.D., Bone Miner. 20:211, 1993, y Gotoh *et al.*, Bone Miner. 8:239, 1990), que había tenido que extraerse durante extracciones de terceros molares y que se habría descartado. Todas las muestras fueron recogidas de individuos jóvenes sanos (de 18 a 30 años de edad) tras obtener el consentimiento apropiado del donante de acuerdo con el panel institucional de revisión de experimentos con sujetos humanos. Las muestras de hueso se limpiaron cuidadosamente de tejido blando y finalmente se fragmentaron en trozos adecuados (de 5 mm).
- 10 Tras varios lavados en tampón para células óseas (BCB), los trozos se cultivaron en medio BGJb (modificación de Fitton-Jackson) que contenía suero de feto bovino (FCS) al 10% (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Se dejó que las células se desprendiesen del hueso y creciesen durante 2 a 4 semanas, hasta alcanzar una confluencia del 50% en los matraces. Las células se mantuvieron en un incubador bajo atmósfera humidificada con 5% de CO_2 a 37°C . Se utilizaron células del tercer a quinto pases en los experimentos, posteriormente.
- 15 Se ha demostrado que estas células presentan mayores actividad de fosfatasa alcalina y nivel de osteocalcina (Schmidt *et al.*, *supra*, 1993; Beresford J.N. *et al.*, Metab. Bone Dis. Rel. Res. 5:229, 1984, y Beresford J.N. *et al.*, Endocrinology 119:1776, 1984).

(iii) Ensayo de proliferación de células osteoblásticas

- 20 Previamente al experimento de proliferación, los matraces confluentes de células osteoblásticas humanas se tripsinizaron brevemente (2 minutos) y se rasparon. A continuación, las células se centrifugaron y se resuspendieron en medio BGJb (sin FCS). Se ajustó la densidad celular a $0,8 \times 10^5$ células/ml. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se preparó un número apropiado de pocillos de placa de cultivo mediante la adición de 0,5 ml de medio BGJb a cada pocillo y se introdujeron insertos de placa de cultivo de $0,4 \mu\text{m}$ Millicell[®]-PC y se dejó que se humectasen bien. A continuación, los materiales biológicos se depositaron en insertos estériles para el cultivo celular en suspensión. Se añadieron 0,5 ml de la suspensión celular a cada inserto. Se dejó que las células se enganchasen y proliferasen durante 24 horas a 37°C .

- 30 Para evaluar la síntesis de ADN, durante las últimas cuatro horas del tiempo de incubación, se añadieron 50 μl de solución de ^3H -timidina (11 $\mu\text{Ci/ml}$) a cada inserto. De esta manera se alcanzó una concentración final de 1,0 $\mu\text{Ci/ml}$ en cada inserto. Al final del periodo de tiempo, se extrajo suavemente el medio con una pipeta Pasteur y las muestras se lavaron tres veces con 0,5 ml de PBS frío con el fin de eliminar por lavado todas las células no adherentes. A continuación, los insertos con los materiales de injertación se transfirieron a nuevos pocillos de placa. Para evaluar la radioactividad asociada a las células, se añadieron previamente 0,5 ml de NaOH 1 N/EDTA 10 mM a cada pocillo y después se añadieron 0,5 ml de NaOH 1 N/EDTA 10 mM a cada inserto. Las muestras se incubaron a 37°C durante 1 hora. Se recogió una alícuota (350 μl) del sobrenadante del inserto y una alícuota (150 μl) del sobrenadante del pocillo y se transfirieron a viales de centelleo y se neutralizaron con 0,5 ml de HCl 1 N. Cada muestra recibió 10 ml de líquido de centelleo LIQUISCINT[™] y se contó mediante espectrometría de centelleo líquido. Se considera que los valores de incorporación de ^3H -timidina reflejan tanto la unión inicial de las células como la capacidad de proliferación de las células.

(iv) Análisis estadístico de los datos

- 40 Los datos se expresan como pulsos por minuto (CPM) por grupo. Cada grupo incluía tres muestras. Las diferencias entre grupos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Scheffe. Se utilizó un nivel de significancia de 0,1 ($\alpha=0,1$). Los experimentos se repitieron tres veces.

(c) Parte experimental

- 45 Una hora antes de los ensayos de proliferación, se combinaron alícuotas de 750 mg de sulfato de calcio con una diversidad de diferentes matrices, tal como se indica en la Tabla 1.

