

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 222**

51 Int. Cl.:
C12N 5/077 (2010.01)
C12N 5/078 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07759733 .4**
96 Fecha de presentación: **29.03.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2013730**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.01.2009**

54 Título: **CONSTRUCCIONES ÓSEAS TRIDIMENSIONALES MINERALIZADAS.**

30 Prioridad:
30.03.2006 US 787431 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.03.2012

73 Titular/es:
**MARK CLARKE
15219 PLEASANT VALLEY ROAD
HOUSTON, TX 77062, US;
ALAMELU SUNDARESAN y
NEAL PELLIS**

72 Inventor/es:
**Clarke, Mark;
Sundaresan, Alamelu y
Pellis, Neal**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 376 222 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

Construcciones óseas tridimensionales mineralizadas.

Campo de la invención

5 La invención se refiere a construcciones óseas tridimensionales mineralizadas obtenidas *ex vivo* que son una réplica del hueso natural.

Antecedentes

10 Uno de los problemas principales asociados al estudio del hueso normal y el fisiopatológico es que, como sistema orgánico, crece lentamente y el tiempo para que muestre una respuesta observable a un estímulo particular es relativamente extenso. La naturaleza de la matriz del tejido mineralizado del hueso *in vivo* y su arquitectura compleja también presentan varios problemas técnicos asociados a la forma de realizar las observaciones experimentales. En la actualidad, los estudios verdaderamente informativos diseñados para comprender la fisiología del hueso se han basado principalmente en la retirada de muestras de tejido óseo de un tejido normal o enfermo en un contexto clínico o de modelos animales experimentales.

15 Hasta la fecha, no hay un modelo de cultivo de tejidos tridimensional para el hueso, tanto si es de origen animal como humano. La técnica previa se ha basado principalmente en el uso de cultivos de tipos celulares con un solo tipo de osteoblastos o de osteoclastos que se hacen crecer en superficies de cultivo de tejidos bidimensionales planas. Estos cultivos también se han hecho crecer en geles tridimensionales con soporte de colágeno y algunos investigadores han utilizado sistemas de cultivo que permiten aplicar distintos tipos de tensión mecánica a las células para estudiar los efectos de la carga mecánica. Sin embargo, estos cultivos se han centrado principalmente
20 en las respuestas de un solo tipo de célula, tales como los osteoblastos, a diferentes estímulos ambientales.

Los modelos existentes de cultivo plano de tejidos con un solo tipo de célula del hueso no permiten estudiar las interacciones entre los diferentes tipos de células presentes en el hueso normal responsable de la remodelación ósea normal. El tipo de osteocito inactivo desde el punto de vista del desarrollo presente en la matriz mineralizada del hueso normal *in vivo* (del la que proceden los osteoblastos) todavía se tiene que caracterizar totalmente en un
25 modelo de cultivo de tejidos debido a su supuesta transformación en osteoblastos una vez que se han retirado de la matriz ósea y colocado en el cultivo.

Además, el proceso de mineralización, que es esencial para la formación del hueso nuevo, se ha estudiado previamente sólo en cultivos con un solo tipo de osteoblastos. El proceso de mineralización se ha estudiado en tales modelos en ausencia del principal tipo de célula implicado en la retirada del material mineralizado, en particular el
30 osteoclasto. Sin embargo, la interacción compleja entre ambos tipos de células es esencial para la remodelación ósea normal (a saber, formación del hueso y osteólisis). Si no están presentes ambos tipos de células, es imposible obtener un verdadera representación *in vitro/ex vivo* de los procesos normales o realmente patológicos implicados en el proceso de remodelación ósea. Como tal, el uso de tales modelos de cultivo con un solo tipo celular para investigar los efectos de las manipulaciones, tales como los fármacos antiosteoporóticos o intervenciones de carga
35 mecánica, tienen poca utilidad debido a la falta de similitud con el estado fisiológico verdadero existente dentro del tejido óseo *in vivo*. Nakagawa et al (*Tissue Eng.* 10 (112), 93-100 (2004)) describen el cocultivo de osteoblastos y de precursores de osteoclastos en condiciones tridimensionales. Sin embargo, el cocultivo tridimensional se realiza en un armazón polimérico en condiciones estáticas.

Resumen

40 En un aspecto, la descripción da a conocer métodos para producir construcciones óseas tridimensionales mineralizadas. En una realización, un método comprende el cultivo de precursores de osteoclastos y osteoblastos en un medio de cultivo sin matriz mediante una técnica de cultivo de tejidos tridimensional rotacional de cizalla baja en condiciones eficaces para formar agregados que comprenden dichos osteoblastos y dichos precursores de osteoclastos, y cultivar dichos agregados mediante dicha técnica de cultivo de tejidos tridimensional rotacional de cizalla baja en un medio de cultivo de mineralización sin matriz que fomenta la mineralización de dichos agregados.
45

En otra realización, un método comprende el cultivo de precursores de osteoclastos y osteoblastos en un medio de cultivo sin matriz mediante una técnica de cultivo de tejidos tridimensional rotacional de cizalla baja en condiciones eficaces para formar agregados que comprenden los osteoblastos y los precursores de osteoclastos, y el cultivo de los agregados mediante dicha técnica de cultivo de tejidos tridimensional rotacional de cizalla baja en un medio de
50 cultivo de mineralización sin matriz que fomenta la mineralización de dichos agregados.

En otra realización, un método comprende la introducción de precursores de osteoclastos y osteoblastos en un recipiente de cultivo cilíndrico que rota en torno a un eje horizontal sustancialmente central, y el recipiente de cultivo

cilíndrico comprende un medio de cultivo sin matriz; el cultivo de los osteoblastos y de los precursores de osteoclastos en el recipiente de cultivo cilíndrico durante la rotación sustancialmente horizontal a una velocidad eficaz para crear las condiciones de cizalla baja y fomentar la formación de agregados que comprenden los precursores de osteoclastos y dichos osteoblastos; e introducir un medio de cultivo de mineralización sin matriz dentro del recipiente de cultivo cilíndrico y cultivar los agregados durante la rotación sustancialmente horizontal a una velocidad eficaz para crear las condiciones de cizalla baja.

En otra realización, el método comprende la introducción de precursores de osteoclastos y osteoblastos en un recipiente de cultivo cilíndrico que rota en torno a un eje sustancialmente horizontal central, comprendiendo el recipiente de cultivo cilíndrico un medio de cultivo sin matriz; el cultivo de los osteoblastos y de los precursores de osteoclastos en el recipiente de cultivo cilíndrico durante la rotación sustancialmente horizontal a una velocidad eficaz para crear las condiciones de cizalla baja y fomentar la formación de agregados que comprenden los precursores de osteoclastos y los mencionados osteoblastos; el cultivo adicional de los agregados en el recipiente de cultivo cilíndrico durante la rotación sustancialmente horizontal a una velocidad eficaz para crear las condiciones de cizalla baja de modo que crece el tamaño de los agregados y los precursores de osteoclastos se diferencian en osteoclastos; y la introducción de un medio de cultivo de mineralización sin matriz en el recipiente de cultivo cilíndrico y cultivar los agregados durante la rotación sustancialmente horizontal a una velocidad eficaz para crear las condiciones de cizalla baja, en el que se forman las construcciones óseas tridimensionales mineralizadas.

En otro aspecto, la descripción da a conocer una construcción ósea tridimensional mineralizada producida mediante la introducción de los precursores de osteoclastos y los osteoblastos en un recipiente de cultivo cilíndrico que rota alrededor de un eje sustancialmente horizontal central, y el recipiente de cultivo cilíndrico comprende un medio de cultivo sin matriz; el cultivo de los osteoblastos y de los precursores de osteoclastos en el recipiente de cultivo cilíndrico durante la rotación sustancialmente horizontal a una velocidad eficaz para crear las condiciones de cizalla baja y para favorecer la formación de agregados que comprenden los precursores de osteoclastos y dichos osteoblastos; el cultivo adicional de los agregados en el recipiente de cultivo cilíndrico durante la rotación sustancialmente horizontal a una velocidad eficaz para crear las condiciones de cizalla baja, de modo que crece el tamaño de los agregados y los precursores de osteoclastos se diferencian en osteoclastos; y la introducción de un medio de cultivo de mineralización sin matriz dentro del recipiente de cultivo cilíndrico y el cultivo de los agregados durante la rotación sustancialmente horizontal a una velocidad eficaz para crear las condiciones de cizalla baja, en las que se forman las construcciones óseas tridimensionales mineralizadas.

30 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama de flujo de un ejemplo de un método para preparar construcciones óseas tridimensionales mineralizadas.

Las figuras 2A-2B presentan imágenes de construcciones óseas tridimensionales mineralizadas a 14 días de mineralización (figura 2A) y a 21 días de mineralización (figura 2B). Las barras de escala representan 1 cm cada una.

Las figuras 3A-3B presentan imágenes de construcciones óseas tridimensionales mineralizadas. La figura 3A presenta una imagen de microscopía confocal de fluorescencia de un corte para microscopía óptica de construcciones óseas en la que las células de los precursores de osteoclastos se marcaron con un colorante fluorescente para el rastreo de células (observable como manchas blancas en la figura 3A). La figura 3B muestra las mismas construcciones vistas con luz láser incidente (a saber, iluminación no fluorescente) para ilustrar la forma de las construcciones. Cada una de las barras de escala de las figuras 3A y 3B es de 200 µm.

La figura 4 presenta una reconstrucción tridimensional de una construcción ósea grande que utiliza la serie Z de imágenes confocales. Los precursores de los osteoclastos se marcaron con un colorante fluorescente para rastreo de células. Los paneles A-I de la figura 4 son cada una de las imágenes utilizadas por el programa de imagen confocal para elaborar la reconstrucción óptica de la construcción ósea en tres dimensiones, representando cada una una vista secuencial sobre la superficie de la construcción (las manchas blancas señalan cada una de las células).

Las figuras 5A-5D muestran la tinción con rojo de alizarina S y la tinción de von Kossa de cortes de una construcción ósea. La figura 5A muestra una imagen ampliada a 5X de tinción con rojo de alizarina S y la figura 5B muestra una imagen ampliada a 20X de tinción con rojo de alizarina S (que aparece como las regiones oscuras de las imágenes). La figura 5C muestra una imagen aumentada a 5X de la tinción de von Kossa y la figura 5D muestra una imagen ampliada a 20X de la tinción de von Kossa (que aparece como las regiones oscuras de las imágenes).

Las figuras 6A-6B muestran la tinción con hematoxilina de Harris de los cortes de una construcción ósea. La figura 6A es una imagen ampliada a 5X y la figura 6B es una imagen ampliada a 20X. Las regiones oscuras de la imagen indican tinción. Las flechas en la figura 6b apuntan a un grandes conjuntos de células integradas dentro de la matriz

cristalina de la construcción tridimensional.

Las figuras 7A-7C muestran imágenes de la construcción ósea en la que los precursores de osteoclastos se marcaron con un colorante fluorescente para el rastreo de células antes de la formación de la construcción ósea, y la construcción ósea se tiñó con un anticuerpo primario contra la osteocalceína (un marcador de la diferenciación de los osteoclastos) y un anticuerpo secundario marcado con Alexa 488. La figura 7A muestra la tinción de la osteocalceína, la figura 7B muestra tinción con CellTracker-Orange y la figura 7C muestra la misma construcción iluminada con luz láser incidente. Los resultados indican que la tinción de la osteocalceína y el colorante para rastreo de células (ambos visibles como un «anillo» blanco alrededor de la construcción en las figuras 7A y 7B) están localizados espacialmente en la misma área de la construcción.

