

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 753**

51 Int. Cl.:
A61L 27/42 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05021000 .4**
96 Fecha de presentación: **29.03.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1621218**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2006**

54 Título: **Material para injerto oseo autologo**

30 Prioridad:
29.03.2002 US 109946

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.06.2012

73 Titular/es:
DEPUY SPINE, INC.
325 PARAMOUNT DRIVE
RAYNHAM, MA 02767-0350, US

72 Inventor/es:
Kadiyala, Sudhakar y
Bruder, Scott P.

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 383 753 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).

DESCRIPCION

Material para injerto óseo autólogo

Antecedentes de la invención

5 La médula ósea ha sido considerada como una fuente de componentes musculoesquelotogénicos ("MSG") para la producción de materiales para injerto autólogos útiles en la reparación/regeneración de tejidos musculoesqueléticos tales como hueso, cartílago y tendón. El aspirado de médula ósea ("BMA") se obtiene típicamente a partir del paciente durante cirugía mediante técnicas bien conocidas e incluye los componentes siguientes establecidos en la Tabla I a continuación:

Tabla I

Componente BMA	Fracción en volumen
Plasma	40-45% en volumen
Fracción de recubrimiento de linfa cuajada (BCF)	1-10% en volumen
Glóbulos rojos	45-50% en volumen

10

La BCF comprende la totalidad de las células de médula ósea nucleadas ("NBMC"), plaquetas, proteínas y moléculas contenidas dentro de la banda de densidad de materiales que residen entre el suero y las porciones de glóbulos rojos del BMA, determinado mediante centrifugación convencional del BMA entero. El componente NBMC de la BCF comprende típicamente el resumen siguiente de tipos de células y las concentraciones aproximadas establecidas en la Tabla II:

15

Tabla II

Tipo NBMC	Concentración nativa relativa (aproximada), (células/células NBMC totales)	Concentración nativa absoluta (aproximada), (células/ml de BMA)
Células precursoras musculoesqueléticas (MSPCs)	<1%	<200.000
Células hematopoyéticas nucleadas (HCs)	95-99%	20x10 ⁶
Reticulocitos (RCs)	<0,1%	<20.000
Células endoteliales (ECs)	<0,1%	<20.000

20

25

En un primer procedimiento convencional que usa médula ósea para determinar su capacidad osteogénica, la médula ósea entera o "fresca" se usa o bien directamente como un material de injerto o bien se combina con un material matriz para producir un material compuesto para injerto óseo. Por ejemplo, Harada, en Bone, vol. 9, págs. 177-183, (1988), divulga un material compuesto que comprende BMA entera dentro de una matriz porosa de matriz ósea desmineralizada (DBM) contenida dentro de una cámara de difusión. Sin embargo, la cámara de difusión tiene una membrana semipermeable que permite el paso de nutrientes y, de esta forma, previene el influjo de componentes celulares y de vasculatura críticos para la osteogénesis. Más aún, puesto que el éxito de este procedimiento depende de en parte de las proporciones nativas de las MSPCs en la médula ósea, y dichas proporciones nativas de las MSPCs en la médula ósea del paciente puede a veces estar reducida, la utilidad general de este procedimiento está limitada. Más aún, incluso a proporciones nativas relativamente normales de las MSPCs, estas células son relativamente escasas en la médula ósea fresca y, por ello, el potencial osteogénico de la médula ósea entera *per se* es, en consecuencia, limitado.

30

35

En un segundo procedimiento convencional, el plasma se elimina de la médula ósea entera, y la mezcla remanente que comprende la BCF y los glóbulos rojos se usa o bien directamente como un material para injerto o bien se combina con un material matriz para producir un material compuesto para injerto óseo. Por ejemplo, Ohgushi, J. Biomed. Mat. Res., vol. 24, págs. 1563-70, (1990) divulga la centrifugación de BMA, y el uso de la fracción glóbulo rojo/BCF remanente como un fluido intersticial dentro de una matriz porosa de HA o TCP. Puesto que el plasma comprende aproximadamente el 45 por ciento en volumen ("% en volumen") de aspirado de médula ósea, este procedimiento produce únicamente proporciones ligeramente elevadas de las MSPCs (es decir, menos de un incremento del doble) con relación a la proporción nativa de las MSPCs en la médula ósea fresca. Además, la suspensión carece esencialmente de los factores solubles o insolubles que se encuentran en el plasma, tal como albúmina. Por último, la

presencia de glóbulos rojos ("RBCs") en esta composición puede igualmente causar la inhibición de la actividad de la MSPC a través de impedimento estérico de accesibilidad a la superficie y de altas concentraciones de hierro locales después de la lisis de RBC.

5 En un tercer procedimiento convencional, el recubrimiento de linfa cuajada del BMA se aísla a partir del plasma y las fracciones de glóbulos rojos. Por ejemplo, Connolly y otros, J.BJS, págs. 684-691, (1989), pensaron "optimizar" el potencial osteogénico del BMA, y divulgaron el aislamiento de fracciones del BMA y, a continuación, el uso de dichas fracciones como material para injerto en cámaras de difusión. Connolly usó los procedimientos de aislamiento siguientes:

- a) centrifugación simple seguida de eliminación de la fracción sobrenadante (es decir, suero),
- 10 b) centrifugación isopícnica seguido de eliminación separada de las fracciones de células claras (recubrimiento de linfa cuajada) y glóbulos rojos, y
- c) equipo de centrifugación por gravedad, seguido de eliminación separada de las fracciones de células claras (recubrimiento de linfa cuajada) y glóbulos rojos.

15 Aunque Connolly informó que la fracción de célula clara (recubrimiento de linfa cuajada) concentrada producida mediante centrifugación isopícnica proporcionó la mayor proporción de la producción de calcio dentro de la cámara de difusión, Connolly eligió la fracción de glóbulos rojos/célula clara producida mediante centrifugación simple (es decir, fracciones de célula clara y glóbulos rojos) para estudio adicional. Más aún, Connolly no proporcionó un material soporte de sustrato poroso dentro de la cámara de difusión. Por último, los ejemplos de Connolly que usaron la BCF eliminaron igualmente los factores presentes en la fracción de plasma del BMA.

20 En un cuarto procedimiento convencional, el recubrimiento de linfa cuajada aislado se fraccionó posteriormente. Por ejemplo, Budenz y otros, Am. J. Anat., vol. 159, págs. 455-474, (1980), divulgan el aislamiento de fracciones de la BCF del aspirado de médula ósea en altas concentraciones, y la inserción de dicha fracción concentrada dentro de un depósito de difusión el cual, a continuación, se implantó en ratas. Las limitaciones asociadas con las cámaras de difusión han sido expuestas anteriormente. Budenz no divulga el uso de la fracción BCF entera *in toto*. Por último, Budenz no divulga un material soporte de sustrato poroso dentro de la cámara de difusión.

25 En un quinto procedimiento convencional, se combinó una fracción enriquecida de las MSPCs (con relación a todas las otras NMBCs) con un material matriz para producir un injerto óseo. Las MSPCs pueden enriquecerse mediante una diversidad de procedimientos bien conocidos. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. No. 6.049.026 ("Muschler '026") divulga el paso del aspirado de médula ósea a través de una matriz capaz de retener selectivamente las MSPCs. Este procedimiento produce un material compuesto que tiene cantidades enriquecidas de las MSPCs (es decir, hasta 2-8 veces mayor que la proporción de MSPC nativa encontrada en el mismo volumen de médula ósea autóloga). Sin embargo, este material compuesto está libre también de las células, moléculas y proteínas presentes en el BMA que no son retenidas por el sustrato, y está reducido de otros constituyentes encontrados en el BMA, los cuales no tienen una alta afinidad por el sustrato. Además, el procedimiento divulgado por Muschler '026 para el enriquecimiento de las MSPCs es ineficaz, dejando de capturar de manera rutinaria entre aproximadamente el 33% y el 56% de las MSPCs presentes en el BMA. Más aún, Muschler divulga el lavado opcional del sustrato cargado de MSPC con el fin de eliminar todas las células que han sido únicamente pobremente retenidas, reduciendo, de esta forma, incluso la posterior presencia de células que no tienen una alta afinidad por el sustrato. Muschler divulga la adición opcionalmente al material compuesto de diversos constituyentes bioactivos discretos tales como plaquetas, moléculas de adhesión de células (tales como colágenos), factores de crecimiento (tales como BMPs), anticuerpos (tal como STRO-1).

30 Algunos investigadores han divulgado el cultivo *in vitro* del BMA entero o fraccionado en un esfuerzo para obtener una población plena y pura de las MSPCs. Por ejemplo, Majors, J. Orthop. Res., vol. 15, págs. 546-557, (1997), divulgaron el aislamiento de la BCF del BMA mediante centrifugación, cultivo de la BCF para producir una población de MSPC enriquecida, y teñido de las MSPCs como un medio para ensayar la población progenitora osteoblástica dentro del BMA.