TABLA 1

Nombre del grupo	Combinaciones de sulfato de calcio
CS	sulfato de calcio y H_2O
CS/ThrPRP	Sulfato de calcio y PRP activado por trombina
CS/PRP50%PRP	sulfato de calcio y 50% H_2O + 50% PRP activado por trombina

CS/PRP	sulfato de calcio y PRP no activado por trombina
CS/50%PRP	sulfato de calcio y 50% H ₂ O + 50% PRP no activado por trombina
CS/Thr	sulfato de calcio y H ₂ O + Trombina
CS/CollPRP	sulfato de calcio y PRP activado por colágeno
CS/Coll	sulfato de calcio y H ₂ O + Colágeno
CS/PDGF-BB	Sulfato de calcio y solución en agua de PDGF-BB (4x10 ⁻⁹ M)

- 5 Las diversas matrices para someter a ensayo se crearon de la manera siguiente. Se mezcló sulfato de calcio exotérmico en forma de polvos con 279 μ l de agua destilada y esterilizada mediante doble filtración (CS, grupo de control) o con la misma cantidad (279 μ l) de plasma rico en plaquetas preactivado por trombina (CS/ThrPRP) o plasma rico en plaquetas RP no preactivado (CS/PRP). Otros grupos de ensayo recibieron la mitad de la cantidad de agua destilada y esterilizada mediante doble filtración (139 μ l) mezclada con la mitad de la cantidad (139 μ l) de plasma rico en plaquetas preactivado por trombina (CS/PRPThr al 50%) o plasma rico en plaquetas no preactivado (CS/PRP al 50%). Otro grupo de ensayo recibió (279 μ l) plasma rico en plaquetas rico en colágeno (CS/CollPRP) o sólo colágeno (279 μ l) en agua (CS/Coll).
- 10 Cada grupo, creado a partir de la cantidad anteriormente indicada de sulfato de calcio, consistía de tres muestras idénticas. Utilizando moldes de polivinilsiloxano estériles, se creó cada una de dichas muestras en forma de un disco de tamaño estándar (4,5 mm de diámetro y 2,5 mm de grosor). Todas las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante el periodo de coagulación completo (1 hora).
- 15 La activación del plasma rico en plaquetas se consiguió de diferentes maneras. En el caso de la activación con trombina, según Marx *et al.* (Marx *et al.*, Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 85:638, 1998), se mezclaron 1.000 unidades de trombina bovina con 6 ml de plasma rico en plaquetas, aunque con una sola excepción: no se requirió o utilizó CaCl₂ para disolver la trombina. En el caso de la activación con colágeno (Hoffman *et al.* Hematology: Basic Principles and Practice. Philadelphia: Churchill Livingstone Edition, 2000; Blockmans *et al.*, Thromb. Res. 43:445, 1986) (CS/CollPRP), se disolvieron 500 μ g de colágeno en 279 μ l de plasma rico en plaquetas. Se obtuvo un grupo más (CS/PDGF-BB) mediante la mezcla de sulfato de calcio en polvo (750 mg) con 279 μ l de solución en agua de rePDGF-BB humano (4x10⁻⁹ M).
- 20 La evaluación mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de la combinación de sulfato de calcio y plasma rico en plaquetas (CS/PRP) y la combinación de sulfato de calcio y 50% de plasma rico en plaquetas y 50% de agua (CS/PRP al 50%) mostró estructuras integradas en la matriz orgánica de plasma rico en plaquetas sin diferencias evidentes de organización general con la utilización de sólo sulfato de calcio. La muestra de sulfato de calcio mostró la precipitación de los cristales dihidrato en forma de barras o prismas. De esta manera, al combinar el sulfato de calcio con plasma rico en plaquetas, se conservaron las características y cualidades de la microestructura con sulfato de calcio y también resultaron integradas en el plasma rico en plaquetas.
- 25 Los resultados de los ensayos de proliferación de células osteoblásticas se resumen en la figura 1, en la que la proliferación se indica en pulsos por minuto (cpm). Se cultivaron las células durante 24 horas. Se añadió 3H-timidina durante las últimas dos horas de incubación y se consideró que la incorporación de la ³H-timidina en el ADN era una medida de la actividad de proliferación. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante ANOVA seguido de un ensayo de múltiples comparaciones de Scheffe ($\alpha=0,1$, $n=3$).
- 30 Las células osteoblásticas primarias humanas cultivadas en muestras CS/PRP, en muestras CS/PRP al 50% y en muestras CS/CollPRP mostraron todos los niveles de proliferación más altos ($p<0,001$), sin diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos. Al preactivar plasma rico en plaquetas con trombina (CS/ThrPRP o CS/ThrPRP al 50%), las células osteoblásticas mostraron un nivel de proliferación inferior al observado en muestras de plasma rico en plaquetas no activado o activado con colágeno (diferencia estadísticamente significativa, $p<0,001$). Al mezclar sulfato de calcio con trombina sólo (CS/Thr) o con colágeno sólo (CS/Coll), no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en las comparación con el nivel de proliferación de control (CS). Estos resultados demuestran que resulta posible estimular la proliferación de los osteoblastos mediante la activación de plasma rico en plaquetas previamente inactivado con sulfato de calcio exotérmico. De hecho, CS/PRP no requiere la activación con trombina para alcanzar los niveles máximos de proliferación osteoblástica y, por lo tanto, los riesgos y limitaciones asociados a la utilización de proteína de origen animal (tal como, por ejemplo, la encefalopatía esponjiforme bovina) también se evitan.
- 45