10 Descripción detallada

En un aspecto, la presente descripción da a conocer construcciones óseas tridimensionales mineralizadas (a veces denominadas en la presente memoria simplemente como «construcciones óseas») hechas de acuerdo con los métodos reivindicados. Las construcciones tridimensionales mineralizadas de la descripción son de «de tipo óseo» en apariencia por inspección visual, y en algunos aspectos importantes se parecen al hueso trabecular (también conocido en la técnica como «hueso esponjoso»). En las realizaciones preferentes, las construcciones óseas tridimensionales mineralizadas de la descripción son de tamaño macroscópico y tienen una forma aproximadamente esférica, preferentemente entre unos 200 μm y unos 4 mm de diámetro; sin embargo, se contemplan específicamente construcciones óseas más grandes y más pequeñas.

Las construcciones óseas comprenden un núcleo interno rodeado por una capa externa. El núcleo interno comprende una matriz cristalina tridimensional que se tiñe positivamente con la tinción con rojo de alizarina S y con la tinción histoquímica de von Kossa, lo que indica que comprende elementos minerales observados en el hueso humano normal *in vivo*, entre ellos calcio, fosfatos y carbonatos. El núcleo interno también comprende osteoblastos y/o osteocitos integrados dentro de la matriz cristalina y está preferentemente desprovisto de tejido necrótico. Los osteocitos son células inactivas desde el punto de vista del desarrollo que se encuentran sólo en el tejido óseo nativo *in vivo* y se cree que se forman a partir de los osteoblastos que se han quedado atrapados en la matriz cristalina. La capa externa está comprendida por osteoclastos, que pueden expresar el marcador de diferenciación osteocalceína. Los tipos de células de las construcciones óseas de la descripción se pueden obtener de cualquier especie de mamífero, pero se obtienen preferentemente de humanos.

En otro aspecto, la descripción da a conocer métodos para producir las construcciones óseas tridimensionales mineralizadas. En general, las construcciones óseas de la descripción se producen cultivando precursores de osteoclastos y osteoblastos juntos en condiciones de vector de gravedad aleatorio (que se acercan a esas condiciones que experimentan las células cultivadas durante el cultivo de microgravedad) en un medio de cultivo sin matriz. Los precursores de osteoclastos se pueden obtener de la médula ósea y/o de linfocitos de la sangre periférica mediante técnicas bien conocidas en la técnica. Los precursores de osteoclastos se pueden obtener también de fuentes comerciales (por ejemplo, de Cambrex/Lonza, Inc). Los osteoblastos, preferentemente los osteoblastos humanos primarios, también se pueden obtener mediante técnicas bien conocidas en la técnica, y también se pueden obtener de fuentes comerciales (por ejemplo, de PromoCell, Inc., y de Cambrex/Lonza, Inc.). Un «medio de cultivo sin matriz» es un medio de cultivo de células que no incluye material transportador (tales como perlas microtransportadoras o geles de colágeno) a la que se pueden pegar los osteoblastos y los precursores de osteoclastos. Los medios de cultivo de células adecuados incluyen el medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) o el medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), preferentemente complementados con suero bovino fetal (SBF). Preferentemente, el medio de cultivo sin matriz también comprende complementos de crecimiento para osteoblastos tales como ácido ascórbico. El medio de cultivo sin matriz también comprende preferentemente además factores de diferenciación de osteoclastos, tales como el ligando del receptor activador de NF- κ B (RANK) y el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF). Por ejemplo, en una realización, el medio de cultivo sin matriz comprende DMEM complementado con SFB, ácido ascórbico, ligando del RANK, y M-CSF. El ejemplo 2 incluye una descripción de un medio de cultivo sin matriz adecuado.

Los precursores de osteoclastos y los osteoblastos se cultivan juntos en condiciones de vector de gravedad aleatorio que son eficaces para conseguir la formación de agregados mixtos de los dos tipos de células. A continuación se cultivan los agregados en condiciones de vector de gravedad aleatorio para incrementar el tamaño de los agregados y para diferenciar los precursores de osteoclastos en osteoclastos maduros.

Después de un tiempo predeterminado, se cultivan los agregados en condiciones de vector de gravedad aleatorio en un medio de cultivo de mineralización sin matriz. Un «medio de cultivo de mineralización sin matriz» es un medio de cultivo de células que incluye uno o más agentes de mineralización, tales como factores de diferenciación de osteoblastos, que inducen a los osteoblastos para que produzcan depósitos cristalinos (que comprenden calcio, fosfato y carbonatos), pero que no incluye material de transporte (tales como perlas microtransportadoras y geles de

- colágeno) sobre el que se puedan adherir los osteoblastos y los precursores de osteoclastos. Por ejemplo, en una realización, un medio de cultivo de mineralización sin matriz comprende EMEM o DMEM complementado con SBF, complementado con los factores de diferenciación de osteoblastos. Los factores de diferenciación de osteoblastos incluyen β -glicerofosfato y hemisuccinato de hidrocortisona-21. Preferentemente, el medio de cultivo de mineralización sin matriz también incluye factores de diferenciación de osteoclastos tales como el ligando del RANK y M-CSF, y también incluye complementos para el crecimiento de los osteoblastos tales como ácido ascórbico. Por ejemplo, en una realización, el medio de cultivo de mineralización sin matriz comprende DMEM complementado con SBF, β -glicerofosfato, ácido ascórbico, hemisuccinato de hidrocortisona-21, ligando del RANK y M-CSF. El ejemplo 2 incluye una descripción de un medio de mineralización sin matriz adecuado.
- 10 Las condiciones de vector de gravedad aleatorio se obtienen cultivando los precursores de osteoclastos y los osteoblastos en un biorreactor rotatorio con tensión de cizalla baja. Tales biorreactores se diseñaron inicialmente para imitar algunas de las condiciones físicas experimentadas por las células cultivadas en microgravedad real durante los vuelos espaciales. En general, un biorreactor rotatorio con tensión de cizalla baja comprende un recipiente de cultivo cilíndrico. Uno o más puertos están operativamente asociados con la luz del recipiente para la introducción y la retirada de las células y de los medios de cultivo. El recipiente de cultivo cilíndrico está completamente lleno de un medio de cultivo para eliminar el espacio de cabeza.
- 15 El recipiente de cultivo cilíndrico rota alrededor de un eje sustancialmente horizontal central. La rotación sustancialmente horizontal resultante se produce a una velocidad elegida de tal forma que 1) no hay esencialmente movimiento relativo entre las paredes del recipiente y el medio de cultivo; y 2) las células permanecen en suspensión dentro de una región espacial determinada del recipiente de modo que experimentan una continua «caída libre» a través del medio de cultivo a la velocidad límite con tensión de cizalla baja y poca turbulencia. Este estado de caída libre se puede mantener continuamente hasta varios meses en algunas aplicaciones descritas en la técnica previa. El movimiento orbital continuo del medio respecto a las células también permite una transferencia muy eficaz de gases y nutrientes.
- 20 En algunas realizaciones, el diámetro del recipiente de cultivo cilíndrico es sustancialmente más grande que su altura. Tales recipientes de cultivo cilíndricos a menudo se denominan en la técnica recipientes con una alta proporción de aspecto (HARV, por su sigla en inglés). Por ejemplo, un HARV que tiene un volumen de 10 ml puede tener un diámetro de unos 10 cm y una altura de aproximadamente 1 cm. Al menos una porción de las paredes del vaso puede comprender una membrana permeable a los gases para permitir el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el entorno del incubador circundante. Un HARV adecuado se describe en, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 5 437 998. Una realización comercial de un HARV es el sistema de cultivo de células en rotación (RCCS, por su sigla en inglés) disponible de Synthecon, Inc.
- 25 En algunas realizaciones, el diámetro del recipiente de cultivo cilíndrico es sustancialmente más pequeño que su altura. Tales recipientes de cultivo cilíndricos a menudo se denominan en la técnica recipientes laterales que giran lentamente (STLV, por su sigla en inglés). Un STLV típicamente tiene un núcleo, que comprende una membrana permeable a los gases, que corre por el centro del cilindro para permitir el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el entorno del incubador circundante. Los STLV están disponibles en Synthecon, Inc.
- 30 El uso de sistemas de cultivo de un biorreactor rotatorio con tensión de cizalla baja se describe en, por ejemplo, Nickerson et al., *Immunity*, 69: 7106-7120 (2001); Carterson et al., *Infection & Immunity*, 73 (2): 1129-40 (2005); y en Goodwin et al., patente de los EE.UU. n.º 5 496 722.
- 35 En una realización se introducen los precursores de osteoclastos y los osteoblastos en un recipiente de cultivo cilíndrico en medio de cultivo sin matriz. Los precursores de osteoclastos y los osteoblastos se pueden introducir en el recipiente de cultivo cilíndrico por separado, o se pueden introducir en el recipiente de cultivo cilíndrico como una mezcla previa de los dos tipos de células. Preferentemente se introducen las células en el recipiente de cultivo cilíndrico en una proporción de osteoblastos:precursores de osteoclastos de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 3:1, aunque tanto las proporciones más elevadas como las más pequeñas se encuentran dentro del alcance de la descripción. El número absoluto de células introducidas en el recipiente de cultivo cilíndrico también puede variar. Por ejemplo, en algunas realizaciones en las que se emplea una proporción de aproximadamente 2:1, se introducen unos 2 millones de osteoblastos y aproximadamente 1 millón de precursores de osteoclastos; en otras realizaciones se introducen unos 4 millones de osteoblastos y unos 2 millones de precursores de osteoclastos; y aún en otras realizaciones se introducen unos 8 millones de osteoblastos y unos 4 millones de precursores de osteoclastos. Se puede variar la proporción de osteoblastos:precursores de osteoclastos y el número absoluto de células para variar el tamaño y el número de agregados que se forman. Además, también se pueden introducir otros tipos de células en el recipiente de cultivo cilíndrico. Por ejemplo, se pueden cultivar células del estroma de la médula ósea y células troncales junto con los osteoblastos y los precursores de osteoclastos.
- 40 Se pueden marcar opcionalmente uno o más tipos de células con un marcador de rastreo celular, tal como un

colorante fluorescente de rastreo de células, antes de su introducción en el recipiente de cultivo cilíndrico. De este modo, es posible determinar la localización de cada tipo de célula durante la formación de las construcciones óseas, o cuando se terminaron de formar. Por ejemplo, se pueden utilizar colorantes fluorescentes CellTracker, disponibles en Invitrogen Inc., junto con técnicas de microscopía de fluorescencia, tal como microscopía confocal de fluorescencia. Si se marca más de un tipo de célula, entonces se marcan con colorantes de diferentes colores, de tal forma que cada tipo de célula se puede rastrear independientemente.

A continuación se cultivan las células en el medio de cultivo sin matriz en el recipiente de cultivo cilíndrico durante la rotación sustancialmente horizontal para formar agregados de los dos tipos de células. La velocidad de la rotación sustancialmente horizontal durante la fase de agregación se elige de tal forma que 1) se obtienen condiciones de cizalla baja; y 2) los precursores de osteoclastos y los osteoblastos pueden juntarse y formar agregados. La velocidad de la rotación sustancialmente horizontal se puede seleccionar controlando el recipiente de cultivo cilíndrico y controlando las células y los agregados en el recipiente de cultivo cilíndrico (por ejemplo, mediante microscopía), para asegurarse de que las células y los agregados no se sedimentan (lo que podría deberse a una velocidad de rotación demasiado baja) o experimentan una tensión de cizalla hidrodinámica excesiva o mecánica. En las realizaciones en las que se utiliza un HARV, los precursores de osteoclastos y los osteoblastos pueden formar una capa de «frontera» situada en el centro del HARV durante la fase de agregación.