35 La Solicitud de Patente Publicada PCT No. 97/40137 ("Kadiyala") divulga composiciones y procedimientos para el aumento de la formación ósea mediante la administración de células madre mesenquimales humanas aisladas con un material cerámico o matriz o mediante la administración de células madre mesenquimales humanas; médula entera, fresca, o combinaciones de la misma en un biopolímero reabsorbible que soporta su diferenciación dentro de su linaje osteogénico. Kadiyala contempla el suministro de (i) células madre mesenquimales humanas expandidas de cultivo, aisladas; (ii) médula ósea recientemente aspirada; o (iii) su combinación en un material soporte o matriz para proporcionar un área de fusión y una masa de fusión ósea mejoradas, cuando se compara con la matriz sola. En el Ejemplo V, se divulga una composición que comprende colágeno/material compuesto cerámico mezclado al 50:50 con células nucleadas de médula ósea fresca que ha sido concentrada diez veces por centrifugación y aislamiento del recubrimiento de linfa cuajada (BMC). El procedimiento requerido para la producción de las MSPCs purificadas, expandidas mediante cultivo, es un procedimiento largo y arduo (que frecuentemente requiere aproximadamente 21 a 56 días) y, por ello, no puede llevarse a cabo intra-operativamente. La Patente de EE.UU. No.

5.914.121 ("Robey") divulga una composición que comprende MSPCs cultivadas y polvo de HA/TCP, y opcionalmente la adición de trombina y fibrinógeno comercialmente preparado a la composición con el objeto de obtener pegamento de fibrina.

5 Unos pocos investigadores han informado sobre matrices porosas de suplemento que contienen fracciones de MSG concentrados con BMA entero. Por ejemplo, Walsh, en "Autologous Growth Factor Gel (AGF) And Spinal Fusion", 47th Annual Meeting, ORS, (Febrero 2001), divulga un material para injerto que comprende una matriz porosa HAP, PRP y BMA entero. Sin embargo, Walsh no divulga una fracción fisiológica, concentrada, de aspirado de médula ósea BMA fraccionada, únicamente BMA entero.

10 Matsukura, en "Concentration of Bone Marrow Derived Osteoprogenitors for Spinal Fusion", Am. Soc. Bone. Min. Res. 22nd Annual Meeting Abstracts, (Septiembre 2000), divulga un material para injerto que comprende una fracción enriquecida de MSPCs, médula ósea entera y una matriz porosa. Matsukura no divulga una fracción fisiológica, concentrada, de aspirado de médula ósea BMA fraccionada. La fracción enriquecida de las MSPCs expuesta en Matsukura no es una suspensión y, en consecuencia, está reducida en cuanto de los constituyentes solubles presentes en la fracción fisiológica correspondiente de BMA que tiene altas proporciones de MSPCs.

15 El Documento WO-A-02/068010 titulado "Composite Bone Marrow Graft Material with Method and Kit" ("Muschler II") divulga un material para injerto de médula ósea de material compuesto que comprende una matriz implantable biocompatible porosa, una población enriquecida de células progenitoras (MSCPs) y un material de coagulo. El material de coagulo puede ser un coagulo de sangre formado a partir de sangre, un coagulo de médula ósea, un gel de plaqueta, un concentrado de plaqueta, cóagulo de fibrina o un pegamento de fibrina. Puesto que la población enriquecida de las MSPCs está formada mediante el procedimiento expuesto en Muschler I y, en consecuencia (al igual que Matsukura) está reducida con respecto de los constituyentes solubles presentes en la fracción fisiológica correspondiente de BMA que tiene altas proporciones de MSPCs, Muschler II no divulga una fracción fisiológica, concentrada, de aspirado de médula ósea (BMA) fraccionada.

En suma, las tecnologías convencionales o bien:

25 a) usan médula entera como una fuente de MSPCs y, en consecuencia, conllevan bajas concentraciones de MSPC (tal como Walsh),

b) buscan enriquecer las MSPCs mediante la eliminación de otros constituyentes de MSG que se encuentran en el BMA y, por tanto, no tienen algunos de los constituyentes MSG suplementarios presentes en el BMA (tal como Muschler I),

30 c) introducen constituyentes de MSG suplementarios aislados dentro de materiales compuestos que tienen proporciones enriquecidas de MSPCs y, en consecuencia, tienen únicamente parcialmente suministrados los constituyentes de MSG suplementarios presentes en el BMA (tal como Muschler I), o bien

35 d) agregan solamente el BMA entero dentro de materiales compuestos que tienen proporciones enriquecidas de MSPCs y, en consecuencia, tienen únicamente proporciones no incrementadas de los constituyentes de MSG suplementarios (tal como Muschler II y Matsakura).

Además, existe únicamente una apreciación esporádica en la técnica anterior de las ventajas de combinar fracciones de MSG con una matriz porosa. Por ejemplo, no existe divulgación en la técnica anterior de una combinación de una fracción fisiológica de BMA en combinación con una matriz y suplementada con BMA entero.

Sumario de la invención

40 Los autores de la presente invención estiman que los materiales para injerto para reparación de tejidos a base de materiales compuestos que tienen capacidades musculoesquelotégicas mejoradas, deberían comprender no solo proporciones de MSPC incrementadas, sino también proporciones adecuadas de otros constituyentes MSG que se encuentran en el BMA, los cuales se piensa que juegan un papel en la vía de reparación de tejidos. Sin embargo, los autores de la presente invención han notado que los procedimientos convencionales de concentración de las MSPCs reducen o eliminan completamente muchos de los constituyentes musculoesqueletogénicos MSG en el BMA, los cuales se estima que juegan un papel significativo en la musculoesquelotegénesis. Por ello, los autores de la presente invención han concluido que, aunque la etapa convencional de concentración de las MSPCs procedentes del BMA puede potenciar en un aspecto la osteogénesis (mediante la potenciación de de las proporciones de MSPC), ello puede igualmente limitar en un segundo aspecto la reparación del tejido (reduciendo, y a veces completa eliminando, los constituyentes MSG de soporte importantes procedentes del BMA). De acuerdo con ello, los productos con alta proporción de MSPC convencionales resultantes poseen desventajas significativas.

En consecuencia, con el fin de resolver esta insuficiencia en materiales para injertos óseos convencionales, la presente invención implica el mezclado de dos fracciones concentradas de BMA con el fin de hacer frente a las deficiencias de la técnica anterior.

La invención proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico tal como se define en la reivindicación 1.

De acuerdo con la invención, la primera fracción posee proporciones incrementadas de las MSPCs, tiene proporciones mayores de este constituyente crítico que los materiales compuestos que usan únicamente el BMA entero como una fuente de MSPC (tal como Harada y Walsh). Dado que el injerto de la invención incluye una segunda fracción del BMA, este posee incluso más constituyentes MSG que el material compuesto únicamente concentrado de Ohgushi. Dado que el segundo componente de esta vía es una fracción del BMA, este injerto puede contener proporciones incrementadas de los constituyentes de soporte. Dichas proporciones incrementadas serían mayores que las que se encuentran en otros injertos ricos en MSPC convencionales que proporcionan suplementación usando únicamente el BMA entero (tal como Matsukara y Muschler II).

Aunque Muschler I y Robey exponen el suplementado de los componentes MSPC concentrados con constituyentes seleccionados eliminados durante el procedimiento de concentración de MSPC, cada una de estas referencias parece proporcionar únicamente una reintroducción de un fragmento de los constituyentes del BMA (es decir, la reintroducción de únicamente ciertos constituyentes individuales seleccionados, tales como factores de crecimiento o fibrinógeno, dentro de la composición de MSPC concentrada). Debido a esta vía de fragmentos, el material compuesto puede carecer todavía de cantidades eficaces de otros constituyentes también presentes dentro del BMA, los cuales pueden jugar también papeles importantes en la reparación de tejidos.

Este material compuesto puede hacerse fácilmente simplemente mediante la producción de una fracción rica en MSPC a partir del BMA entero (por ejemplo, mediante la producción del producto rico en MSPC de Muschler I) y, a continuación, poniendo en contacto dicho producto con una fracción fisiológica del BMA (producida, por ejemplo, mediante la centrifugación de la fracción eluída de la primera etapa para obtener PRP).

Dado que la fuente de MSPC de esta vía es una fracción del BMA, esta puede contener proporciones mayores de MSPC de las que están presentes en injertos convencionales (tal como Harada y Walsh), usando el BMA entero como una fuente de MSPC. Puesto que la fracción tiene una proporción reducida de RBCs, sus MSPCs pueden ser menos concentradas que las MSPCs en el material compuesto de Ohgushi. Puesto que la fracción del BMA de este material compuesto es una fracción fisiológica, esta contiene proporciones incrementadas de la adaptación nativa de células y otros factores solubles que probablemente juegan un papel en la musculoesqueletogénesis y, por ello, contienen proporciones mayores de constituyentes de soporte que las encontradas en materiales compuesto que poseen esencialmente MSPCs aisladas suplementadas únicamente mediante el BMA entero (tal como Muschler y Matsukura). De acuerdo con ello, este injerto resuelve las deficiencias anteriormente indicadas de la técnica anterior.

Además, este material compuesto puede hacerse fácilmente simplemente concentrando las MSPCs a partir del BMA entero (por ejemplo, mediante la retención de únicamente el recubrimiento de linfa cuajada procedente del BMA centrifugado) y, a continuación, poniendo en contacto la fracción fisiológica rica en MSPC retenida con la matriz porosa.