Ejemplo 2

5 El presente ejemplo nuevamente demuestra que el plasma rico en plaquetas puede activarse mediante exposición a sulfato de calcio. Además, el presente ejemplo demuestra que parte del beneficio de incluir plasma rico en plaquetas en las matrices de sulfato de calcio podría derivarse en parte de la liberación de PDGF y/o TGF- β . Las muestras se crearon tal como se resumen en la Tabla 2, utilizando los procedimientos esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 1, con el fin de generar los mismos tamaños de disco que en el Ejemplo 1.

TABLA 2

Nombre del grupo	Tratamiento del grupo (a 37°C)
CS	PBS durante 1 hora
CS/PRP	PBS durante 1 hora
CS/PRP-Anticuerpo o CS/Anticuerpo	Anti-PDGF durante 30 minutos, después anti-TGF- β 1 durante 30 minutos
CS/PRP-IgG	IgG de cabra durante 30 minutos, después IgG de ratón durante 30 minutos
CS/PRP-Refrig	Incubación de 6 horas a 7-8°C
CS/PDGF-BB	PBS durante 1 hora

10 En el presente ejemplo, el grupo CS/PRP también se sometió a un tratamiento de refrigeración (CS/PRP-Refrig) debido a que la reacción de precipitación con sulfato de calcio es una reacción exotérmica y alcanza, durante el tiempo de coagulación de 30 a 50 minutos, una temperatura de entre 40°C y 45°C (Phillips, *supra*, 1991, y O'Brien, *supra*, 1989). Las muestras sometidas a tratamiento de refrigeración se prepararon según la técnica habitual de preparación con la única diferencia de que se prepararon 6 horas antes y se incubaron inmediatamente en el refrigerador. De esta manera, durante el tiempo de coagulación completo, las muestras fueron incubadas a una temperatura constante de 7-8°C, se enlenteció la reacción exotérmica y el material no alcanzó la temperatura de coagulación habitual.

15 Se utilizó el protocolo siguiente en los tratamientos de anticuerpos: tras la preparación, las muestras se incubaron en 1 ml de solución anti-PDGF ($1,9 \times 10^{-7}$ M) durante 30 minutos a 37°C, se lavaron tres veces con 1 ml de PBS frío y después se incubaron en 1 ml de solución anti-TGF- β 1 ($1,7 \times 10^{-7}$ M) durante 30 minutos a 37°C (CS/PRP-anticuerpo y CS/anticuerpo). El control (CS/PRP-IgG) recibió el tratamiento con una solución de IgG de cabra ($1,9 \times 10^{-7}$ M) seguido del tratamiento con una solución de IgG de ratón ($1,7 \times 10^{-7}$ M). Las demás muestras se mantuvieron en 1 ml de PBS durante 1 hora a 37°C. Antes del ensayo de proliferación, todas las muestras se lavaron tres veces con 1 ml de PBS frío. Las matrices resultantes se sometieron a ensayo utilizando el ensayo de proliferación descrito en el Ejemplo 1, y los datos resultantes se analizaron tal como se describe en el Ejemplo 1.

25 Se indican los resultados en la figura 2, en la que se expresa la proliferación de las células osteoblásticas primarias humanas en pulsos por minuto (cpm). Tal como se muestra en la figura 2, las células osteoblásticas primarias humanas sobre las preparaciones de CS/PRP o cultivadas sobre la misma preparación tras los tratamientos de IgG (CS/PRP-IgG), mostraron los niveles de proliferación más altos ($p < 0,001$). Además, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos. Al tratar la preparación de CS/PRP con un anticuerpo anti-PDGF humano y un anticuerpo anti-TGF- β 1 humano (CSP/PRP-anticuerpo), el nivel de proliferación era más bajo que en los dos grupos anteriores (diferencia estadísticamente significativa, $p < 0,001$). El grupo de CS/PRP-Refrig mostraba niveles de proliferación comparables a los del grupo tratado con anticuerpo específico (CS/PRP-anticuerpo) e inferiores a los del grupo de CS/PRP o de CS/PRP tratado con IgG (CS/PRP-IgG). Sin restringirse a ninguna teoría en particular, aparentemente el calor liberado durante la reacción exotérmica de precipitación cristalina puede servir por lo menos en parte para activar las plaquetas. Además, al utilizar sulfato de calcio como portador para rePDGF-BB (CS/PDGF-BB), las células osteoblásticas mostraron niveles de proliferación más altos (diferencia estadísticamente significativa) en comparación con el control (CS).