Preferentemente, la velocidad de la rotación sustancialmente horizontal durante la fase de agregación es más baja que la velocidad típicamente utilizada para cultivar células. Por ejemplo, en las realizaciones donde el recipiente de cultivo cilíndrico es un HARV de 10 ml que tiene un diámetro de unos 10 cm y una altura de aproximadamente 1 cm, se puede utilizar una rotación sustancialmente horizontal a menos de unas 14 revoluciones por minuto (rpm). Más preferentemente, se utiliza una rotación sustancialmente horizontal a menos de unas 12 rpm. En determinadas realizaciones preferentes se utiliza una rotación sustancialmente horizontal en entre aproximadamente 1 rpm y aproximadamente 4 rpm. En una realización específica, se utiliza una rotación sustancialmente horizontal de unas 2 rpm. Obsérvese que los valores de rpm que se acaban de mencionar se proporcionan con referencia a un HARV de 10 ml que tiene las dimensiones que se acaban de mencionar. Los valores de las rpm variarán según el volumen y las dimensiones del recipiente de cultivo cilíndrico. Los valores de las rpm durante la fase de agregación para tales recipientes se determinan fácilmente mediante la metodología antes mencionada.

Sin verse obligados por una teoría o mecanismo particular, se cree que el uso del medio de cultivo sin la matriz permite el uso de velocidades de rotación que son sustancialmente más bajas que las descritas anteriormente en la técnica para cultivar células de mamíferos en un biorreactor rotatorio con tensión de cizalla baja. A su vez, se cree por primera vez que el uso de las velocidades bajas de rotación favorece la asociación eficaz de los precursores de osteoclastos y los osteoblastos para formar agregados, y favorece la organización tridimensional de estos dos tipos de células dentro de los agregados. Por lo tanto, la organización de los tipos de células dentro del agregado no está constreñida o influida por un material transportador exógeno, sino más bien por una interacción nativa entre las células. Por consiguiente, la organización tridimensional de los osteoblastos y los osteoclastos es fisiológicamente realista.

La velocidad de la rotación sustancialmente horizontal se puede ajustar opcionalmente a intervalos regulares durante la fase de agregación para compensar el incremento de la velocidad de sedimentación (que es una función del volumen y de la densidad) de los agregados que se forman, al mismo tiempo que se mantienen los agregados en una «caída libre» de cizalla baja y se impide que choquen con la pared del recipiente.

La fase de agregación continúa durante un periodo de tiempo suficiente para producir los agregados del tamaño deseado. Se puede controlar la formación de los agregados durante la fase de agregación mediante inspección visual, que incluye el uso de microscopía. Será evidente a partir de la descripción que el tamaño de los agregados también depende del número de células que inicialmente se introdujo en el recipiente de cultivo cilíndrico, el tiempo que se dejó que agregaran, así como la velocidad de rotación. En un ejemplo se deja que la fase de agregación transcurra durante entre unas 24 horas y unas 48 horas.

Una vez que se han formado los agregados del tamaño deseado, los agregados se cultivan de nuevo preferentemente en el recipiente de cultivo cilíndrico con rotación sustancialmente horizontal durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que los agregados crezcan hasta un tamaño deseado mediante proliferación celular y/o para permitir que los precursores de osteoclastos en los agregados se diferencien en osteoclastos. Por ejemplo, el cultivo adicional de los agregados puede continuar durante entre unos 5 y unos 7 días y puede conducir a que crezcan agregados que tienen un diámetro de entre unos 200 μm y unos 4 mm. Los agregados resultantes a veces se denominan en la presente memoria «esferoides». Preferentemente, la velocidad de la rotación sustancialmente horizontal durante el cultivo adicional es más elevada que la velocidad durante la fase de agregación, pero todavía proporciona unas condiciones de cizalla baja en el recipiente de cultivo cilíndrico. Por ejemplo, se puede utilizar una velocidad de rotación de entre unas 9 rpm y unas 16 rpm, preferentemente unas 14 rpm, durante el cultivo adicional en el HARV de 10 ml que se usó de ejemplo anteriormente. Se puede ajustar opcionalmente la velocidad de la

rotación sustancialmente horizontal a intervalos regulares durante la fase de cultivo adicional para compensar el aumento de la vía de sedimentación de los agregados a medida que crece su tamaño (y, por lo tanto, sufren cambios de volumen y de densidad), por lo que se mantienen los agregados en crecimiento en una «caída libre» de cizalla baja y se impide que choquen con la pared del recipiente.

- 5 Una vez que los agregados han alcanzado un tamaño deseado, se introduce un medio de cultivo de mineralización sin matriz dentro del recipiente de cultivo cilíndrico y se cultivan los agregados en rotación sustancialmente horizontal hasta que se mineralizan, por lo que forman las construcciones óseas tridimensionales mineralizadas de la descripción. Por ejemplo, el proceso de mineralización puede continuar durante entre unos 7 días y unos 21 días. Preferentemente, la velocidad de la rotación sustancialmente horizontal durante tal proceso de mineralización es más elevada que la velocidad durante la fase de agregación, pero todavía proporciona unas condiciones de cizalla baja en el recipiente de cultivo cilíndrico. Por ejemplo, se puede utilizar una velocidad de rotación de entre unas 9 rpm y unas 20 rpm, preferentemente unas 14 rpm, durante la fase de mineralización en el HARV de 10 ml que se usó de ejemplo anteriormente. La velocidad de la rotación sustancialmente horizontal se puede ajustar opcionalmente a intervalos regulares durante la fase de mineralización para compensar el incremento de la vía de sedimentación de los agregados a medida que aumenta su masa, por lo que se mantiene a los agregados en mineralización en una «caída libre» de cizalla baja y se impide que choquen con las paredes del recipiente.

- 20 Las construcciones óseas tridimensionales mineralizadas se recogen una vez que han alcanzado el tamaño y la masa deseados. En los recipientes de cultivo cilíndricos con uno o más puertos de acceso se retiran las construcciones óseas a través de un puerto. Cuando las construcciones óseas exceden el diámetro del puerto, se desmonta el recipiente para retirar las construcciones óseas.

Los osteoclastos y los osteoblastos actúan de modo coordinado en el proceso de mineralización que se produce *in vivo* durante la formación del hueso y la reestructuración ósea. Por consiguiente, las construcciones óseas tridimensionales mineralizadas de la descripción, formadas mediante la actividad coordinada de los osteoblastos y de los osteoclastos, son fisiológicamente realistas.

- 25 Tal y como se describió más arriba, las construcciones óseas tridimensionales mineralizadas de la descripción imitan el hueso trabecular en muchos aspectos importantes. Por lo tanto, las construcciones óseas de la descripción tienen muchos y magníficos usos en los ámbitos, por ejemplo, de la investigación y del desarrollo fisiológicos, de la investigación farmacéutica y de la ortopedia. Sin limitación, éstos incluyen el beneficio directo de desarrollar un modelo para estudiar tanto la fisiología normal del hueso como las respuestas patológicas observadas en estados patológicos, tales como osteoporosis, así como por proporcionar una plataforma muy económica para el desarrollo de fármacos que tengan relación con el tratamiento de osteopatías.

- 35 Las construcciones óseas de la descripción también se pueden utilizar para injertos autólogos. En concreto, se puede reemplazar el hueso enfermo o ausente con construcciones óseas tridimensionales mineralizadas de procedencia *ex vivo* en las que los osteoclastos y osteoblastos que las componen se recogen de hueso sano y de linfocitos de la sangre periférica del paciente que requiere el injerto óseo. Ejemplos de enfermedades donde las construcciones óseas de la descripción tienen utilidad terapéutica incluyen fracturas, fracturas que no se unen, deformidades congénitas del hueso, infecciones óseas, osteólisis, defectos segmentarios del hueso, tumores óseos, trastornos metabólicos y endocrinos que afectan al hueso y pérdida de dientes.

- 40 Las construcciones óseas de la descripción también se pueden utilizar para injertos alogénos (aloinjertos). Específicamente, el hueso enfermo o ausente se puede reemplazar por construcciones óseas tridimensionales mineralizadas de procedencia *ex vivo* en las que los osteoblastos y los osteoclastos que la componen se recogen de hueso sano y de linfocitos de la sangre periférica de otro donante para el beneficio de un paciente que requiere el injerto óseo. Ejemplos de enfermedades donde las construcciones óseas de la descripción tienen utilidad terapéutica incluyen fracturas, fracturas que no se unen, deformidades congénitas del hueso, infecciones óseas, osteólisis, defectos segmentarios del hueso, tumores óseos, trastornos metabólicos y endocrinos que afectan al hueso y pérdida de dientes.

Dado que las construcciones óseas de la descripción se parecen mucho al hueso formado *in vivo*, se espera que produzcan factores únicos y/o citocinas esenciales para la remodelación ósea. Por consiguiente, las construcciones óseas de la descripción sirven de fuente para la identificación y recogida de estos factores.

- 50 Las construcciones óseas de la descripción también se pueden utilizar para estudiar la interfaz entre los dispositivos/materiales protésicos y el tejido óseo.

En las construcciones óseas de la descripción se pueden incorporar dispositivos sensores o de estimulación, e implantar las construcciones resultantes en el tejido óseo *in vivo*.

Las construcciones óseas de la descripción también se pueden utilizar para producir grandes estructuras de

dimensiones específicas para aplicaciones de «ajustadas a la forma» tales como el reemplazo de grandes regiones del esqueleto. Esto se puede conseguir mediante una combinación de materiales de soporte sintéticos/de armazón de tejido en los que se integran numerosas construcciones óseas para generar un agregado de tejido compuesto mucho más grande.

- 5 Las construcciones óseas de la descripción también proporcionan una alternativa de bajo coste en la cual estudiar los efectos de la microgravedad, y de otras agresiones del entorno espacial, tales como la irradiación, en el proceso de formación ósea/osteólisis.

Los ejemplos siguientes no se interpretarán de ningún modo como limitantes del alcance de la invención descrita en la presente memoria.

10 Ejemplos

Ejemplo 1: diagrama de flujo de un método para producir construcciones óseas

En la figura 1 se muestra un diagrama de flujo para producir construcciones óseas tridimensionales mineralizadas. Primero se aíslan (110) las células de osteoblastos y de precursores de osteoclastos de un paciente sano y luego se inoculan (120) en un recipiente rotatorio de alta proporción de aspecto (HARV) con un medio de cultivo sin matriz.

- 15 Se deja que las células se agreguen (130) a una velocidad de rotación (típicamente 2 rpm) mucho más baja que la utilizada habitualmente para el cultivo de células de mamíferos. La velocidad baja favorece la agregación de dos o más tipos de células en las etapas tempranas de la formación de agregados. Después de determinar el periodo de agregación, se incrementa la velocidad de rotación del recipiente rotatorio de alta proporción de aspecto (140). Esto permite que la construcción ósea crezca en esferoides (150) en un estado de «caída libre». A continuación se inicia
- 20 la etapa de mineralización (160) al cambiar el medio de cultivo inicial sin matriz por un medio de cultivo de mineralización sin matriz, que inicia la producción de una matriz cristalina calcificada en el centro del agregado de tejido. Luego se caracterizan las construcciones óseas. Se observa la distribución espacial de los diferentes tipos de células mediante imágenes de microscopia confocal (170). Se visualizan las células con una serie Z de imágenes
- 25 confocales (175) al marcar previamente los constituyentes celulares iniciales de la construcción con la sonda fluorescente verde de rastreo de células. La presencia de calcio, fosfato y carbonato se revela mediante la tinción con rojo de alizarina S y la tinción histoquímica de Kossa (180), mientras que la presencia de células nucleadas integradas en la matriz cristalina se revela mediante la tinción de los núcleos (185). La inmunotinción de la construcción (190) muestra que los marcadores celulares tales como la fosfatasa alcalina están ausentes de las células integradas en la matriz cristalina. Finalmente, la marcación previa de las células de los precursores de
- 30 osteoclastos con Cell Tracker-Orange (195) muestra que las células precursoras que se pudieron agregar y organizar en estas condiciones de cultivo expresan el marcador de diferenciación de los osteoclastos, a saber, la osteocalceína.