Para los fines de la presente invención, una "fracción fisiológica de aspirado de médula ósea BMA" es cualquier fracción de BMA obtenible mediante centrifugación de BMA entero, en la que la fracción no es tratada posteriormente para separar los diversos constituyentes presentes en dicha fracción. A modo de ilustración, una fracción fisiológica de este tipo de aspirado de médula ósea BMA es la porción de recubrimiento de linfa cuajada. Aunque las realizaciones preferidas usan la centrifugación como el medio para la obtención de la "fracción fisiológica de aspirado de médula ósea BMA", otros procedimientos que permiten el aislamiento de una fracción fisiológica de aspirado de médula ósea BMA obtenible mediante centrifugación se contemplan igualmente como incluidos dentro del ámbito de la presente invención. Por ejemplo, la lisis de glóbulos rojos produce una "fracción fisiológica de aspirado de médula ósea BMA" que comprende las NBMCs y, en consecuencia, es equivalente celularmente a la fracción de recubrimiento de linfa cuajada. Una "fracción fisiológica de aspirado de médula ósea BMA" no incluye el aspirado de médula ósea entero, pero incluye BMA sin agua. Las concentraciones del constituyente MSG en una "fracción fisiológica de aspirado de médula ósea" son mayores que las que se encuentran en el BMA entero (es decir, están concentradas). De acuerdo con la presente invención, una "fracción fisiológica de aspirado de médula ósea" tiene una multitud de constituyentes MSG presentes en cantidades relativas, las cuales son iguales a las cantidades relativas que se encuentran en cualquier segmento continuo de BMA centrifugado. Tiene la adaptación nativa de los constituyentes MSG contenidos dentro de una banda de densidad dada del BMA centrifugado. Puesto que la adaptación nativa se mantiene, la "fracción fisiológica de aspirado de médula ósea BMA" contiene no uno sino muchos constituyentes que se estima que son provechosos en los MSG, y en proporciones relativas esencialmente iguales a las obtenibles mediante centrifugación. A modo de ilustración, cuando la "fracción fisiológica de aspirado de médula ósea BMA" es la porción de recubrimiento de linfa cuajada del BMA, esta contiene todos los diversos constituyentes presentes en la Tabla II, y estos constituyentes tienen las concentraciones relativas tipificadas tal como se muestran en la Tabla II. Para los fines de la presente invención, el agua no se considera que sea un constituyente del BMA y, en consecuencia, la eliminación de únicamente el agua procedente de una "fracción fisiológica, concentrada, de aspirado de médula ósea BMA", no cambia la naturaleza de dicha fracción como una "fracción fisiológica de aspirado de médula ósea BMA".

Descripción detallada de la invención

5 Para los fines de la presente invención, médula ósea “fresca” es médula ósea que está sin fraccionar, o “entera”. Un “tamaño de poro promedio D_{50} ” se determina mediante porosimetría por mercurio. Las “células de médula ósea nucleadas” (“NBMCs”) incluyen MSPCs, células hematopoyéticas nucleadas (HCs), pre-osteoblastos (POs), reticulocitos (Rcs), y células endoteliales (ECs), pero no incluyen glóbulos rojos o plaquetas. Las etapas de “concentración” y “aislamiento” se refieren a aquellos procedimientos que incrementan la concentración de un constituyente en un volumen mediante la eliminación de o bien agua o bien otros constituyentes no seleccionados. Por ejemplo, las MSPCs pueden concentrarse eliminando la porción de plasma de un aspirado de médula ósea centrifugada. Una “proporción” de un constituyente es su concentración en términos de mg/ml o células/ml.

10 Para los fines de la presente invención, una “proporción reducida” de un constituyente significa que el constituyente está presente en una proporción que es menor que su proporción nativa correspondiente en el BMA autólogo. Una composición que tiene una proporción reducida de un constituyente incluye realizaciones en las cuales el constituyente está totalmente ausente.

15 Para los fines de la presente invención, una población “incrementada” de MSPCs es una que tiene una proporción mayor de MSPCs que la que se encuentra en el aspirado de médula ósea autólogo original procedente de dicho individuo. Es decir, una población incrementada de MSPCs se satisface mediante la condición:

$$\frac{[\text{MSPC}]_{\text{inc}}}{[\text{MSPC}]_{\text{asp}}} > 1 \quad (1).$$

20 Para los fines de la presente invención, una población “enriquecida” de MSPCs significa que la proporción de las MSPCs comparada con las Hcs es mayor en el material compuesto para injerto de médula ósea que en el aspirado de médula ósea autólogo original. Es decir, una población enriquecida de MSPCs se satisface mediante la condición:

$$\frac{[\text{MSPC}]_{\text{inc}}}{[\text{HC}]_{\text{inc}}} > \frac{[\text{MSPC}]_{\text{asp}}}{[\text{HC}]_{\text{asp}}} \quad (2).$$

25 Para los fines de la presente invención, el “tejido musculoesquelético” comprende hueso, tendón, cartílago, ligamento, músculo y periodontio. Los “injertos musculoesqueletogénicos” incluyen injertos osteogénicos, injertos condrogénicos e injertos tenogénicos.

Para los fines de la presente invención, un material “adherente” es un material que puede adherirse al material de matriz porosa cuando pasa a través del material de la matriz porosa.

30 En algunas realizaciones, la fracción fisiológica del BMA está suspendida dentro de los poros de la matriz. Puesto que las MSPCs de esta realización no están adheridas a la superficie de la matriz, sino más bien simplemente suspendidas dentro de los poros, pueden ser más activas y más próximas a su etapa de desarrollo fisiológico. Igualmente, pueden formar agregados de células.

35 En algunas realizaciones, las MSPCs están presentes en la fracción fisiológica en una proporción 2 veces mayor que su proporción nativa en el BMA entero, preferiblemente en una proporción 5 veces mayor que su proporción nativa en el BMA entero. Estas realizaciones proporcionan una concentración incluso mayor de su componente crítico de MSG.

40 En algunas realizaciones, los RBCs obtenidos del BMA están presentes en la fracción fisiológica en una proporción menor del 20% de su proporción nativa en el BMA entero, permitiendo, de esta forma, que el recubrimiento de linfa cuajada rico en MSPC represente una gran porción del volumen de la fracción del BMA retenido y permitiendo, de esta forma, proporciones incluso mayores de constituyentes MSG celulares tales como MSPCs.

45 En algunas realizaciones, el BMA fraccionado comprende además fibrinógeno presente en la fracción fisiológica a una proporción menor del 20% de su proporción nativa en el BMA entero. Puesto que la inmensa mayoría del fibrinógeno está en el volumen de plasma del BMA fraccionado, el mantenimiento de la proporción de fibrinógeno baja (por ejemplo, substancialmente mediante la eliminación de la fracción PPP), permite que el recubrimiento de linfa cuajada rico en MSPC represente una gran proporción del volumen de la fracción de BMA retenido, permitiendo, incluso, proporciones mayores de constituyentes MSG celulares tales como MSPCs.

50 En algunas realizaciones, el BMA entero comprende además células hematopoyéticas HCs en una proporción nativa, la fracción fisiológica del BMA comprende además células hematopoyéticas HCs, y las MSPCs presentes en la fracción fisiológica están enriquecidas. Esta realización puede llevarse cabo seleccionando únicamente una porción relativamente rica en MSPC del recubrimiento de linfa cuajada, proporcionando, de esta forma, una proporción muy alta de MSPCs en el material compuesto. Sin embargo, preferiblemente las HCs están presentes en la fracción fisiológica en una proporción de al menos el 25% de su proporción nativa en el BMA entero, proporcionando, de esta

forma, el material compuesto con una proporción próxima a la nativa de HCs que actúan soportando la musculoesqueletogénesis.

5 En algunas realizaciones, el BMA entero comprende además plaquetas que tienen una proporción nativa, y el BMA fraccionado comprende además plaquetas presentes en la fracción fisiológica en una proporción mayor que su proporción nativa. Si se agrega un agente de liberación de plaquetas (tal como trombina) a este material compuesto, la trombina puede causar una liberación de factores de crecimiento MSG (tal como TGF- β) contenidos dentro de las plaquetas. La proporción de plaquetas concentradas de esta realización es ventajosa puesto que proporcionará más de estos factores de crecimiento deseables. En algunas realizaciones, las plaquetas están presentes en la fracción fisiológica en una proporción 2 veces mayor que su proporción nativa (obtenible, por ejemplo, a partir de una fracción fisiológica tipo PRP).

10 En algunas realizaciones, la fracción fisiológica consiste esencialmente en el recubrimiento de linfa cuajada del BMA. Esta realización esencialmente maximiza las proporciones de las NBMCs y las plaquetas deseables en la fracción obtenible mediante simple fraccionamiento por gravedad del BMA entero, mediante la eliminación de substancialmente las fracciones RBC y PPP del BMA.

15 En algunas realizaciones el BMA entero comprende además plaquetas que tienen una proporción nativa, y el BMA fraccionado comprende además plaquetas presentes en la fracción fisiológica en una proporción menor que su proporción nativa. Dicha realización puede ser deseable si se agregan factores de crecimiento al material compuesto procedentes de otra fuente, tal como PRP procedente de sangre entera. En dichas realizaciones, las plaquetas pueden estar presentes en la fracción fisiológica en una proporción no mayor del 50% de su proporción nativa.