40 En un experimento de control adicional, tal como se muestra en la figura 3, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre CS solo (CS) y CS tratado previamente con un anticuerpo anti-PDGF humano y con un anticuerpo anti-TGF- β 1 humano (CS/anticuerpo). Las muestras se prepararon tal como se ha indicado anteriormente, y el ensayo de proliferación celular y los análisis estadísticos se llevaron a cabo tal como se ha indicado en el Ejemplo 1. Las células cultivadas sobre sulfato de calcio solo (CS) o cultivadas sobre la misma

preparación tras el tratamiento con anticuerpo anti-PDGF humano y anticuerpo anti-TGF- β 1 humano (CS/anticuerpo) mostraban niveles de proliferación comparables (sin diferencias estadísticamente significativas). La inhibición de la actividad de proliferación por parte del tratamiento de anticuerpos no era detectable. Estos anticuerpos específicos por sí mismos no inhiben la proliferación y por el contrario neutralizan la actividad de PDGF y TGF- β 1 liberados en las muestras de CS/PRP.

Ejemplo 3

El presente ejemplo proporciona datos comparativos, que indican que las matrices de sulfato de calcio-plasma rico en plaquetas pueden dar soporte a niveles de proliferación de células osteoblásticas similares a los del Grafton® Putty disponible comercialmente.

10 Se prepararon muestras según las enseñanzas de los Ejemplos 1 y 2. Se obtuvo Grafton® Putty, una matriz ósea desmineralizada, de Osteotech Inc. (Eatontown, NJ). Se prepararon las muestras de Grafton® Putty (GraftonPutty) utilizando los mismos moldes de polivinilsiloxano: la especial maleabilidad de este compuesto de matriz ósea permitió la preparación de muestras del mismo tamaño estándar de disco que todas las demás preparaciones.

15 El ensayo de proliferación de células osteoblásticas, y los datos resultantes del mismo se analizaron tal como se comenta en el Ejemplo 1. Se resumen los resultados en la figura 4, en la que se expresa la proliferación de células osteoblásticas primarias humanas en pulsos por minuto (cpm). Los resultados en la figura 4 demuestran que las células osteoblásticas primarias humanas cultivadas sobre muestras de CS/PRP, mostraban niveles de proliferación comparables (sin diferencias estadísticamente significativas) a Grafton® Putty, una matriz ósea desmineralizada, y niveles de proliferación más altos que CS o CS/PDGF-BB (diferencia estadísticamente significativa, $p < 0,001$).
 20 Además, al utilizar sulfato de calcio como portador para rePDGF-BB (CS/PDGF-BB), las células osteoblásticas mostraron niveles de proliferación más altos (diferencia estadísticamente significativa, $p < 0,001$) en comparación con el sulfato de calcio solo.

Ejemplo 4

25 El presente ejemplo demuestra la viabilidad de utilizar matrices basadas en sulfato de calcio en protocolos de terapia génica.

Los estudios siguientes demuestran la capacidad del sulfato de calcio de combinarse con ADN desnudo. Dado que el sulfato de calcio es físicamente capaz de portar y no alterar las características biológicas del plásmido, puede conseguirse el transporte del plásmido con el tiempo en virtud de la lenta tasa de resorción del sulfato de calcio. Al mezclar sulfato de calcio en polvo con una solución en agua de ADN plasmídico, pudo transportar un gen codificante de proteína fluorescente verde (pEGFPC1) a una línea celular renal embrionaria humana.

30 En presencia de solución salina tamponada con HEPES (HeBS) y CaCl_2 , se sembraron partículas molidas de la combinación de CS/plásmido en células renales embrionarias humanas (células 293) a una confluencia del 75% y se evaluó la transfección mediante citometría de flujo FACSCAN (Becton Dickinson, San Jose, CA) a las 24, 48 y 72 horas. A las 72 horas, la combinación CS/plásmido que contenía 6 mg de sulfato de calcio mezclado con 5 μl de solución en agua de pEGFP-C1 (20 μg de plásmido) fue capaz de transfectar prácticamente 5% de la población celular. Por otra parte, el tradicional método de precipitación con fosfato (Cp) fue capaz de transfectar 32,5% de la población celular al sembrar 10 μg del plásmido sobre la capa celular.