Ejemplo 2: producción de construcciones óseas en un HARV

Se compraron células crioconservadas de osteoblastos humanos normales primarios y precursoras de osteoclastos humanos normales a Cambrex Corporation (East Rutherford, NJ) y se almacenaron congeladas en nitrógeno líquido hasta que se necesitaron.

- Los osteoblastos se descongelaron rápidamente al colocar el vial en un horno a 37 °C, luego se retiró la suspensión celular del vial y se colocó en un tubo de centrifugación de 15 ml, y entonces se diluyó la suspensión celular con 10 ml del medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal al 10% (v/v) (SBF al
- 40 10%-DMEM). A continuación se recogieron las células por centrifugación a 100 x g durante 5 min a 4 °C. Después se retiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular mediante una titulación suave en 10 ml de SBF al 10%-DMEM recién preparado complementado con ácido ascórbico a 5 µM y GA-1000 a 1 mg/ml (mezcla de gentamicina/amfotericina B). Este proceso se realizó para limpiar con agua los crioconservantes en los que los osteoblastos se habían congelado.

- 45 Entonces se inoculó la suspensión celular resultante en un frasco de cultivo de tejidos T-75 y se incubó a 37 °C en un incubador de cultivo de tejidos en atmósfera de CO₂ al 5% durante un periodo total de siete días, con cambio del medio cada tres días. Después de siete días, el cultivo de osteoblastos se acercó a la confluencia y se recogieron los osteoblastos retirando las células de la superficie del frasco mediante la digestión con tripsina/EDTA seguida de la recogida de las células mediante centrifugación como se describe más arriba. A continuación, el sedimento celular
- 50 se resuspendió suavemente en 20 ml de SBF al 10%-DMEM recién preparado complementado con ácido ascórbico a 5 µM y GA-1000 a 1 mg/ml. Luego se inoculó la suspensión celular resultante en dos frascos de cultivo de tejidos T-75 y de nuevo se cultivó durante siete días más. Este proceso de expansión de osteoblastos continuó hasta que las células alcanzaron el pase 5 (a saber, cinco ciclos de expansión/duplicación de la población).

Cuando las células de los osteoblastos habían alcanzado el pase 5 en el cultivo, se recogieron utilizando la digestión

- con tripsina/EDTA seguida de la recogida de las células mediante centrifugación, como se describe más arriba. A continuación se resuspendió suavemente el sedimento celular en 10 ml de SBF al 10%-DMEM recién preparado complementado con ácido ascórbico a 5 μ M, penicilina a 100 U/ml y estreptomina a 100 μ g/ml, de manera que la penicilina/estreptomina sustituyó a GA-1000 en este punto debido a los posibles efectos negativos de la gentamicina sobre la capacidad de los osteoblastos para producir matriz extracelular mineralizada. La suspensión celular de osteoblastos resultante se contó con un hemocitómetro para evaluar el número de osteoblastos por mililitro. Se retiró una alícuota de la suspensión celular que contenía seis millones de osteoblastos en total y se colocó en un tubo de centrifugación de 15 ml diferente en preparación para añadir las células precursoras de los osteoclastos.
- 10 Las células precursoras de los osteoclastos se descongelaron rápidamente colocando el vial en un horno a 37 °C, retirando la suspensión celular del vial y colocándola en un tubo de centrifugación de 15 ml, y luego diluyendo la suspensión celular con 10 ml del medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal al 10% (v/v) (SBF al 10%-DMEM). Luego, las células se recogieron mediante centrifugación a 100 x g durante 5 min a 4 °C. Entonces se retiró el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió con suavidad en 1 ml de SBF al 10%-DMEM recién preparado complementado con ácido ascórbico a 5 μ M, penicilina a 100 U/ml y estreptomina a 100 μ g/ml. Este proceso se realizó para limpiar con agua los crioprotectores en los que los se habían congelado los osteoclastos.

- Se contó la suspensión celular de los precursores de osteoclastos resultante utilizando un hemocitómetro para evaluar el número de precursores de osteoclastos por mililitro. Se retiró una alícuota de suspensión celular que contenía un total de dos millones de células de osteoclastos y se añadió al tubo de centrifugación de 15 ml que contenía los seis millones de células de osteoblastos. A continuación se ajustó el volumen del medio en el tubo de centrifugación a un total de 10 ml añadiendo SBF al 10%-DMEM recién preparado complementado con ácido ascórbico a 5 μ M, penicilina a 100 U/ml y estreptomina a 100 μ g/ml. Finalmente, los 10 ml del medio que contiene osteoblastos y osteoclastos se complementó con el factor estimulador de colonias de macrófagos a 50 ng/ml y el ligando del receptor activador del NF- κ B (RANK) a 50 ng/ml.

- A continuación, la suspensión celular de osteoblastos/osteoclastos resultante se inoculó en un frasco del sistema de cultivo celular rotatorio (RCCS) de 10 ml (también conocido como recipiente con una alta proporción de aspecto, HARV por sus siglas en inglés) (Synthecon, Inc.) y se hizo rotar horizontalmente a 2 rpm durante un periodo de 24 h para permitir la agregación de los osteoblastos y los osteoclastos en una construcción sólida de tejido tridimensional. Después de un periodo de 24 horas, se incrementó la velocidad de rotación del HARV a 14 rpm para asegurarse de que la construcción del tejido se mantuviese en una posición óptima dentro del HARV, esto es, sin tocar ni golpear los lados del HARV en rotación en vez de en un estado de «caída libre» dentro del medio contenido dentro del HARV en rotación. El medio celular dentro del HARV se cambió por 10 ml de SBF al 10%-DMEM recién preparado complementado con ácido ascórbico a 5 μ M, penicilina a 100 U/ml, estreptomina a 100 μ g/ml, factor estimulador de colonias de macrófagos a 50 ng/ml (M-CSF) y ligando del receptor activador del NF- κ B (RANK) a 50 ng/ml (un medio de cultivo sin matriz) cada cuatro días de cultivo.

- Después de un periodo de siete días de cultivo en el HARV en la condiciones mencionadas más arriba, se cambió el medio por 10 ml de SBF al 10%-DMEM recién preparado complementado con ácido ascórbico a 5 μ M, penicilina a 100 U/ml, estreptomina a 100 μ g/ml, factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) a 50 ng/ml, ligando del receptor activador del NF- κ B (RANK) a 50 ng/ml, hemisuccinato de hidrocortisona-21 a 200 μ M y β -glicerofosfato a 10 mM (un medio de cultivo de mineralización sin matriz). Se añadieron el hemisuccinato de hidrocortisona-21 y el β -glicerofosfato al medio para inducir a que los osteoblastos mineralicen la construcción de tejido. El medio celular dentro del HARV se cambió por 10 ml de SBF al 10%-DMEM recién preparado complementando con ácido ascórbico a 5 μ M, penicilina a 100 U/ml, estreptomina a 100 μ g/ml, factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) a 50 ng/ml, ligando del receptor activador del NF- κ B (RANK) a 50 ng/ml, hemisuccinato de hidrocortisona-21 a 200 μ M y β -glicerofosfato a 10 mM cada cuatro días hasta que se recogió la construcción del tejido.

Ejemplo 3: imágenes de las construcciones óseas

- Se siguió el método del ejemplo 2, con las diferencias siguientes: se mezclaron juntos los osteoblastos primarios y los precursores de los osteoclastos a aproximadamente una proporción de 2:1 de osteoblastos por precursores de osteoclastos, siendo el número total de células de aproximadamente 9 millones de células; a continuación se hizo rotar horizontalmente la mezcla de células a 2 rpm durante 48 horas y luego a 14 rpm durante 5 días; y se continuó la mineralización a 16 rpm durante 21 días. Las construcciones óseas tridimensionales mineralizadas resultantes se ilustran en la figura 2A (a 14 días de mineralización) y en la figura 2B (a 21 días de mineralización). La barra de escala de cada figura es 1 cm.

55 Ejemplo 4: construcciones óseas con osteoclastos marcados

Se siguió el método del ejemplo 2, con las diferencias siguientes: se marcaron los precursores de osteoclastos con

la sonda fluorescente CellTracker-Red (Invitrogen, Inc.) antes de mezclarlos con los osteoblastos; los osteoblastos primarios y los precursores de los osteoclastos marcados se mezclaron juntos a una proporción de aproximadamente 2:1 de osteoblastos por precursores de osteoclastos, siendo el número total de células aproximadamente 3 millones de células; después se hizo rotar horizontalmente la mezcla de células a 2 rpm durante 5 24 horas y luego a 14 rpm durante 5 días; y la mineralización se continuó a 16 rpm durante 14 días. La figura 3A muestra una imagen de microscopía confocal de fluorescencia de un corte para microscopía óptica de algunas de las construcciones óseas tridimensionales mineralizadas resultantes. Los resultados muestran que las células precursoras de los osteoclastos (observables como manchas blancas en la figura 3A) se han distribuido por sí solas como una capa externa en las construcciones óseas tridimensionales mineralizadas con los posibles osteoblastos integrados en la matriz cristalina de la región central de las construcciones. La figura 3B muestra las mismas construcciones vistas con luz láser incidente (a saber, iluminación no fluorescente) para ilustrar la forma de las construcciones. La barra de escala de las figuras 3A y 3B es de 200 µm.

Ejemplo 5: corte para microscopía óptica de una construcción ósea con osteoclastos marcados

Se siguió el método del ejemplo 2, con las diferencias siguientes: se marcaron los precursores de los osteoclastos con la sonda fluorescente CellTracker-Green (Invitrogen, Inc.) antes de mezclarlos con los osteoblastos; se mezclaron juntos los osteoblastos primarios y los precursores de los osteoclastos marcados en una proporción de aproximadamente 2:1 de osteoblastos por precursores de osteoclastos, siendo el número total de células aproximadamente 6 millones de células; a continuación se hizo rotar horizontalmente la mezcla de células a 2 rpm durante 48 horas y luego a 14 rpm durante 5 días; y se continuó la mineralización a 16 rpm durante 21 días. Se realizó una reconstrucción tridimensional de una construcción ósea grande resultante mediante una serie Z de imágenes confocales. Los paneles A-I de la figura 4 son las imágenes individuales utilizadas por el programa informático de imagen confocal para elaborar la reconstrucción óptica de la construcción ósea en tres dimensiones, representando cada imagen una vista secuencial sobre la superficie de la construcción (las manchas blancas indican células independientes). En la figura 4 se indica que la distribución de los osteoclastos en la capa externa de la construcción sigue siendo una característica de la construcción, incluso después de largos periodos de cultivo (a saber, un total de cuatro semanas en el recipiente HARV, que incluye las tres semanas de crecimiento en las condiciones de mineralización). Los osteoclastos marcados se observan con claridad en una capa externa que cubre la superficie de la construcción.

Ejemplo 6: tinción de las construcciones óseas con las tinciones con rojo de alizarina S, de von Kossa y con hematoxilina de Harris

Se prepararon construcciones óseas tridimensionales mineralizadas como se detalló en el ejemplo 3. A continuación se fijaron las construcciones óseas mediante una solución de Bouin (una disolución de fijación que penetra con rapidez), se cortaron congeladas, y se tiñeron para el calcio mediante la tinción con rojo de alizarina S y para los fosfatos y carbonatos mediante la tinción histoquímica de von Kossa. En la figura 5A se muestra una imagen ampliada a 5X de tinción con rojo de alizarina S y en la figura 5B se muestra una imagen ampliada a 20X de tinción con rojo de alizarina S (que aparece como las regiones oscuras de las imágenes). En la figura 5C se muestra una imagen ampliada a 5X de la tinción de von Kossa y en la figura 5B se muestra una imagen ampliada a 20X de la tinción de von Kossa (que aparece como las regiones oscuras de las imágenes). Los resultados demuestran que la matriz cristalina de las construcciones óseas tridimensionales mineralizadas contiene los elementos minerales observados en hueso humano normal *in vivo*.