20 En algunas realizaciones, la fracción fisiológica consiste esencialmente en la fracción NMBC del recubrimiento de linfa cuajada del BMA. Esta realización esencialmente maximiza las proporciones de las NMBCs deseables en la fracción obtenible mediante simple fraccionamiento por gravedad del BMA entero, mediante la eliminación de substancialmente las fracciones RBC, PPP y plaquetas del BMA.

25 En algunas realizaciones, las HCs están presentes en la fracción fisiológica en una proporción mayor que su proporción nativa. Esta realización proporciona una proporción mayor de su tipo de célula MSG sin necesariamente requerir el enriquecimiento en MSPC.

En algunas realizaciones, tanto las MSPCs como las HCs están presentes en la fracción fisiológica en una proporción 2 veces mayor que su proporción nativa. Esta realización proporciona una alta proporción de los que posiblemente son los dos tipos de células más importantes para MSG.

30 En algunas realizaciones, la fracción fisiológica comprende además factores de crecimiento liberados a partir de plaquetas obtenidas del BMA. Dichos factores de crecimiento ayudan en los MSG.

En algunas realizaciones, la fracción fisiológica comprende fibrina.

35 En algunas realizaciones, la matriz porosa tiene un tamaño de poro de al menos 50 μm . Este tamaño de poro promedio más grande proporciona una vía más fácil para las células MSG de lo que se logra con un tamaño de poro de 20 μm . Preferiblemente, la matriz porosa tiene un tamaño de poro de al menos 100 μm .

40 En algunas realizaciones, la matriz porosa y la fracción fisiológica tienen cada una un volumen no poroso, en el que la relación volumétrica de la fracción fisiológica a la matriz está entre 1:1 y 1:20. Cuando la relación es al menos de 1:1, la fracción fisiológica está presente en cantidades suficientemente grandes como para ayudar en los MSG. Cuando la relación no es mayor de 1:20, la matriz porosa está presente en cantidades suficientemente grandes como para formar una estructura.

45 En algunas realizaciones, el BMA entero comprende además un primer constituyente de soporte en una proporción nativa, la fracción fisiológica comprende además una proporción reducida del primer constituyente de soporte, y el material compuesto comprende además c) un suplemento de MSG que comprende el primer constituyente de soporte, estando presente el primer constituyente de soporte en el suplemento en una proporción mayor que la proporción reducida del primer constituyente de soporte en la fracción fisiológica.

En algunas realizaciones, la fracción fisiológica del BMA es una suspensión, y el suplemento de SMG comprende una mezcla seleccionada entre el grupo que consiste en sangre entera y BMA entero. Esta realización permite obtener suplemento de MSG de manera autóloga durante cirugía sin manipulación adicional.

50 En algunas realizaciones, la fracción fisiológica del BMA es una suspensión, y el suplemento de MSG comprende una fracción fisiológica de una mezcla seleccionada entre el grupo que consiste en sangre entera y BMA entero.

En algunas realizaciones, el suplemento de MSG comprende una fracción fisiológica de sangre entera. Un suplemento de sangre entera es ventajoso dado que puede obtenerse a partir del paciente en el punto de cirugía. Preferiblemente, la fracción fisiológica de sangre entera comprende plasma rico en plaquetas PRP. Pueden obtenerse factores de crecimiento concentrados a partir de este PRP con un mínimo de manipulación.

En algunas realizaciones, el suplemento de MSG comprende una fracción fisiológica del BMA entero. Esta fracción puede obtenerse a partir de la misma etapa de separación que produjo la primera fracción fisiológica.

En algunas realizaciones, la fracción fisiológica comprende una fracción de recubrimiento de linfa cuajada fisiológica que está presente en la fracción fisiológica en una proporción de al menos 2 veces mayor que su proporción nativa.

- 5 Puede usarse cualquier procedimiento convencional de obtención de aspirado de médula ósea. En un procedimiento, el acceso percutáneo a la cresta ilíaca anterior o posterior se obtiene a través de una aguja de orificio grande (es decir, Jamshidi) y jeringuilla. La aspiración de los contenidos de la médula dentro de una jeringuilla pre-llenada con un anticoagulante, tal como heparina sódica, se realiza al tiempo que retira la aguja hacia atrás y se saca de su punto más profundo de inserción. Pueden realizarse múltiples punciones dentro del hueso con el fin de obtener aspiraciones con la cantidad la más pequeña de contaminación de sangre periférica.

- 10 En algunas realizaciones, se obtiene una fracción fisiológica del BMA que tiene MSPCs concentradas mediante el primer fraccionamiento de BMA entero para obtener un BMA fraccionado y, a continuación, eliminación de las fracciones no deseadas con el fin de dejar la fracción fisiológica que tiene las MSPCs incrementadas. El fraccionamiento del aspirado de médula ósea puede llevarse a cabo mediante cualquier procedimiento convencional de aislamiento de células nucleadas, incluyendo la centrifugación por gradiente de densidad, lisis osmótica de células particulares (tal como agua para lizar glóbulos rojos), y otros procedimientos para la concentración de la porción osteogénica activa de médula ósea fresca. En un procedimiento preferido, el aspirado en primer lugar se centrifuga a 500 g durante 5-10 minutos, dando como resultado un aspirado fraccionado que tiene una fracción de plasma, una porción de recubrimiento de linfa cuajada entera que comprende una porción rica en NMBC y una porción rica en plaquetas, y una fracción RBC. Dentro de la fracción rica en NMBC existe una fracción que tiene una proporción enriquecida de MSPCs. A continuación, las fracciones de plasma, PRP y RBC son substancialmente eliminadas mediante extracción, aislándose, de esta forma, esencialmente la porción rica en NMBC. Opcionalmente, pueden igualmente eliminarse una fracción o fracciones seleccionadas de la fracción de recubrimiento de linfa cuajada entera, dejando una fracción que tiene una proporción enriquecida de las MSPCs.

- 25 Preferiblemente, las MSPCs en la fracción fisiológica del BMA están presentes en la fracción fisiológica en una proporción de al menos aproximadamente 2 veces su proporción nativa. Esta proporción incrementada puede lograrse eliminando al menos aproximadamente el 90% de o bien el plasma o bien los glóbulos rojos procedentes del aspirado de médula ósea fraccionado. Más preferiblemente, las MSPCs están presentes en una proporción de al menos 5 veces su proporción nativa. Esta proporción incrementada puede lograrse eliminando al menos aproximadamente el 90% de o bien las fracciones de plasma o bien de glóbulos rojos procedentes del aspirado de médula ósea fraccionada. Más preferiblemente, las MSPCs están presentes en la fracción fisiológica en una proporción de al menos 10 veces su proporción nativa. Esta proporción incrementada puede lograrse eliminando al menos aproximadamente el 99% de o bien el plasma o bien los glóbulos rojos procedentes del aspirado de médula ósea.

- 35 Preferiblemente, la HC de la fracción fisiológica está presente en la fracción fisiológica en una proporción de al menos aproximadamente 2 veces su proporción nativa. Esta proporción puede incrementarse eliminando al menos aproximadamente el 90% de o bien el plasma o bien los glóbulos rojos procedentes del aspirado de médula ósea fraccionado. Más preferiblemente, la HC está presente en la fracción fisiológica una proporción de al menos 5 veces su proporción nativa. Esta proporción puede lograrse eliminando al menos aproximadamente el 90% de o bien del suero o bien de glóbulos rojos procedentes del aspirado de médula ósea fraccionada. Más preferiblemente, la HC está presente en una proporción de al menos 15 veces su proporción nativa. Esta proporción puede lograrse eliminando al menos aproximadamente el 99% de o bien el suero o bien los glóbulos rojos procedentes del aspirado de médula ósea.

- 45 Sin desear teorizar, se estima que las HCs juegan un papel de soporte importante para las MSPCs en la formación de osteoblastos mediante la formación por secreción de una diversidad de factores de crecimiento y de citocinas, así como mediante la estimulación de la diferenciación a través del contacto directo de célula a célula y, por ello, están deseablemente presentes en las suspensiones ricas en CTCPC a proporciones elevadas. De acuerdo con ello, en una realización, la presente invención proporciona un material compuesto para injerto autólogo en un paciente que tiene proporciones nativas de MSPCs y HCs, comprendiendo el material compuesto para injerto:

- 50 a) una suspensión que comprende tipos de células MSPC y HC, en la cada uno de los tipos de células MSPC y HC están presentes en una concentración de al menos 2 veces mayor que sus proporciones nativas, y la suspensión excluye al menos una porción de las células nucleadas que se encuentran en la médula ósea,

b) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm .

- 55 De acuerdo con ello, en una realización, la presente invención proporciona un material compuesto para injerto autólogo para injerto en un paciente, comprendiendo el material compuesto para injerto:

a) una porción de recubrimiento de linfa cuajada entera de médula ósea entera,

b) al menos una porción de una porción de plasma de médula ósea entera, y

c) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm .

Dado que el componente de la matriz porosa del material compuesto de la presente invención tiene un tamaño de poro promedio D_{50} , determinado mediante porosimetría por mercurio, de al menos 20 μm , su porosidad es suficiente para permitir que las células de médula ósea nucleadas fluyan a través del mismo (es decir, una estructura). la capacidad de estas células nucleadas para atravesar la matriz (y de las células nativas nucleadas para penetrar en la matriz) permite a la MSG acoplarse suavemente y sin fisuras tanto dentro como alrededor del sustrato. Por el contrario, la tecnología del contenedor de difusión de Harada no proporciona una osteogénesis sin fisuras.

Preferiblemente, la matriz está hecha a partir de un material para injerto implantable, biocompatible. Preferiblemente, es también reabsorbible. En algunas realizaciones, el material tiene una superficie cargada. Preferiblemente, el compuesto comprende entre aproximadamente 5-50% en volumen de matriz y entre aproximadamente 50-95% en volumen de suspensión dispuesta dentro de los poros formados por la matriz. Si el volumen de la fracción de la matriz es menor de aproximadamente 5% en volumen (excluyendo su porosidad), en ese caso, el efecto de la matriz como una estructura no es significativo.

Los ejemplos de materiales para injerto implantables, biocompatibles, que tienen una superficie cargada, incluyen materiales cerámicos que comprenden fosfato cálcico tal como, por ejemplo, hidroxiapatito o fosfato tricálcico; así como matriz ósea desmineralizada; o matriz ósea mineralizada. Otros materiales para injerto adecuados incluyen ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido poligaláctico, policaprolactona, óxido de polietileno, óxido de polipropileno, polisulfona, polietileno, y polipropileno. Otros materiales para injerto adecuados son ácido hialurónico, el cual puede purificarse con o sin reticulación, bicristal, gelatina y colágeno. Los materiales para injerto particularmente adecuados incluyen, por ejemplo, secciones óseas cancelosas mineralizadas aisladas, polvos o gránulos de hueso mineralizado, secciones óseas cancelosas desmineralizadas, polvos o gránulos de hueso desmineralizado, matriz ósea desmineralizada extraída con guanidina-HCl, hueso canceloso o cortical sinterizado, hidroxiapatito coralino comercializado por Interpore bajo el nombre comercial de Interpore 500TM, o Interpore 200TM, ProOsteon 500RTM y materiales cerámicos en gránulos tales como los incorporados dentro del sustituto para injerto óseo CollagraftTM comercializado por ZimmerTM, o colágeno filamentoso o esponjas de gelatina tal como GelfoamTM o HelistatTM.

En algunas realizaciones, las moléculas de adhesión de células están unidas a la superficie de la matriz. El término "moléculas de adhesión de células" se refiere de manera colectiva a lamininas, fibronectina, vitronectina, moléculas de adhesión de células vasculares (V-CAM), moléculas de adhesión intercelular (I-CAM), tenascina, trombospondina, osteonectina, osteopontina, sialoproteína ósea, y colágenos. Opcionalmente, la matriz tiene factores de crecimiento unidos a la superficie de la misma. Tal como se usa en la presente invención, el término "factores de crecimiento" abarca cualquier producto celular que module el crecimiento o la diferenciación de otras células, particularmente células progenitoras del tejido conjuntivo. Los factores de crecimiento incluyen, pero sin limitarse a ellos, isoformas de factores de crecimiento obtenidos de plaquetas (PDFG), factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento epiteliales, isoformas de TGF- β , factores de crecimiento de tipo insulina, y proteínas morfogénicas óseas.

Opcionalmente, la matriz tiene anticuerpos que tienen afinidad por las células madre progenitoras del tejido conjuntivo unidas a la superficie de la misma. Los anticuerpos adecuados incluyen, a modo de ejemplo, STRO-1, SH-2, SH-3, SH-4, SB-10, SB-20, y anticuerpos de fosfatasa alcalina. Dichos anticuerpos están descritos por Haynesworth y otros, en Bone, vol. 13, págs. 69-80, (1992a); Bruder, S. y otros, en Trans. Ortho. Res. Soc., vol. 21, pág. 574, (1996); Haynesworth y otros, en Bone, vol. 13, págs. 69-80, (1992); Stewart, K. y otros, en J. Bone Miner. Res., vol. 11 (Supl.), pág. S142, (1996); Flemming JE, y otros, en Embryonic Human Skin. Developmental Dynamics, vol. 212, págs. 119-132, (1988); y Bruder SP, y otros, en Bone, vol. 21, (no. 3), págs. 225-235, (1997).

En algunas realizaciones, la matriz tiene un número suficiente de poros o de vías de paso, de manera tal que el área superficial accesible del sustrato es al menos cinco veces mayor que el de un objeto sólido que tenga las mismas dimensiones exteriores. De acuerdo con ello, puede lograrse el área superficial total preferida usando un sustrato que comprenda una masa de polvo, una masa de gránulos, una masa de fibras, o un bloque altamente poroso de material de sustrato. Preferiblemente, el tamaño de poro promedio en la matriz es mayor de 20 μm , más preferiblemente mayor de 50 μm , lo más preferiblemente mayor de 100 μm .

Igualmente, de acuerdo con la presente invención, el aspirado de médula ósea entera puede centrifugarse para proporcionar un aspirado fraccionado; los glóbulos rojos y el plasma son substancialmente eliminados del aspirado para obtener una fracción fisiológica del BMA que comprende una suspensión de recubrimiento de linfa coagulada entera que tiene células de médula ósea nucleadas (NMBC) presentes en la fracción fisiológica a una concentración 2 veces (y preferiblemente al menos 5 veces) su proporción nativa; y, a continuación, esta suspensión de recubrimiento de linfa coagulada se introduce en una matriz porosa adecuada. De acuerdo con ello, el material compuesto de la invención puede comprender:

a) una fracción fisiológica que comprende una suspensión de células de médula ósea nucleada NMBC entera, en la cual están presentes tanto tipos de células MSPC y como de HC en una población de células entre 2 y 9 veces mayor que sus proporciones nativas, y

b) una matriz porosa, en la que la matriz tiene un tamaño del poro promedio de al menos 20 μm .

Para los fines de la presente invención, una "suspensión de NBMC entera" comprende una suspensión en la cual la relación de MSPCs a HCs está dentro de 50 puntos de porcentaje de la relación nativa de MSPC:HC presente en el aspirado de médula ósea entera autóloga. En otras palabras, la suspensión de recubrimiento de linfa cuajada entera satisface la relación siguiente:

$$0,50 \cdot \frac{[\text{MSPC}]_{\text{asp}}}{[\text{HC}]_{\text{asp}}} < \frac{[\text{MSPC}]_{\text{susp}}}{[\text{HC}]_{\text{susp}}} < 1,50 \cdot \frac{[\text{MSPC}]_{\text{asp}}}{[\text{HC}]_{\text{asp}}} \quad (3).$$

Preferiblemente, la relación de MSPC:HC en la suspensión está dentro del 25% de la del aspirado nativo, más preferiblemente dentro del 5%.

Una suspensión de NBMC entera es ventajosa dado que contiene cantidades concentradas de dos de los principales tipos de células obtenidas de BMA que se estima que juegan un papel en los MSG.

Opcionalmente, el componente de plaquetas del BMA fraccionado es eliminado también durante el procedimiento anteriormente descrito con el fin de proporcionar una suspensión de NBMC entera esencialmente aislada. Cuando esta suspensión NBMC entera aislada se combina con una matriz adecuada, el material compuesto resultante comprende:

a) una fracción de recubrimiento de suspensión de NBMC entera esencialmente aislada en la cual están presentes tipos de células MSPC y HC en una población de células entre 2 y 9 veces mayor que sus proporciones nativas, y

b) una matriz implantable estéril porosa, en la que la matriz tiene un tamaño del poro promedio de al menos 20 μm .

El material compuesto resultante para uso en injerto óseo autólogo comprende:

a) una fracción fisiológica de BMA que comprende:

i) una proporción enriquecida de células progenitoras de tejido conjuntivo MSPCs, y

ii) células hematopoyéticas (HCs) que tienen una proporción que es al menos el 25% de su proporción nativa, y

b) una matriz implantable biocompatible porosa, en la que la matriz tiene un tamaño del poro promedio de al menos 20 μm .

Preferiblemente, el material compuesto anterior comprende un agente gelificante útil para mantener el compuesto unido. En algunas realizaciones, el agente gelificante es un agente coagulante que comprende una cantidad de fibrinógeno que, cuando se agrega al material compuesto, está presente en el material compuesto a una concentración de al menos 0,1 mg/cm^3 del material compuesto, más preferiblemente de al menos 0,5 mg/cm^3 . Preferiblemente, el agente coagulante está seleccionado entre el grupo que consiste en plasma pobre en plaquetas, plasma rico en plaquetas y aspirado de médula ósea entero. Típicamente, el agente coagulante se activa mediante un activador tal como trombina. El activador puede mezclarse dentro del material compuesto antes de su colocación en un sitio herido, o colocarlo simultáneamente con el material compuesto en el sitio herido. En algunas realizaciones, el fibrinógeno está presente en la fracción fisiológica del BMA. En otras, se agrega como un componente separado. En algunas realizaciones, el agente gelificante es colágeno.