35 En otra serie de experimentos, se evaluó la capacidad de transfectar células del sobrenadante de CS molido/plásmido suspendido en HeBS/ CaCl_2 . En este caso se incorporaron 30 μg del plásmido en sulfato de calcio. Se transfectaron células 293 con pEGFP-C1. Las células se transfectaron utilizando el protocolo de precipitación con fosfato de calcio o con el sobrenadante de CS/plásmido tras la suspensión de CS/plásmido en HeBS/ CaCl_2 . Tras incubar durante 72 horas, se recolectaron las células y se analizaron mediante citometría de flujo FACScan para la emisión de la fluorescencia en filtro de paso de banda verde (FLI). Aproximadamente 54% de las células transfectadas con fosfato de calcio eran fluorescentes, mientras que aproximadamente 10% de las células transfectadas con el sobrenadante de CS/plásmido eran fluorescentes. El presente experimento confirma que los plásmidos resultan liberados de la matriz de CS molido/plásmido y que, al liberarse, todavía son capaces de transfectar células. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, aparentemente el sulfato de calcio no altera la actividad biológica de los plásmidos y es capaz de transportar ADN al interior de las células.

REIVINDICACIONES

1. Método *ex vivo* de activación de las plaquetas, que comprende:
 - (a) proporcionar una muestra líquida que contiene plaquetas a una primera temperatura, y
 - (b) añadir a la muestra una cantidad de sulfato de calcio exotérmico suficiente para activar las plaquetas.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra comprende plasma rico en plaquetas.
3. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra se encuentra sustancialmente libre de actividad de trombina.
4. Método según la reivindicación 1, en el que las plaquetas no han sido activadas por trombina.
5. Método según la reivindicación 1, en el que la primera temperatura es una temperatura ambiente.
6. Método según la reivindicación 1, en el que la sal incrementa la temperatura del líquido hasta una temperatura comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 50°C.
7. Método según la reivindicación 6, en el que la sal incrementa la temperatura del líquido hasta una temperatura comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 45°C.
8. Método según la reivindicación 1, en el que las plaquetas liberan un factor de crecimiento tras la activación.
9. Método según la reivindicación 8, en el que el factor de crecimiento es factor de crecimiento derivado de plaquetas.
10. Matriz bioactiva que comprende plaquetas activadas con sulfato de calcio cristalino y sulfato de calcio exotérmico, para la utilización en un método de estimulación de la formación de hueso en un sitio preseleccionado en un mamífero, comprendiendo el método:

proporcionar en el sitio la matriz bioactiva, en el que la matriz bioactiva estimula la formación de hueso en el sitio.
11. Matriz según la reivindicación 10, en la que el sitio es un defecto óseo.
12. Matriz según la reivindicación 11, en la que el defecto óseo es una cavidad o una fractura.
13. Matriz según la reivindicación 12, en la que la fractura es una fractura no consolidada.
14. Matriz según la reivindicación 10, en la que la matriz bioactiva comprende además un factor de crecimiento.
15. Matriz según la reivindicación 14, en la que el factor de crecimiento es factor de crecimiento derivado de plaquetas.
16. Matriz según la reivindicación 10, en la que la matriz bioactiva comprende además un ácido nucleico.
17. Matriz según la reivindicación 10, en la que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos codificante de un gen preseleccionado expresable en el sitio.
18. Matriz según la reivindicación 17, en la que el ácido nucleico es capaz de ser transfectado en una célula y expresarse en la misma en el sitio preseleccionado.
19. Matriz según la reivindicación 10, en la que la matriz bioactiva se dimensiona de manera que permita la infiltración, proliferación y diferenciación de las células en el sitio preseleccionado.
20. Matriz según la reivindicación 19, en la que las células son células óseas progenitoras.
21. Matriz según la reivindicación 20, en la que las células son células osteoblásticas.
22. Matriz según la reivindicación 10, en la que la matriz bioactiva se encuentra sustancialmente libre de actividad de trombina.
23. Matriz según la reivindicación 10, en la que las plaquetas activadas se disponen dentro de un plasma rico en plaquetas.