También se tiñeron los mismos cortes para observar la presencia de células nucleadas mediante la tinción con hematoxilina de Harris. Los resultados se muestran en la figura 6A (imagen ampliada a 5X) y en la figura 6B (imagen ampliada a 20X). Las regiones oscuras de la imagen indican la tinción. El patrón de la tinción ilustra un gran número de células integradas dentro de la matriz cristalina de la construcción tridimensional. Estos núcleos celulares aparecen intactos con pocos o ningún signo de fragmentación nuclear, un indicador histológico de que se está produciendo la muerte celular/apoptosis. Las flechas en la figura 6B apuntan a conjuntos grandes de células integradas dentro de la matriz cristalina en la construcción tridimensional. Los núcleos celulares aparecen intactos con pocos o ningún signo de fragmentación nuclear; tal fragmentación sería un indicador histológico de que se está produciendo la muerte celular/apoptosis. La inmunotinción de estos cortes en busca de la presencia de marcadores celulares de los osteoblastos, tales como la fosfatasa alcalina, indicó la ausencia de marcadores de células de osteoblastos en el tipo celular integrado en la matriz cristalina. Por lo tanto, se cree que las células integradas en la matriz cristalina son osteocitos.

Ejemplo 7: detección en las construcciones óseas, mediante inmunofluorescencia, de la osteocalceína, un marcador de la diferenciación de los osteoclastos

Se siguió el método del ejemplo 2, con las diferencias siguientes:

se marcaron los precursores de osteoclastos con la sonda fluorescente CellTracker-Orange (Invitrogen, Inc.) antes

de mezclarla con los osteoblastos; se mezclaron juntos los osteoblastos primarios y los precursores de los osteoclastos marcados a una proporción de aproximadamente 2:1 de osteoblastos por precursores de osteoclastos, siendo el número total de células de aproximadamente 6 millones de células; luego se hizo rotar horizontalmente la mezcla de células a 2 rpm durante 48 horas y después a 14 rpm durante 5 días; y se dejó que la mineralización
 5 tuviera lugar a 16 rpm durante 21 días. Se fijaron las construcciones óseas tridimensionales mineralizadas resultantes utilizando una solución salina tamponada con fosfato (pH 7,2) que contenía formaldehído al 1% (v/v) recién preparado. A continuación se tiñeron inmunohistoquímicamente las construcciones óseas fijadas mediante un anticuerpo monoclonal contra la osteocalceína (un marcador de la diferenciación de los osteoclastos) como el anticuerpo primario y un anticuerpo secundario marcado con Alexa 488. En la figura 7A-7C se muestran las
 10 imágenes obtenidas al fotografiar simultáneamente ambos marcadores en una de las construcciones óseas con microscopía confocal. Específicamente, en la figura 7A se muestra la tinción de osteocalceína, en la figura 7B se muestra la tinción con CellTracker-Orange y en la figura 7C se muestra la misma construcción iluminada con luz láser incidente. Los resultados indican que la tinción con osteocalceína y la tinción con CellTracker-Orange (ambas visibles como un «anillo» blanco alrededor de la construcción en las figuras 7A y 7B) están localizadas
 15 espacialmente en la misma área de la construcción. Esto indica que los precursores de las células de osteoclastos se han diferenciado en osteoclastos maduros que estaban localizados espacialmente en la superficie de la construcción.

Las realizaciones de la descripción se pueden resumir con las declaraciones siguientes:

A. Método para producir construcciones óseas tridimensionales mineralizadas, comprendiendo dicho método:

20 (a) introducir precursores de osteoclastos y osteoblastos en un recipiente de cultivo cilíndrico que rota en torno a un eje horizontal central, comprendiendo dicho recipiente de cultivo cilíndrico un medio de cultivo sin matriz;

(b) cultivar dichos osteoblastos y dichos precursores de osteoclastos en dicho recipiente de cultivo cilíndrico durante la rotación horizontal a una velocidad eficaz para crear las condiciones de cizalla baja y favorecer la formación de agregados que comprenden dichos precursores de osteoclastos y dichos osteoblastos;

25 (c) cultivar adicionalmente dichos agregados en dicho recipiente de cultivo cilíndrico durante la rotación horizontal a una velocidad eficaz para crear condiciones de cizalla baja, por lo que dichos agregados aumentan de tamaño y dichos precursores de osteoclastos se diferencian en osteoclastos;

(d) introducir un medio de cultivo de mineralización sin matriz en dicho recipiente de cultivo cilíndrico y cultivar dichos agregados durante la rotación horizontal a una velocidad eficaz para crear las condiciones de cizalla baja, en el que
 30 se forman dichas construcciones óseas tridimensionales mineralizadas.

B. Método de acuerdo con la declaración A, en el que dicho recipiente de cultivo cilíndrico es un recipiente con una alta proporción de aspecto (HARV) que tiene un diámetro mayor que su altura.

C. Método de acuerdo con la declaración B, en el que la velocidad media de la rotación horizontal durante la etapa (b) es menor que la velocidad media de la rotación horizontal durante la etapa (c).

35 D. Método de acuerdo con la declaración C, en el que la proporción osteoblastos:precursores de osteoclastos introducida en dicho recipiente de cultivo cilíndrico en la etapa (a) se encuentra entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 3:1.

E. Método de acuerdo con la declaración D, en el que se introducen entre aproximadamente 1 millón y aproximadamente 8 millones de osteoblastos en dicho recipiente de cultivo cilíndrico en la etapa (a).

40 F. Método de acuerdo con la declaración C, en el que dicho medio de cultivo sin matriz comprende al menos un factor de crecimiento de osteoblastos y al menos un factor de diferenciación de osteoclastos.

G. Método de acuerdo con la declaración F, en el que dicho factor de crecimiento de osteoblastos es el ácido ascórbico y en el que dicho factor de diferenciación de osteoclastos se selecciona entre el grupo que consiste en ligando del RANK y M-CSF.

45 H. Método de acuerdo con la declaración G, en el que dicho medio de cultivo sin matriz comprende ácido ascórbico, ligando del RANK y M-CSF.

I. Método de acuerdo con la declaración C, en el que dicho medio de cultivo de mineralización sin matriz comprende al menos un factor de diferenciación de osteoblastos y al menos un factor de diferenciación de osteoclastos.

50 J. Método de acuerdo con la declaración I, en el que dicho factor de diferenciación de osteoblastos se selecciona entre el grupo que consiste en β -glicerofosfato y hemisuccinato de hidrocortisona-21, y en el que dicho factor de

diferenciación de osteoclastos se selecciona entre el grupo que consiste en el ligando del RANK y el M-CSF.

K. Método de acuerdo con la declaración J, en el que dicho medio de cultivo de mineralización sin matriz comprende ácido ascórbico, ligando del RANK, M-CSF, β -glicerofosfato y hemisuccinato de hidrocortisona-21.

5 L. Método de acuerdo con la declaración C, en el que la velocidad de la rotación horizontal de dicho recipiente de cultivo cilíndrico se ajusta periódicamente durante la etapa (c), durante la etapa (d) o durante la etapa (c) y la etapa (d) para contrarrestar los cambios de la velocidad de sedimentación de dichos agregados.

M. Método de acuerdo con la declaración C, en el que se deja que ocurra la etapa (b) durante entre aproximadamente 24 horas y aproximadamente 48 horas.

10 N. Método de acuerdo con la declaración C, en el que se deja que ocurra la etapa (c) durante entre aproximadamente 5 días y aproximadamente 7 días.

O. Método de acuerdo con la declaración C, en el que se deja que ocurra la etapa (d) durante entre aproximadamente 7 días y aproximadamente 21 días.

15 P. Método de acuerdo con la declaración A, en el que dicho recipiente de cultivo cilíndrico tiene un diámetro de aproximadamente 10 cm y una altura de aproximadamente 1 cm, y en el que la velocidad media de la rotación horizontal en la etapa (b) se encuentra entre aproximadamente 2 revoluciones por minuto y aproximadamente 4 revoluciones por minuto.

20 Q. Método de acuerdo con la declaración P, en el que la velocidad media de la rotación horizontal en la etapa (c) se encuentra entre aproximadamente 9 revoluciones por minuto y aproximadamente 16 revoluciones por minuto, y en el que la velocidad media de la rotación horizontal en la etapa (d) se encuentra entre aproximadamente 9 revoluciones por minuto y aproximadamente 20 revoluciones por minuto.

R. Método de acuerdo con la declaración A, en el que dicha construcción tridimensional está entre un diámetro de aproximadamente 200 μm y de aproximadamente 4 mm.

25 S. Construcción ósea tridimensional mineralizada que comprende un esferoide de entre aproximadamente 200 μm y aproximadamente 4 mm de diámetro que tiene una capa externa que rodea un núcleo interno, en la que dicha capa externa comprende osteoclastos, en la que dicha capa interna comprende osteoblastos, osteocitos o tanto osteoblastos como osteocitos, integrados dentro de una matriz cristalina, y en la que dicha matriz cristalina comprende calcio, fosfatos y carbonatos.

T. Construcción ósea tridimensional mineralizada producida por el método que comprende:

30 (a) introducir precursores de osteoclastos y osteoblastos en un recipiente de cultivo cilíndrico que rota en torno a un eje horizontal central, comprendiendo dicho recipiente de cultivo cilíndrico un medio de cultivo sin matriz;

(b) cultivar dichos osteoblastos y dichos precursores de osteoclastos en dicho recipiente de cultivo cilíndrico durante la rotación horizontal a una velocidad eficaz para crear las condiciones de cizalla baja y para fomentar la formación de agregados que comprenden dichos precursores de osteoclastos y dichos osteoblastos;

35 (c) cultivar adicionalmente dichos agregados en dicho recipiente de cultivo cilíndrico durante la rotación horizontal a una velocidad eficaz para crear las condiciones de cizalla baja, por lo que el tamaño de dichos agregados crece y dichos precursores de osteoclastos se diferencian en osteoclastos;

(d) introducir un medio de cultivo de mineralización sin matriz en dicho recipiente de cultivo cilíndrico y cultivar dichos agregados durante la rotación horizontal a una velocidad eficaz para crear las condiciones de cizalla baja, en el que se forman dichas construcciones óseas tridimensionales mineralizadas.

40 U. Construcción ósea tridimensional mineralizada de acuerdo con la declaración T, que comprende uno o más osteocitos.

V. Construcción ósea tridimensional mineralizada de acuerdo con la declaración T, que es aproximadamente esférica.

45 W. Construcción ósea tridimensional mineralizada de acuerdo con la declaración V, que tiene un diámetro entre aproximadamente 200 μm y aproximadamente 4 mm.

X. Construcción ósea tridimensional mineralizada de la declaración V, que comprende una capa externa que rodea un núcleo interno, en la que dicha capa externa comprende dichos osteoclastos y en la que dicho núcleo interno comprende una matriz cristalina que se tiñe positivamente con tinción con rojo de alizarina S y tinción de von Kossa.

Y. Método para producir construcciones óseas tridimensionales mineralizadas, comprendiendo dicho método:

(a) introducir precursores de osteoclastos y osteoblastos en un recipiente de cultivo que comprende un medio de cultivo sin matriz;

5 (b) cultivar dichos precursores de osteoclastos y dichos osteoblastos en condiciones de vector de gravedad aleatorio en el que se forman los agregados de dichos osteoblastos y de dichos precursores de osteoclastos; y

(c) introducir un medio de cultivo de mineralización sin matriz en dicho recipiente de cultivo y cultivar dichos agregados en condiciones de vector de gravedad aleatorio, en el que se forman las construcciones óseas tridimensionales mineralizadas.