Tal como se ha indicado anteriormente, se estima que la concentración convencional de la fracción NBMC (por ejemplo, mediante centrifugación seguido de separación) dentro del BMA que conduce a las MSPCs incrementadas, puede igualmente conducir a una reducción no deseable en el componente concentrado resultante de al menos alguno de los constituyentes nativos siguientes dentro del BMA, algunos de los cuales al menos pueden jugar un papel de soporte en la musculoesqueletogénesis. Algunos de estos constituyentes de soporte se estima que son:

a) constituyentes a base de plasma, tal como:

i) proteínas de plasma (tanto adherentes como no adherentes), tal como VCAM; y

ii) factores de crecimiento solubles, tales como EGF y TGF- β ,

b) constituyentes a base de recubrimiento de linfa coagulada, tal como:

i) células distintas de MSPC, tales como HCs y OBs;

ii) proteínas y moléculas las cuales o bien son no adherentes (tal como RDGF) o bien no residen en la fracción rica en MSPC del recubrimiento de linfa coagulada obtenible mediante centrifugación, tal como las interleucinas secretadas secretas por las HCs;

iii) plaquetas,

5 iv) factores de crecimiento liberados por plaquetas, tales como TGF- β y PDFG, y

c) constituyentes a base de glóbulos rojos, tal como hemoglobina de unión a oxígeno.

Dependiendo del procedimiento usado para concentrar las MSPCs, cada uno de los constituyentes de soporte nativos anteriormente mencionados del BMA puede representar el constituyente reducido de la presente invención. Puesto que la presencia de estos constituyentes reducidos nativos se considera normalmente como deseable para los MSG, en algunas realizaciones, las cantidades volumétricas de los componentes primero y segundo se seleccionan de manera tal que, cuando los componentes primero y segundo se combinan, la cantidad total del constituyente reducido en el material compuesto resultante es al menos el 25% de su proporción nativa, determinada sobre una base volumétrica. Para los fines de la presente invención, cuando la cantidad total del constituyente reducido en el material compuesto resultante es al menos el 25% de su proporción nativa, el constituyente reducido está en una proporción "cerca de la nativa". Preferiblemente, la cantidad total del constituyente reducido en el material compuesto es al menos del 33% de su proporción nativa, más preferiblemente al menos el 50%.

Preferiblemente, esta mezcla MSG se carga dentro de una matriz soporte para proporcionar un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entero que tiene proporciones nativas de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs y un primer constituyente de soporte, comprendiendo el material compuesto:

a) una fracción fisiológica del BMA que comprende:

i) MSPCs presentes en la fracción fisiológica en una proporción mayor que su proporción nativa en el BMA entero, y

ii) una proporción reducida del primer constituyente de soporte, y

25 b) un suplemento MSG que comprende el primer constituyente de soporte, estando presente el primer constituyente de soporte en el suplemento en una proporción mayor que la proporción reducida del primer constituyente de soporte en la fracción fisiológica, y

c) una matriz implantable biocompatible porosa, en la que la matriz tiene un tamaño del poro promedio de al menos 20 μm .

30 En una primera realización preferida dirigida al llenado de constituyentes nativos reducidos, el BMA entero se manipula (preferiblemente mediante centrifugación a alta rpm) para formar un BMA fraccionado, y la fracción RBC, la fracción de plasma y el botón de plaqueta son eliminados del BMA fraccionado para dejar un primer componente que consiste esencialmente en la fracción de célula de médula ósea nucleada NBMC de la fracción de recubrimiento de linfa coagulada entera (que comprende altas proporciones de MSPCs). Puesto que las bandas de RBC, plasma y plaquetas comprenden aproximadamente 90-95% en volumen ("%" en volumen") del BMA, la proporción de MSPC en el primer componente se ha incrementado aproximadamente 9-19 veces sobre su proporción nativa en el BMA. Sin embargo, este primer componente también está libre de constituyentes importantes que típicamente residen en las fracciones de plasma y plaquetas del BMA entero y pueden jugar un papel en los MSG, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, fibrinógeno (que se encuentra en la fracción de plasma), factores de crecimiento solubles a base de plasma, y factores de crecimiento liberados de las plaquetas durante la reacción de liberación de plaquetas, tal como PDFG. Cada uno de estos constituyentes se estima que juegan un papel en los MSG.

De acuerdo con ello, en una realización, el segundo componente del material compuesto comprende plaquetas en una proporción mayor que la presente en el primer componente. Cuando estos componentes se mezclan, la proporción de plaquetas en el material compuesto es mayor que la que inicialmente se encuentra en el primer componente.

45 Como alternativa, el segundo componente del material compuesto comprende un factor de crecimiento obtenido de plaquetas libre en una proporción mayor que la presente en el primer componente. Cuando estos componentes se mezclan, la proporción del factor obtenido de plaquetas libre en el material compuesto es mayor que la que inicialmente se encuentra en el primer componente.

50 Preferiblemente, el segundo componente de esta realización tiene una proporción de plaquetas o de factor de crecimiento obtenido de plaquetas al menos igual al de su proporción nativa. En un primer caso, el segundo componente consiste esencialmente en aspirado de médula ósea entero, el cual contiene tanto plaquetas como factores obtenidos de plaquetas esencialmente en sus proporciones nativas. Cuando este segundo componente se mezcla con el componente de recubrimiento de linfa cuajada, las proporciones de plaquetas y de factores obtenidos de plaquetas en el material compuesto pueden estar cerca de las proporciones nativas. En un segundo caso, el segundo compo-

nente es plasma rico en plaquetas (PRP). Cuando este componente se mezcla con el componente de recubrimiento de linfa cuajada, la proporción de plaquetas o de factor obtenido de plaquetas en el material compuesto puede ser igual o exceder a la del BMA nativo.

5 En realizaciones preferidas, la relación volumétrica del primer componente al segundo componente está entre 1:1 y 1:20, más preferiblemente entre 1:3 y 1:10. Opcionalmente, si las plaquetas se seleccionan como el suplemente MSG, estas pueden volverse a suspenderse en volúmenes de plasma (hasta a partir de PRP) antes de mezclarlas con la fracción de recubrimiento de linfa cuajada aislada.

10 En una segunda realización preferida, el BMA se manipula (preferiblemente mediante centrifugación) para formar un BMA fraccionado. A continuación, no solamente se eliminan las fracciones de plasma y RBC, sino también una fracción pobre en MSPC del recubrimiento de linfa cuajada, del BMA fraccionado (tal como Budenz), para formar un primer componente que comprende MSPCs enriquecidas. Puesto que las fracciones de RBC, plasma, y del recubrimiento de linfa cuajada eliminadas pueden comprender al menos aproximadamente el 95-99 por ciento en volumen ("%" en volumen) del BMA, la proporción de MSPC en el primer componente puede incrementarse al menos 20 veces (y frecuentemente hasta 50 veces) sobre su proporción nativa en el BMA, y ha sido enriquecido con relación a las otras NBMCs tal como HC. Sin embargo, este primer componente está también reducido respecto de constituyentes importantes que típicamente residen en la fracción de recubrimiento de linfa cuajada entera y pueden jugar un papel en MSG, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, ciertas NBMCs y proteínas del recubrimiento de linfa cuajada y moléculas presentes originalmente en la porción de recubrimiento de linfa cuajada eliminada. Por ejemplo, una NBMC la cual puede reducirse durante el enriquecimiento de MSPC es HC. Estas proteínas del recubrimiento de linfa cuajada reducida, moléculas y HCs pueden jugar un papel en los MSG.

De acuerdo con ello, en una realización, el segundo componente del material compuesto comprende HCs presentes en el segundo componente en una proporción mayor que la presente en el primer componente. Cuando estos componentes se mezclan, la proporción de HCs en el material compuesto es mayor que la que se encuentra en el primer componente.

25 Como alternativa, el segundo componente del material compuesto comprende una fracción fisiológica de BMA que comprende proteínas obtenidas del recubrimiento de linfa cuajada en una proporción mayor que la presente en el primer componente. Cuando estos componentes se mezclan, la proporción de las proteínas obtenidas del recubrimiento de linfa cuajada en el material compuesto es mayor que la que inicialmente se encuentra en el primer componente.

30 Preferiblemente, el segundo componente de esta realización tiene una proporción de HC o de proteína de recubrimiento de linfa cuajada al menos igual a la de su proporción nativa. En un primer caso, el segundo componente es preferiblemente aspirado de médula ósea entero, el cual contiene tanto HC como proteínas de recubrimiento de linfa cuajada esencialmente en sus proporciones nativas. Cuando este segundo componente se mezcla con el componente de recubrimiento de linfa cuajada, las proporciones de HC y de proteínas de recubrimiento de linfa cuajada en el material compuesto pueden estar cerca de las proporciones nativas. En un segundo caso, el segundo componente es una fracción de recubrimiento de linfa cuajada fisiológica, la cual típicamente tiene proporciones de proteína de recubrimiento de linfa cuajada y HC que exceden a las del BMA entero nativo en un factor de aproximadamente 9-19. Cuando este componente se mezcla con el primer componente enriquecido en MSPC, las proporciones de proteína de recubrimiento de linfa cuajada y de HC en el material compuesto pueden ser iguales o exceder a las del BMA nativo.

Este procedimiento preferido da como resultado una suspensión que comprende aspirado de médula ósea entero o recubrimiento de linfa cuajada entera (que contiene inherentemente sus proporciones nativas de NBMCs de no MSPC que estima son necesarias para soportar adecuadamente la actividad osteogénica de MSPC) que tiene una proporción enriquecida de MSPCs.