24. Matriz según la reivindicación 10, que comprende además la etapa de manipular la matriz bioactiva para producir una forma de interés en el sitio preseleccionado.
25. Matriz según la reivindicación 10, en la que las plaquetas activadas con sulfato de calcio exotérmico se producen mediante el método según la reivindicación 1.
- 5 26. Matriz bioactiva que comprende:
una mezcla de plaquetas activadas con sulfato de calcio cristalino y con sulfato de calcio exotérmico.
27. Matriz según la reivindicación 26, en la que la matriz se encuentra sustancialmente libre de actividad de trombina.
28. Matriz según la reivindicación 26, que comprende además un factor de crecimiento.
- 10 29. Matriz según la reivindicación 28, en la que el factor de crecimiento es factor de crecimiento derivado de plaquetas.
30. Matriz según la reivindicación 26 ó 28, que comprende además un ácido nucleico.
31. Matriz según la reivindicación 30, en la que el ácido nucleico codifica un gen preseleccionado expresable en el sitio.
- 15 32. Matriz según la reivindicación 26, en la que la matriz bioactiva se dimensiona de manera que permita la infiltración, proliferación y diferenciación de las células en el sitio preseleccionado.
33. Matriz según la reivindicación 32, en la que las células son células óseas progenitoras.
34. Matriz según la reivindicación 33, en la que las células son células osteoblásticas.
35. Matriz bioactiva que comprende:
- 20 (i) un primer dominio que define una superficie externa y que comprende sulfato de calcio cristalino y plasma rico en plaquetas,
y que opcionalmente comprende además un primer factor de crecimiento, y
(ii) dispuesto sobre la superficie externa del primer dominio, un segundo dominio que comprende sulfato de calcio cristalino
- 25 y plasma rico en plaquetas, y que opcionalmente comprende además un segundo factor, diferente, de crecimiento, con la condición de que por lo menos uno de entre el primer dominio y el segundo dominio comprenda un factor de crecimiento, en el que el plasma rico en plaquetas del primer dominio y/o del segundo dominio comprende plaquetas activadas con sulfato de calcio exotérmico.
- 30 36. Matriz según la reivindicación 35, en la que el primer dominio se encuentra sustancialmente libre de actividad de trombina.
37. Matriz según la reivindicación 35 ó 36, en la que el segundo dominio se encuentra sustancialmente libre de actividad de trombina.
38. Matriz según la reivindicación 35, en la que el primer dominio se dimensiona de manera que permita la infiltración, proliferación y diferenciación de las células progenitoras.
- 35 39. Matriz según la reivindicación 35, en la que el segundo dominio se dimensiona de manera que permita la infiltración, proliferación y diferenciación de las células progenitoras.
40. Matriz según la reivindicación 35, en la que el primer dominio comprende un primer factor de crecimiento.
41. Matriz según la reivindicación 35 ó 40, en la que el segundo dominio comprende un segundo factor de crecimiento.
- 40 42. Matriz según la reivindicación 31, para la utilización en un método de expresión de un ácido nucleico de interés en un sitio preseleccionado en un mamífero, comprendiendo el método:
- (a) introducir la matriz en el sitio preseleccionado en el mamífero, y
- (b) permitir la expresión del ácido nucleico en el sitio preseleccionado.

43. Matriz según la reivindicación 42, en la que dicho ácido nucleico codifica un factor de crecimiento.
44. Matriz según la reivindicación 43, en la que el factor de crecimiento es factor de crecimiento osteogénico.
45. Matriz según la reivindicación 42, en la que dicho ácido nucleico codifica una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste de factor de crecimiento derivado de plaquetas y una proteína morfogénica ósea.
46. Matriz según la reivindicación 45, en la que dicho ácido nucleico comprende además una secuencia de promotor.
47. Matriz según la reivindicación 42, en la que el sitio es un defecto óseo.
48. Matriz según la reivindicación 47, en la que el defecto óseo es una cavidad o una fractura.