10 Z. Método de acuerdo con la declaración Y, en el que dicho recipiente de cultivo es un recipiente de cultivo cilíndrico, y en el que se consiguen las condiciones de vector de gravedad aleatorio al rotar dicho recipiente de cultivo cilíndrico en torno a un eje horizontal central.

AA. Método de acuerdo con la declaración Y, en el que la rotación de dicho recipiente de cultivo cilíndrico se ajusta periódicamente durante la etapa (c) para impedir la sedimentación de dichos agregados tridimensionales mineralizados.

15 AB. Método de acuerdo con la declaración AA, en el que la velocidad de rotación de dicho recipiente de cultivo cilíndrico es más lenta en la etapa (b) que en la etapa (c).

AC. Método para producir construcciones óseas tridimensionales mineralizadas, comprendiendo dicho método:

20 cultivar precursores de osteoclastos y osteoblastos en un medio de cultivo sin matriz mediante una técnica de cultivo de tejidos tridimensional rotacional de cizalla baja en condiciones eficaces para formar agregados que comprenden dichos osteoblastos y dichos precursores de osteoclastos, y cultivar dichos agregados mediante dicha técnica de cultivo de tejidos tridimensional rotacional de cizalla baja en un medio de cultivo de mineralización sin matriz que favorece la mineralización de dichos agregados.

AD. Método para producir construcciones óseas tridimensionales mineralizadas, comprendiendo dicho método:

25 (a) introducir precursores de osteoclastos y osteoblastos en un recipiente de cultivo cilíndrico que rota en torno a un eje horizontal central, comprendiendo dicho recipiente cilíndrico un medio de cultivo sin matriz;

(b) cultivar dichos osteoblastos y dichos precursores de osteoclastos en dicho recipiente de cultivo cilíndrico durante la rotación horizontal a una velocidad eficaz para crear las condiciones de cizalla baja y para favorecer la formación de agregados que comprenden dichos precursores de osteoclastos y dichos osteoblastos; y

30 (c) introducir un medio de cultivo de mineralización sin matriz en dicho recipiente de cultivo cilíndrico y cultivar dichos agregados durante la rotación horizontal a una velocidad eficaz para crear las condiciones de cizalla baja, en el que se forman las construcciones óseas tridimensionales mineralizadas.

AE. Método de acuerdo con la declaración AD, en el que dicho recipiente de cultivo cilíndrico es un recipiente con una alta proporción de aspecto (HARV) que tiene un diámetro mayor que su altura.

35 AF. Método de acuerdo con la declaración AD, en el que la rotación horizontal durante la etapa (b) es a una velocidad media más baja que la rotación durante la etapa (c).

AG. Método de acuerdo con la declaración AD, en el que la proporción de osteoblastos:precursores de osteoclastos introducida en dicho recipiente de cultivo cilíndrico en la etapa (a) es de aproximadamente 2:1.

AH. Método de acuerdo con la declaración AD, en el que se introducen entre aproximadamente 1 millón y aproximadamente 8 millones de osteoblastos en dicho recipiente de cultivo cilíndrico en la etapa (a).

40 AI. Método de acuerdo con la declaración AD, que comprende además entre (b) y (c):

(b)(l) cultivar adicionalmente dichos agregados en dicho recipiente de cultivo cilíndrico durante la rotación horizontal a una velocidad eficaz para crear condiciones de cizalla baja.

AJ. Método de acuerdo con la declaración AI, en el que la velocidad media de la rotación horizontal en la etapa (b) es menor que en la etapa (b)(l) y en la etapa (c).

45 AK. Método de acuerdo con la declaración AJ, en el que se deja que ocurra la etapa (b) durante entre aproximadamente 24 horas y aproximadamente 48 horas.

AL. Método de acuerdo con la declaración AJ, en el que se deja que ocurra la etapa (b)(I) durante entre aproximadamente 5 días y aproximadamente 7 días.

AM. Método de acuerdo con la declaración AJ, en el que se deja transcurrir la etapa (c) durante entre aproximadamente 14 días y aproximadamente 21 días.

5 AN. Método de acuerdo con la declaración AD, en el que dicho recipiente de cultivo cilíndrico tiene un diámetro de aproximadamente 10 cm y una altura de aproximadamente 1 cm, y en el que la velocidad media de la rotación horizontal en la etapa (b) se encuentra entre aproximadamente 2 revoluciones por minuto y aproximadamente 4 revoluciones por minuto.

10 AO. Método de acuerdo con la declaración AN, en el que la velocidad media de la rotación horizontal en la etapa (b)(i) se encuentra entre aproximadamente 9 revoluciones por minuto y aproximadamente 16 revoluciones por minuto, y en el que la velocidad media de la rotación horizontal en la etapa (c) se encuentra entre aproximadamente 9 revoluciones por minuto y aproximadamente 20 revoluciones por minuto.

REIVINDICACIONES

1. Método para producir contrucciones óseas tridimensionales mineralizadas, comprendiendo dicho método:
- 5 cultivar precursores de osteoclastos y osteoblastos en un medio de cultivo sin matriz mediante una técnica de cultivo de tejidos tridimensional rotacional de cizalla baja en condiciones eficaces para formar agregados que comprenden dichos osteoblastos y dichos precursores de osteoclastos, y cultivar dichos agregados mediante dicha técnica de cultivo de tejidos tridimensional rotacional de cizalla baja en un medio de cultivo de mineralización sin matriz que favorece la mineralización de dichos agregados.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende las etapas de:
- 10 (a) introducir precursores de osteoclastos y osteoblastos en un recipiente de cultivo cilíndrico que rota en torno a un eje horizontal central, comprendiendo dicho recipiente de cultivo cilíndrico un medio de cultivo sin matriz;
- (b) cultivar dichos osteoblastos y dichos precursores de osteoclastos en dicho recipiente de cultivo cilíndrico durante la rotación horizontal a una velocidad eficaz para crear condiciones de cizalla baja y para favorecer la formación de agregados que comprenden dichos precursores de osteoclastos y dichos osteoblastos;
- 15 (c) cultivar adicionalmente dichos agregados en dicho recipiente de cultivo cilíndrico durante la rotación horizontal a una velocidad eficaz para crear condiciones de cizalla baja, por lo que crece el tamaño de dichos agregados y dichos precursores de osteoclastos se diferencian en osteoclastos;
- (d) introducir un medio de cultivo de mineralización sin matriz en dicho recipiente de cultivo cilíndrico y cultivar dichos agregados durante la rotación horizontal a una velocidad eficaz para crear condiciones de cizalla baja, en el que se forman dichas construcciones óseas tridimensionales mineralizadas.
- 20 3. Método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
- (a) introducir los precursores de osteoclastos y los osteoblastos en un recipiente de cultivo que comprende un medio de cultivo sin matriz;
- (b) cultivar dichos precursores de osteoclastos y dichos osteoblastos en condiciones de vector de gravedad aleatorio, en el que se forman los agregados de dichos osteoblastos y dichos precursores de osteoclastos; y
- 25 (c) introducir un medio de cultivo de mineralización sin matriz en dicho recipiente de cultivo y cultivar dichos agregados en condiciones de vector de gravedad aleatorio, en el que se forman las construcciones óseas tridimensionales mineralizadas.
4. Método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
- 30 (a) introducir los precursores de osteoclastos y los osteoblastos en un recipiente de cultivo cilíndrico que rota en torno a un eje horizontal central, comprendiendo dicho recipiente de cultivo cilíndrico un medio de cultivo sin matriz;
- (b) cultivar dichos osteoblastos y dichos precursores de osteoclastos en dicho recipiente de cultivo cilíndrico durante la rotación horizontal a una velocidad eficaz para crear condiciones de cizalla baja y para favorecer la formación de agregados que comprenden dichos precursores de osteoclastos y dichos osteoblastos; y
- 35 (c) introducir un medio de cultivo de mineralización sin matriz en dicho recipiente de cultivo cilíndrico y cultivar dichos agregados durante la rotación horizontal a una velocidad eficaz para crear condiciones de cizalla baja, en el que se forman dichas construcciones óseas tridimensionales mineralizadas.
5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, que además comprende entre (b) y (c):
- (b)(1) cultivar además dichos agregados en dicho recipiente de cultivo cilíndrico durante la rotación horizontal a una velocidad eficaz para crear condiciones de cizalla baja.
- 40 6. Método de acuerdo con la reivindicación 2 o 4, en el que dicho recipiente de cultivo cilíndrico es un recipiente con una alta proporción de aspecto (HARV) que tiene un diámetro mayor que su altura.
7. Método de acuerdo con la reivindicación 2 o 4, en el que la rotación horizontal durante la etapa (b) es a una velocidad media más baja que la rotación durante la etapa (c).
- 45 8. Método de acuerdo con la reivindicación 2 o 4, en el que la proporción de osteoblastos:precursores de osteoclastos introducida en dicho recipiente de cultivo cilíndrico en la etapa (a) es de 2:1 a 3.1.

9. Método de acuerdo con la reivindicación 2 o 4, en el que se introducen entre 1 millón y 8 millones de osteoblastos en dicho recipiente de cultivo cilíndrico en la etapa (a).
10. Método de acuerdo con la reivindicación 2 o 4, en el que se deja que ocurra la etapa (b) durante entre 24 horas y 48 horas.
- 5 11. Método de acuerdo con la reivindicación 2 o 4, en el que dicho medio de cultivo sin matriz comprende al menos un factor de crecimiento de osteoblastos y al menos un factor de diferenciación de osteoclastos, en el que el factor de crecimiento es ácido ascórbico y en el que dicho factor de diferenciación de osteoclastos se selecciona entre el grupo que consiste en el ligando del RANK y M-CSF.
- 10 12. Método de acuerdo con la reivindicación 2 o 5, en el que dicho recipiente de cultivo cilíndrico tiene un diámetro de 10 cm y una altura de 1 cm, y en el que la velocidad media de la rotación horizontal en la etapa (b) está entre 2 revoluciones por minuto y 4 revoluciones por minuto.
13. Método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la velocidad media de la rotación horizontal en la etapa (c) está entre 9 revoluciones por minuto y 16 revoluciones por minuto, y en el que la velocidad media de la rotación horizontal en la etapa (b)(1) o (d) está entre 9 revoluciones por minuto y 20 revoluciones por minuto.
- 15 14. Construcción ósea tridimensional mineralizada producida por el método que comprende:
- (a) introducir precursores de osteoclastos y osteoblastos en un recipiente de cultivo cilíndrico que rota en torno a un eje horizontal central, comprendiendo dicho recipiente de cultivo cilíndrico un medio de cultivo sin matriz;
- (b) cultivar dichos osteoblastos y dichos precursores de osteoclastos en dicho recipiente de cultivo cilíndrico durante la rotación horizontal a una velocidad eficaz para crear condiciones de cizalla baja y para favorecer la formación de agregados que comprenden dichos precursores de osteoclastos y dichos osteoblastos;
- 20 (c) cultivar además dichos agregados en dicho recipiente de cultivo cilíndrico durante la rotación horizontal a una velocidad eficaz para crear condiciones de cizalla baja, por lo que crece el tamaño de dichos agregados y dichos precursores de osteoclastos se diferencian en osteoclastos;
- 25 (d) introducir un medio de cultivo de mineralización sin matriz en dicho recipiente de cultivo cilíndrico y cultivar dichos agregados durante la rotación horizontal a una velocidad eficaz para crear condiciones de cizalla baja, en el que se forman dichas construcciones óseas tridimensionales mineralizadas.