45 En realizaciones preferidas, la relación volumétrica del primer componente al segundo componente está entre 1:1 y 1:20, preferiblemente entre 1:3 y 1:10.

50 En realizaciones preferidas en las cuales la fracción fisiológica de BMA tiene proporciones de MSPC enriquecidas, la fracción MSPC enriquecida se obtiene mediante la centrifugación de aspirado de médula ósea y, a continuación, el aislamiento de la fracción rica en MSPC dentro de la fracción NBMC. En algunas realizaciones, puede obtenerse una fracción rica en MSPC mediante el aislamiento de la porción del BMA centrifugado que tiene una densidad de entre 1,06 g/cm³ y 1,09 g/cm³, más preferiblemente entre 1,07 g/cm³ y 1,08 g/cm³. La suspensión resultante comprende una fracción fisiológica de BMA que consiste esencialmente en constituyentes que tienen una densidad mínima de aproximadamente 1,06 g/cm³ y una densidad máxima de aproximadamente 1,09 g/cm³.

55 En dichas fracciones aisladas, la concentración de MSPC está típicamente entre 1.000 y 1.000.000 células por mililitro (ml). A continuación, esta fracción MSPC enriquecida puede mezclarse con suplementos de MSG que tienen proporciones (y preferiblemente nativas) mayores de HCs, (tal como aspirado de médula ósea fresco) para producir una suspensión que tiene proporciones enriquecidas de MSPCs y proporciones casi nativas de HCs. En una realización preferida, se agregan aproximadamente 1-5 partes en volumen de una primera fracción fisiológica que contiene

- una fracción MSPC altamente enriquecida a aproximadamente 5-9 partes en volumen de una suspensión que tiene proporciones nativas de HCs para producir una suspensión que tiene tanto proporciones enriquecidas de HCs como de proporciones casi nativas de HCs. En una realización especialmente preferida, la primera fracción fisiológica se obtiene mediante centrifugación por gradiente de densidad, y de esta forma contiene aproximadamente una proporción de MSPC aproximadamente 10 veces mayor que la proporción de MSPC en el BMA nativo, y la suspensión es aspirado de médula ósea entero. Estas dos suspensiones se mezclan en una relación en volumen de aproximadamente 1:9 para obtener una nueva suspensión que comprende a) aproximadamente 0,1% de MSPC presente al 110-400% de su proporción nativa, y b) aproximadamente 95% de HC presente a aproximadamente 90% de su proporción nativa.
- En una tercera realización preferida, el BMA entero se manipula para formar un BMA fraccionado, y al menos parte de la fracción de plasma se elimina del BMA fraccionado para formar un primer componente que comprende una fracción de recubrimiento de linfa cuajada concentrada (la cual comprende MSPCs). Puesto que el plasma entero comprende aproximadamente 50 por ciento en volumen ("%" en volumen") del BMA, la proporción de MSPC en el primer componente se ha incrementado hasta aproximadamente 2 veces sobre su proporción nativa en el BMA. Sin embargo, este primer componente está también reducido en constituyentes importantes que típicamente residen en la fracción de plasma y pueden jugar un papel en los MSG, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, fibrinógeno y otras proteínas del plasma tales como factores de crecimiento solubles.
- De acuerdo con ello, en una realización, el segundo componente del material compuesto comprende fibrinógeno en una proporción mayor que la presente en el primer componente. Cuando estos componentes se mezclan, la proporción de fibrinógeno en el material compuesto es mayor que la que inicialmente se encuentra en el primer componente. Preferiblemente, el segundo componente que comprende fibrinógeno es una fracción fisiológica del BMA o de sangre entera.
- Como alternativa, el segundo componente del material compuesto comprende una fracción fisiológica del BMA que comprende un factor de crecimiento soluble obtenido de plasma con una proporción mayor que la presente en el primer componente. Cuando estos componentes se mezclan, la proporción del factor de crecimiento soluble obtenido de plasma en el material compuesto es mayor la que inicialmente se encuentra en el primer componente.
- Preferiblemente, el segundo componente de esta realización tiene una proporción de fibrinógeno o de factor de crecimiento soluble obtenido de plasma al menos igual a la de su proporción nativa. En un primer caso, el segundo componente comprende aspirado de médula ósea entero, el cual contiene tanto fibrinógeno como factores de crecimiento solubles en aproximadamente sus proporciones nativas (debido a la adición de anticoagulantes). Cuando este segundo componente se mezcla con el primer componente de recubrimiento de linfa cuajada, las proporciones de fibrinógeno y del factor de crecimiento soluble en el material compuesto puede aproximarse a las presentes en el BMA nativo. En un segundo caso, el segundo componente es plasma entero del cual se ha extraído el agua y, en consecuencia, contiene fibrinógeno concentrado y factor de crecimiento soluble concentrado. Cuando este componente se mezcla con el recubrimiento de linfa cuajada concentrado del primer componente, la proporción de fibrinógeno o de factor de crecimiento soluble obtenido de plasma en el material compuesto puede ser igual o exceder de la del BMA nativo.
- En un caso particularmente preferido de esta realización, el BMA se centrifuga para formar un BMA fraccionado, y no solamente la fracción de plasma sino también la fracción RBC son substancialmente eliminadas del BMA fraccionado, dejando un primer componente que consiste esencialmente en una porción de recubrimiento de linfa cuajada entera (la cual comprende altas proporciones de MSPCs e incluye plaquetas). Puesto que las fracciones de RBC y plasma comprenden aproximadamente el 90-95% por ciento en volumen (% en volumen) del BMA, la proporción de MSPC en el primer componente se ha incrementado aproximadamente 9-19 veces sobre su proporción nativa en el BMA.
- De acuerdo con ello, los materiales para injerto óseo autólogos de materiales compuestos de acuerdo con la presente invención, pueden producirse a partir de BMA entero que tiene una proporción nativa de células de médula ósea nucleares NBMC usando un procedimiento, que comprende las etapas de:
- a) proporcionar una suspensión que comprende una fracción de recubrimiento de linfa cuajada concentrada que tiene una proporción de NBMC al menos 2 veces mayor (preferiblemente, entre aproximadamente 9 y aproximadamente 19 veces mayor) que su proporción nativa, y
 - b) mezclar el primer componente con un segundo componente que comprende (y preferiblemente consiste esencialmente de) BMA entero.
- Este procedimiento da como resultado una suspensión del BMA entero (el cual inherentemente contiene sus proporciones nativas de fibrinógeno y de factores de crecimiento que se estima son necesarios para el soporte adecuado de la actividad osteogénica de la MSPC) que tiene una proporción enriquecida de MSPCs. En realizaciones preferidas, la relación volumétrica del primer componente al segundo componente está entre 1:1 y 1:20, más preferiblemente entre 1.3 y 1:10.

De acuerdo con ello, se proporciona una composición osteogénica para la producción de materiales para injerto óseo autólogos a partir de BMA entero, que tiene una proporción nativa de células de médula ósea nucleares NBMC que comprende:

- 5 a) un primer componente que comprende una suspensión de recubrimiento de linfa cuajada concentrada que tiene una proporción de NBMC de al menos 2 veces mayor (preferiblemente, al menos 9-19 veces mayor) que su proporción nativa, y
- b) un segundo componente que comprende (y preferiblemente consiste esencialmente de) BMA entero.

Preferiblemente, la composición osteogénica se carga dentro de una matriz soporte para proporcionar un material compuesto para uso en injerto óseo autólogo, que comprende:

- 10 a) una suspensión que comprende:
 - i) una suspensión de recubrimiento de linfa cuajada concentrada que tiene una proporción de NBMC al menos 2 veces mayor (preferiblemente, al menos 9-19 veces mayor) que su proporción nativa, y
 - ii) BMA entero, y
- 15 b) una matriz implantable biocompatible porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm .

De acuerdo con la invención, la primera fracción de BMA que tiene proporciones de MSPC incrementadas es preferiblemente una fracción fisiológica, y más preferiblemente comprende la fracción de recubrimiento de linfa cuajada entera. Sin embargo, en algunas realizaciones, la primera fracción no necesita ser fisiológica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el BMA se pasa a través de una matriz porosa capaz de retener de manera selectiva las MSPCs, tal como Muschler I, para formar un primer componente que comprende MSPCs enriquecidas. De acuerdo con Muschler, este procedimiento puede incrementar la proporción de MSPC en el primer componente (el cual incluye el sustrato) en hasta 19 veces sobre su proporción nativa en el BMA (si el volumen del material de la matriz es 10% del volumen del BMA tratado). Sin embargo, este primer componente puede carecer igualmente de constituyentes importantes que típicamente residen en la fracción de recubrimiento de linfa cuajada y pueden jugar un papel en los MSG, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, ciertos NBMCs no adherentes y proteínas de recubrimiento de linfa cuajada no adherentes presentes normalmente en el recubrimiento de linfa cuajada, y proteínas no adherentes normalmente presentes en el plasma. Por ejemplo, una NBMC no adherente que puede reducirse durante el procedimiento de enriquecimiento de MSPC de Muschler es el leucocito polimorfonuclear. Una proteína de plasma no adherente que puede reducirse durante este procedimiento de enriquecimiento de MSPC es la interleuquina-1. Estas proteínas de recubrimiento de linfa cuajada y plasma no adherentes y las NBMCs no adherentes pueden jugar un papel en los MSG.