5

10

FIGURA 1

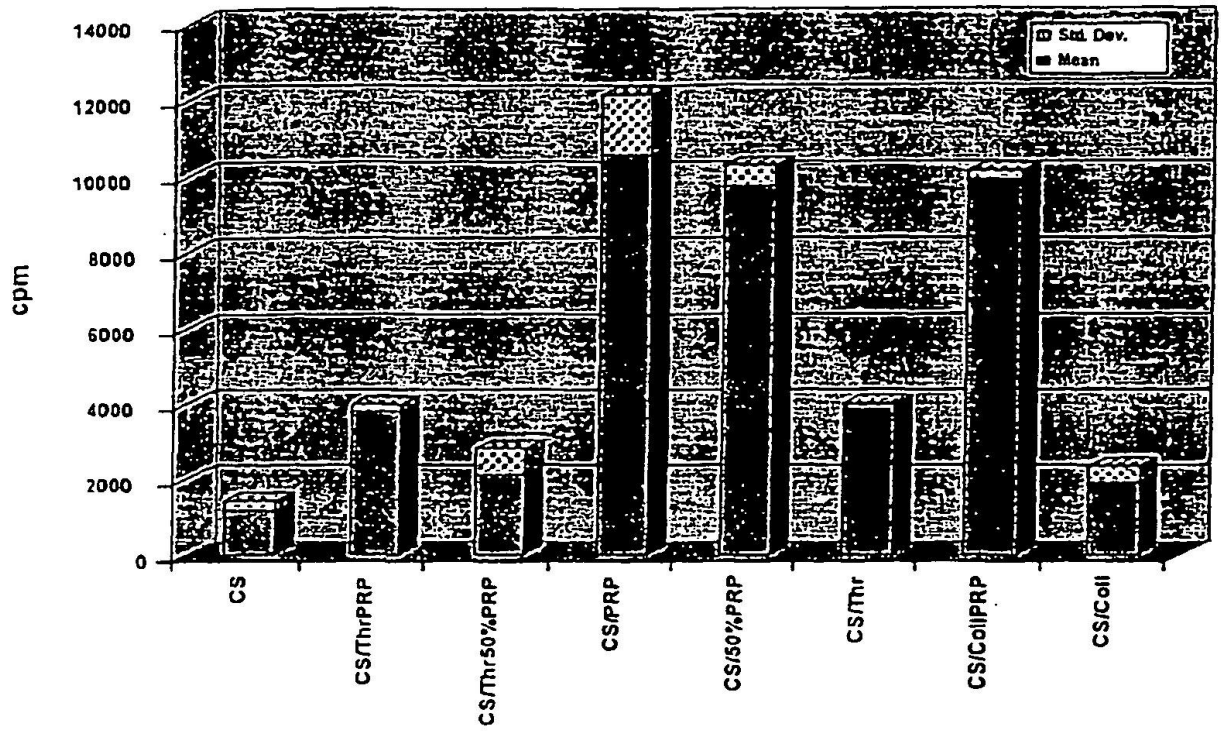


FIGURA 2