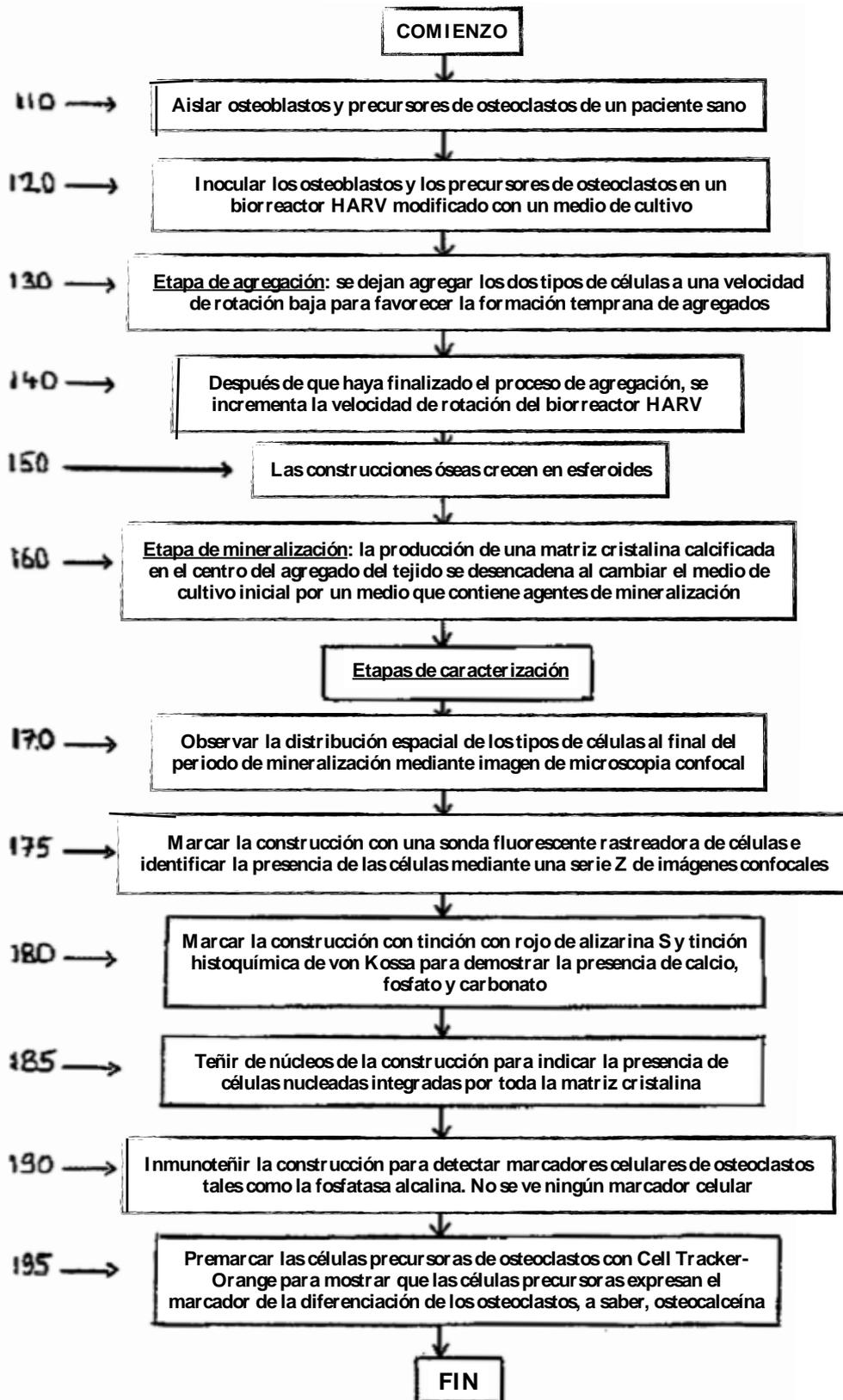


FIGURA 1

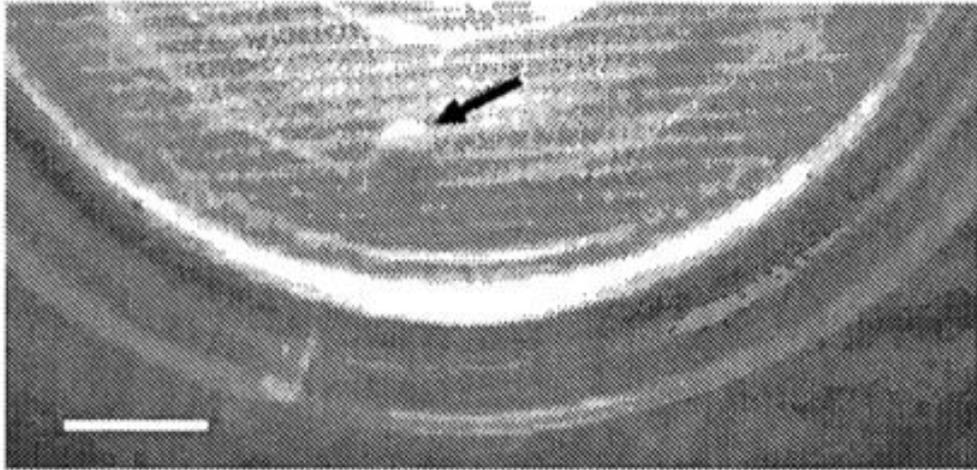


FIGURA 2A

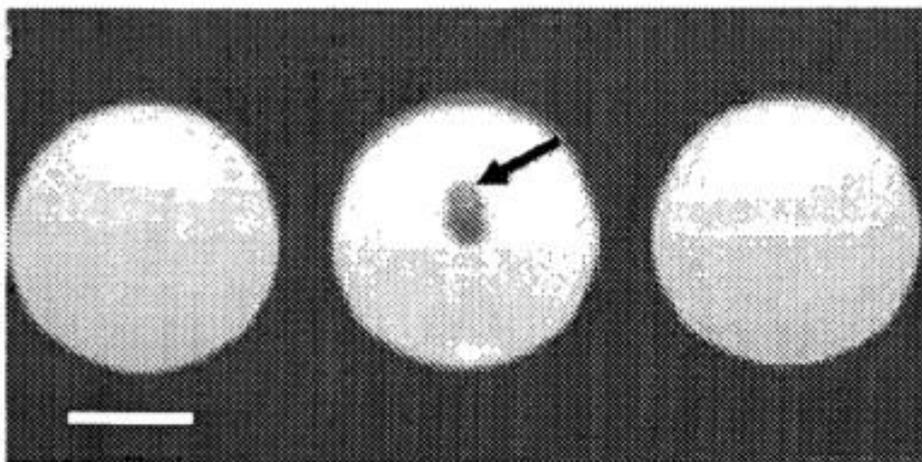


FIGURA 2B

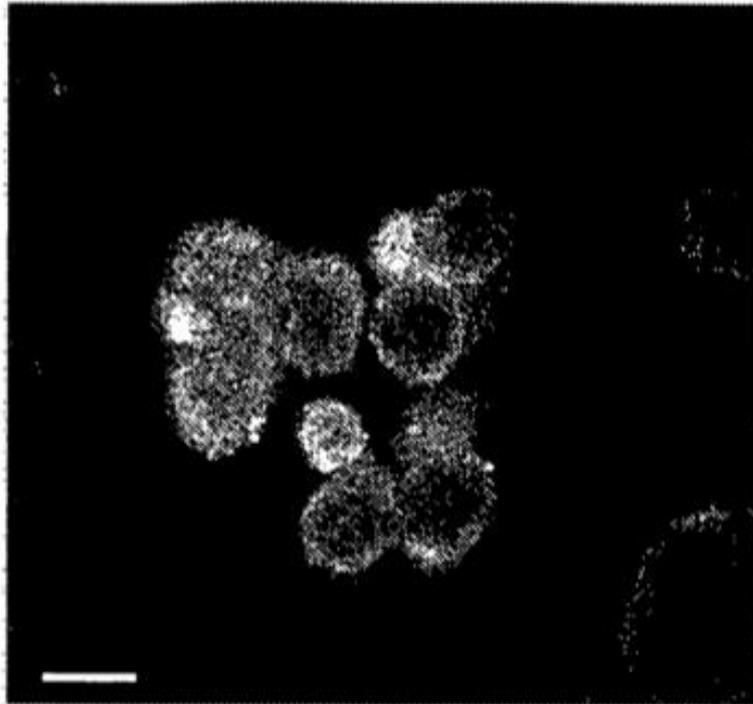


FIGURA 3A

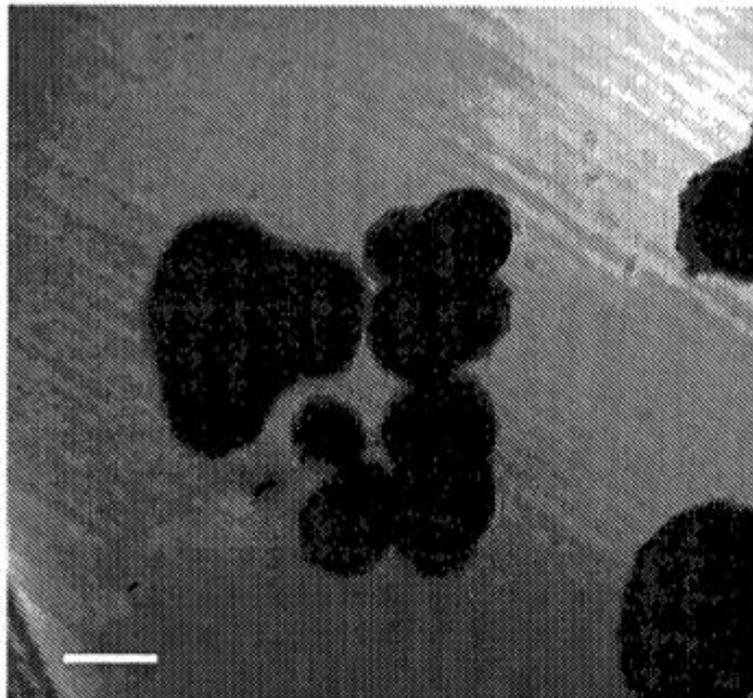


FIGURA 3B

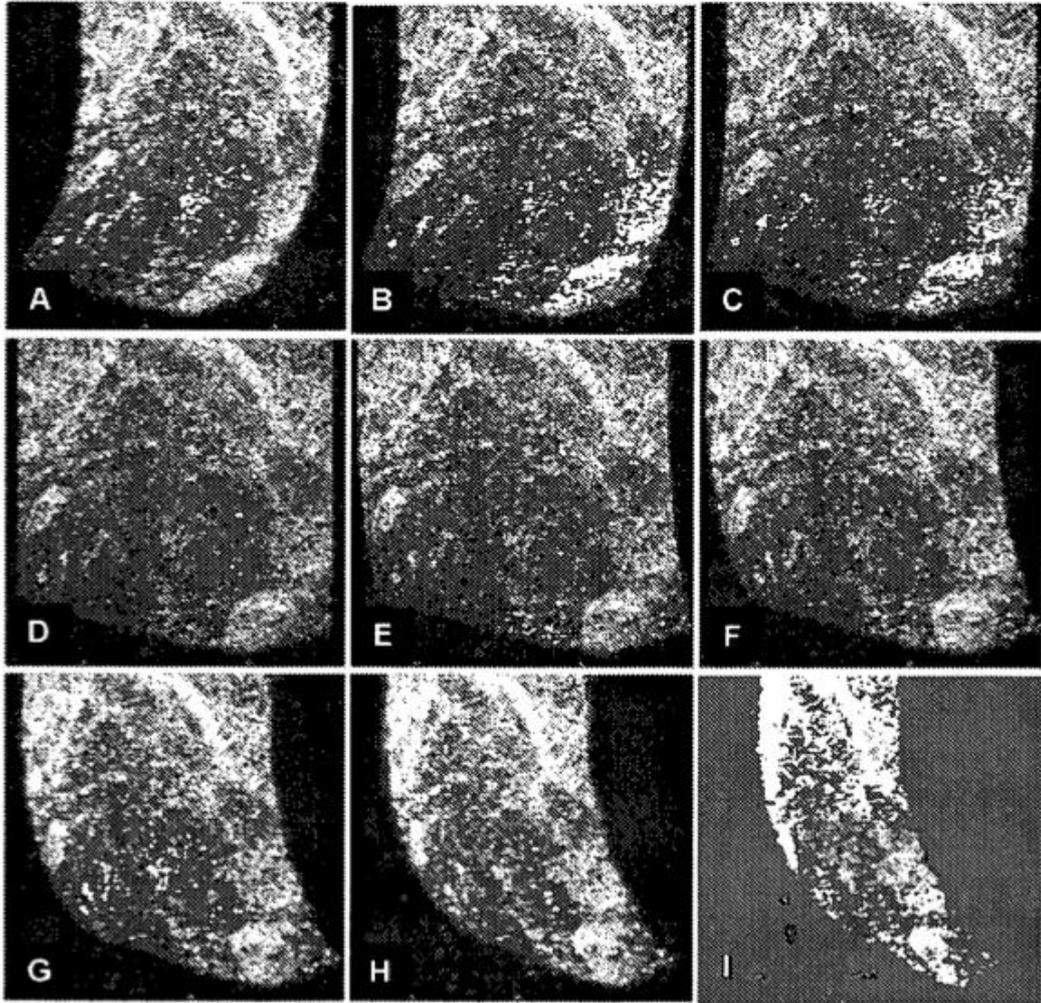


FIGURA 4

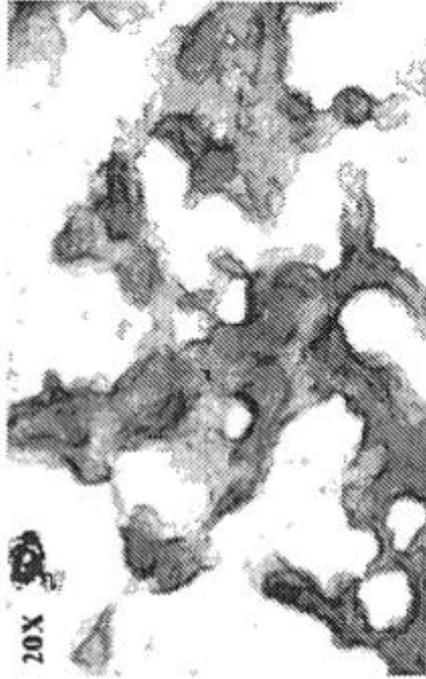


FIGURA 5B

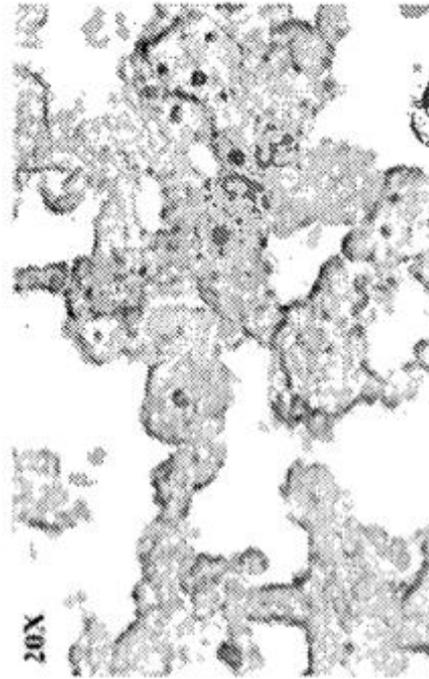


FIGURA 5D

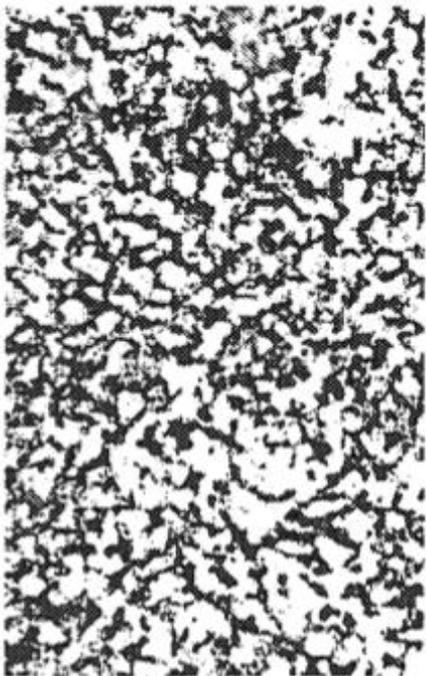


FIGURA 5A

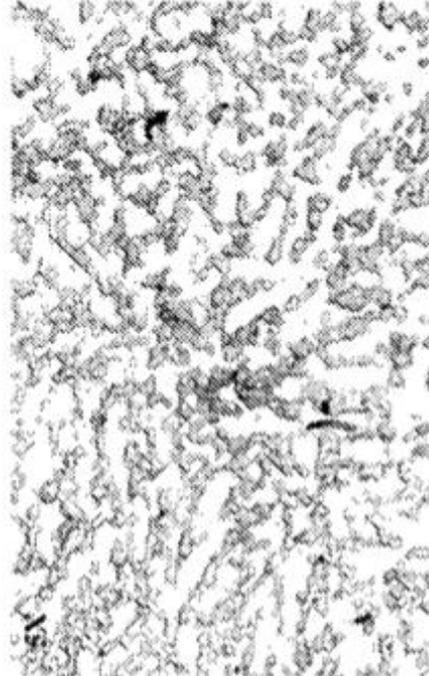


FIGURA 5C

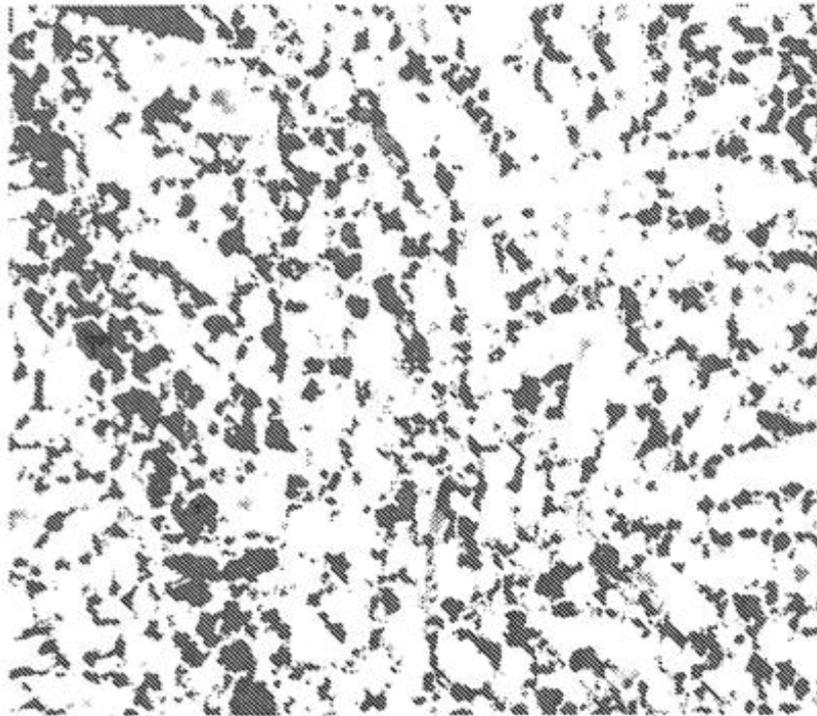


FIGURA 6A

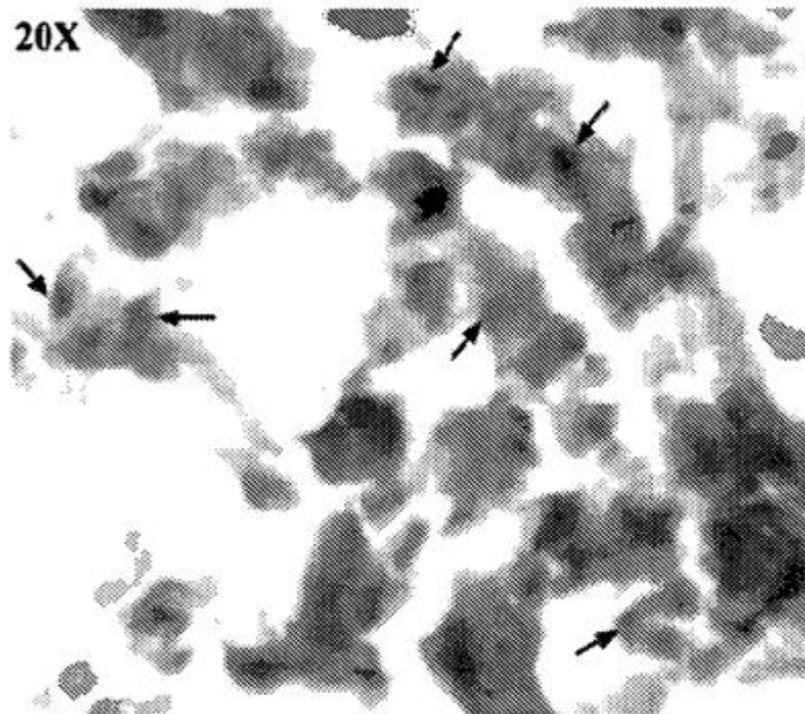


FIGURA 6B

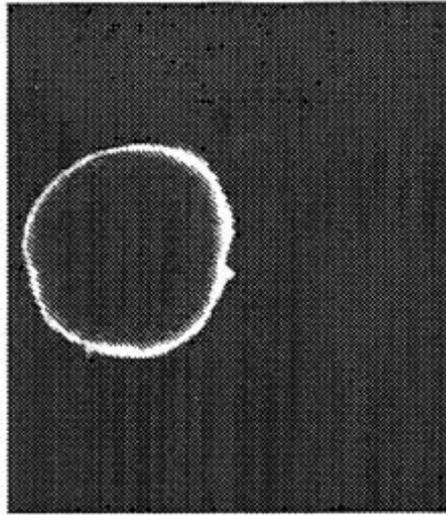


FIGURA 7A

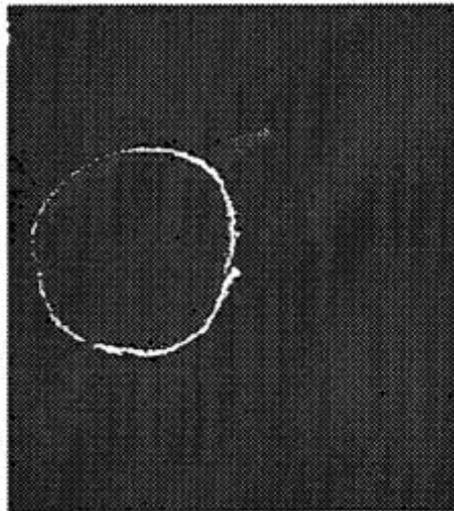


FIGURA 7B

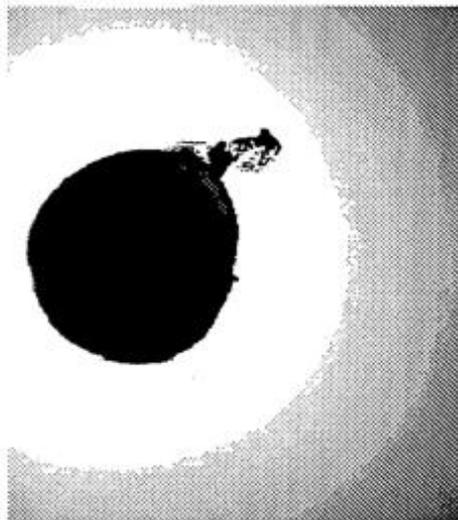


FIGURA 7C