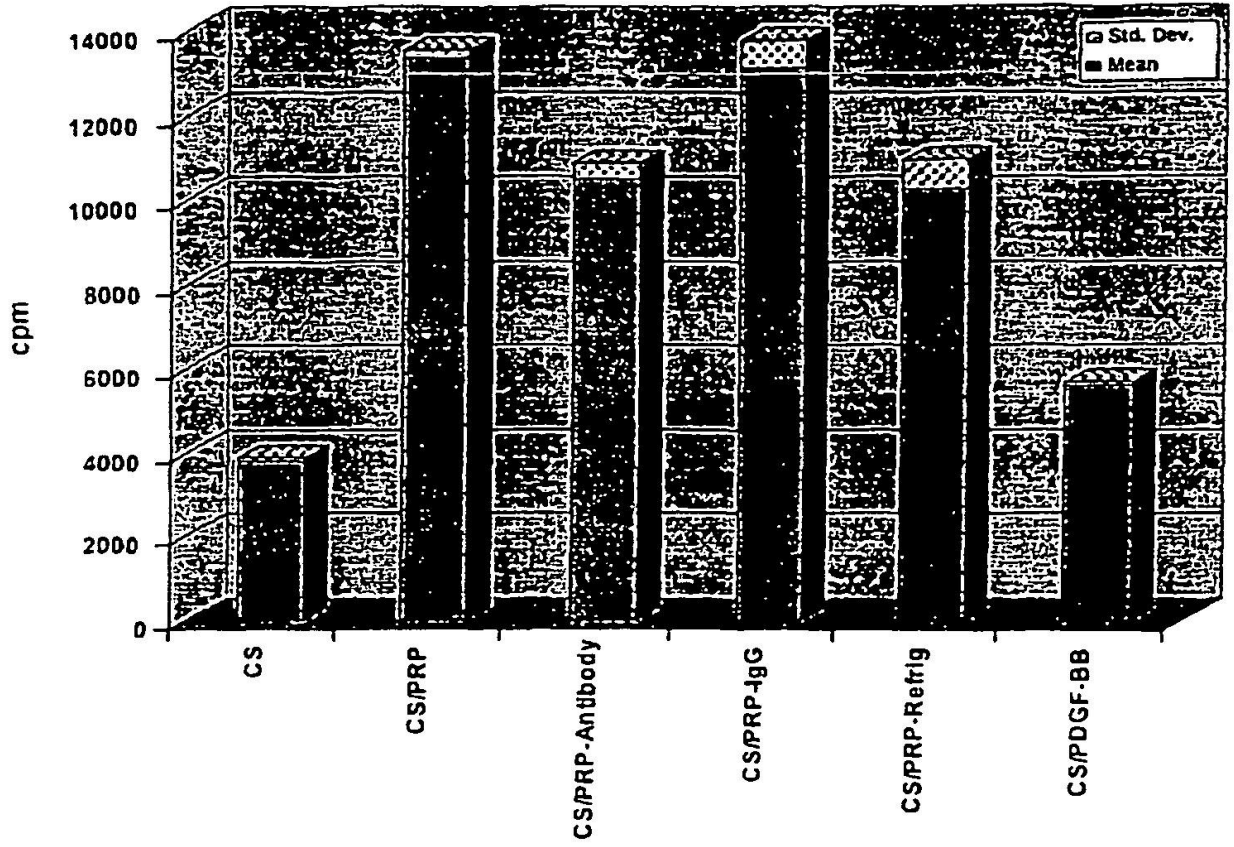


FIGURA 3

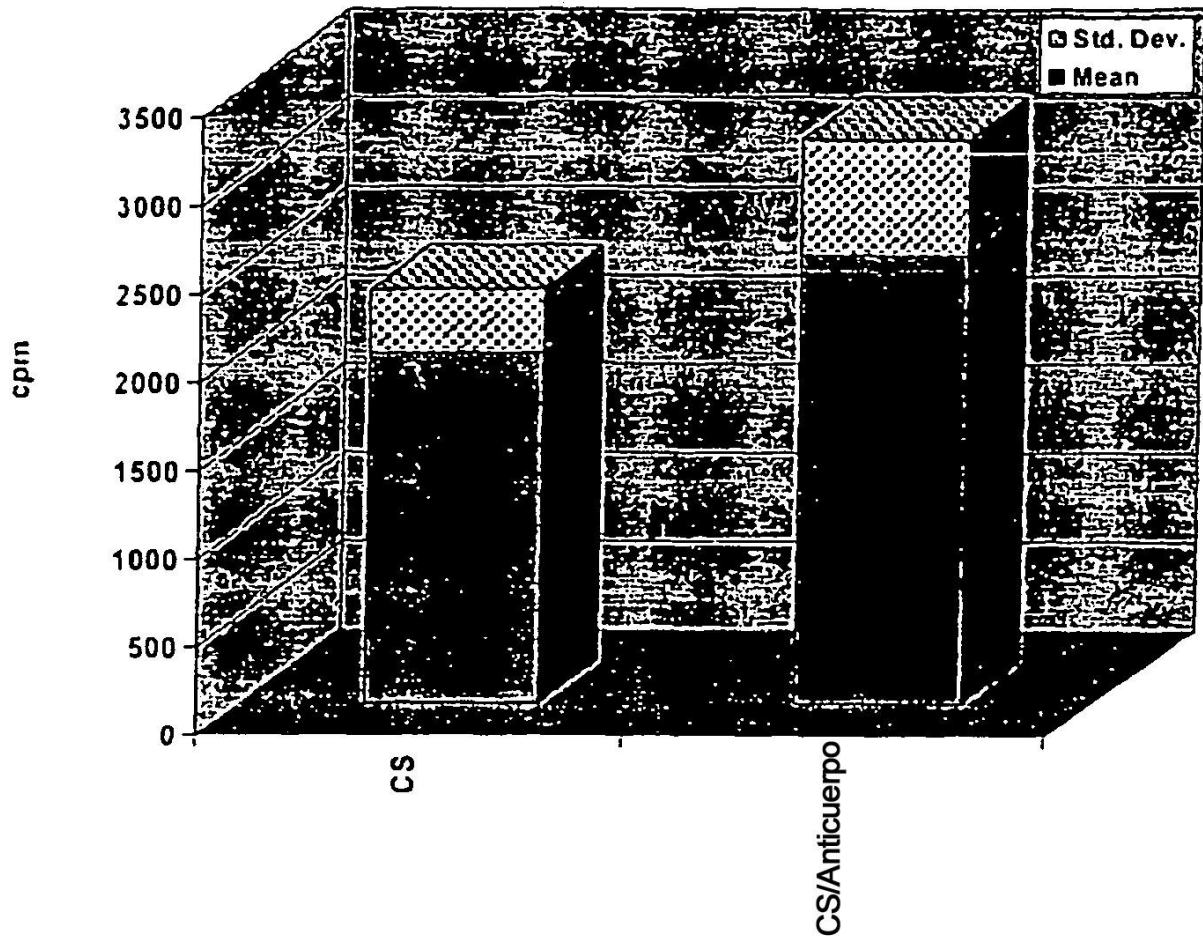


FIGURA 4