De acuerdo con ello, en una realización, el segundo componente del material compuesto comprende una fracción fisiológica del BMA que comprende una NBMC no adherente en una proporción mayor que la presente en el primer componente. Cuando estos componentes se mezclan, la proporción de las NBMCs no adherentes en el material compuesto es mayor que la que inicialmente se encuentra en el primer componente.

Como alternativa, el segundo componente del material compuesto comprende una fracción fisiológica del BMA que comprende una proteína de recubrimiento de linfa cuajada no adherente en una proporción mayor que la presente en el primer componente. Cuando estos componentes se mezclan, la proporción de proteína de recubrimiento de linfa cuajada no adherente en el material compuesto es mayor que la que inicialmente se encuentra en el primer componente. Como alternativa, el segundo componente del material compuesto comprende una fracción fisiológica del BMA que comprende una proteína de plasma no adherente en una proporción mayor que la presente en el primer componente. Cuando estos componentes se mezclan, la proporción de proteína de plasma no adherente en el material compuesto es mayor que la que inicialmente se encuentra en el primer componente.

Preferiblemente, el segundo componente de esta realización tiene una proporción de NBMC no adherente, proteína de plasma no adherente o proteína de recubrimiento de linfa cuajada no adherente al menos igual a la de sus proporciones nativas. En un primer caso, el segundo componente es preferiblemente aspirado de médula ósea entero, el cual contiene proteínas de HC no adherentes y de recubrimiento de linfa cuajada no adherente y de plasma esencialmente en sus proporciones nativas. Cuando este segundo componente se mezcla con el primer componente de MSPC enriquecido, la proporción de constituyente no adherente en el material compuesto puede estar cerca de las proporciones nativas. En un segundo caso, el segundo componente comprende una fracción de recubrimiento de linfa cuajada entera, la cual tiene proporciones de proteína de NBMC no adherente y de recubrimiento de linfa cuajada no adherente que exceden de las del BMA nativo en un factor de aproximadamente 9-19. Cuando este componente se mezcla con el primer componente MSPC enriquecido, la proporción de proteínas de recubrimiento de linfa cuajada no adherente o la proporción de NBMC no adherente en el material compuesto puede ser igual o exceder la del BMA nativo.

Se estima además que el grado con el que están unidas tanto las MSPCs como otros materiales MSG dentro de un material compuesto musculoesquelotogénico a la matriz porosa, puede influir en el impacto de los materiales que juegan en la cadena de episodios que conducen a la musculoesquelotogénesis. En particular, el impacto y/o el papel jugado por un material bioactivo puede depender de si el material bioactivo está a) predominantemente unido a la superficie de la matriz porosa, b) predominantemente suspendido dentro de los intersticios de la matriz porosa, o c) presente tanto sobre la superficie de la matriz porosa como suspendido dentro de sus intersticios.

Se estima que los autores de la presente invención han fabricado a medida primeramente la microestructura de los materiales compuestos musculoesquelotogénicos de manera tal que no solamente los factores de crecimiento solubles sino también los componentes celulares MSG, tales como las MSPCs, se suministren en un estado unido o parcialmente unido, libre predeterminado, dependiendo de su disponibilidad deseada en la producción de respuestas musculoesquelotogénicas específicas.

En general, cuando un material bioactivo está libremente suspendido dentro de los intersticios de la matriz, está esencialmente disponible inmediatamente para la actividad MSG dentro de la matriz porosa. La libre suspensión de dicho material puede ser deseable cuando dicho material bioactivo juega un papel en las fases iniciales de la musculoesquelotogénesis. Por ejemplo, ciertos materiales bioactivos juegan un papel deseable en un mecanismo en fase temprana (tal como quimiotaxis) y, en consecuencia, puede ser deseable que al menos una porción de dicho material esté libremente suspendido dentro de los intersticios de la matriz. Cuando el material está en esta fase libremente suspendido, está esencialmente inmediatamente disponible para actuar como un agente quimiotáctico. Un material compuesto que tiene una matriz porosa y un material bioactivo libremente suspendido dentro de la misma, puede hacerse, por ejemplo, mezclando el material bioactivo con un agente coagulante activado antes de su exposición a la matriz. El procedimiento de coagulación retendrá esencialmente el material bioactivo dentro del coágulo, previniendo, de esta forma, que el material bioactivo llegue a unirse a la matriz porosa.

En algunas realizaciones, las MSPCs están suspendidas dentro de los intersticios de la matriz porosa.

Por ello, en algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesquelotogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

- a) una matriz porosa que tiene intersticios, y
- b) MSPCs presentes en una proporción mayor que su proporción nativa en el BMA entero,

en el que las MSPCs están suspendidas dentro de los intersticios de la matriz.

Si se desea la suspensión libre de un constituyente MSG dentro de los intersticios de la matriz porosa, el constituyente puede primeramente mezclarse con un material formador de gel (tal como una solución conteniendo fibrinógeno o una solución de colágeno), y la mezcla se deja gelificar. Esta mezcla pre-gelificada que comprende un material gel que tiene un constituyente MSG libremente suspendido dentro de él, puede, a continuación, mezclarse con material matriz poroso.

De manera similar, si se desea que un material bioactivo juegue un papel en un mecanismo de una fase posterior, en ese caso, puede ser deseable que dicho material esté unido a la superficie de la matriz. Cuando el material está unido en esta fase, no está inmediatamente disponible y pasa a estar disponible únicamente tras su liberación de la superficie de la matriz porosa.

Si se desea un compuesto que tenga una matriz porosa y un material bioactivo unido a ella, este puede hacerse, por ejemplo, percollando un constituyente MSG a través de la matriz porosa, siempre y cuando que el constituyente MSG tenga una superficie química disponible para ser unida a la superficie de la matriz porosa.

Para todos los fines de la presente invención, los constituyentes que están "substancialmente unidos" a la matriz porosa incluyen constituyentes que están unidos o bien directamente o bien indirectamente a la superficie de la matriz porosa. Los ejemplos de unión indirecta incluyen la unión de moléculas homólogas o heterólogas.

En otras circunstancias aún, puede ser deseable que una porción del material bioactivo esté libremente suspendido y otra porción del mismo material bioactivo esté unida. Una mezcla de este tipo de fases unidas y libremente suspendidas puede ser deseable cuando el material bioactivo juega papeles tanto en las fases previa como posterior de la musculoesquelotogénesis. Para los fines de la presente invención, cuando entre el 20% y el 80% de un material bioactivo está unido a la matriz porosa, se considera que está "parcialmente unido" a la matriz.

Si se desea un compuesto que tenga una matriz porosa y un material bioactivo parcialmente unido, este puede hacerse, por ejemplo, formulando una suspensión de baja viscosidad que tenga tanto el material bioactivo como un agente gelificante, exponiendo la suspensión a la matriz porosa, y fabricando a medida el grado de unión mediante el ajuste del tiempo de gelificación. El grado de unión en un sistema de este tipo dependerá de de la cantidad de tiempo transcurrido para que se forme el gel reductor de la movilidad. Por ejemplo, si se elige pegamento de fibrina como el gel, el tiempo para la formación del gel puede ajustarse fácilmente ajustando la cantidad de trombina usada

5 en la reacción de coagulación. Si se desea un material compuesto que tenga un grado mayor de material bioactivo unido, en ese caso, se usa una pequeña cantidad de trombina, alargándose, de esta forma, el tiempo de coagulación, típicamente hasta al menos 2,1 minutos. Si se desea un material compuesto que tenga un grado menor de material bioactivo unido, en ese caso, se usa una cantidad mayor de trombina, reduciéndose, de esta forma, el tiempo de coagulación, típicamente hasta no más de 1,9 minutos.

10 En consecuencia, en algunas realizaciones, más del 80% del componente MSPC se une a la matriz porosa. En otras realizaciones, más del 80% del componente MSPC de la fracción fisiológica que tiene proporciones de MSPC incrementadas se adhiere a la matriz porosa, estando el resto esencialmente libremente suspendida en los intersticios de la matriz. En otras realizaciones, entre el 20% y el 80% del componente MSPC de la fracción fisiológica que tiene proporciones de MSPC incrementadas está adherida a la matriz porosa, estando el resto esencialmente libremente suspendida en los intersticios de la matriz.

En consecuencia, en algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

- 15 a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm ,
 b) MSPCs presentes dentro de un primer material de coagulo pre-coagulado, estando presente el material dentro de los intersticios de los poros de la matriz.

20 Preferiblemente, este comprende además c) una fracción fisiológica del BMA que tiene las MSPCs sustancialmente eliminadas del mismo, estando presente la fracción dentro de los intersticios de la matriz porosa. En algunas realizaciones, la fracción comprende un coagulo formado *in situ*, en el que la formación *in situ* del coagulo se completa o bien en más de 1,9 minutos o bien en al menos 2,1 minutos. En algunas realizaciones, la fracción comprende un segundo material de coagulo pre-coagulado. En otras, el material compuesto comprende además c) una fracción fisiológica del BMA, estando presente la fracción dentro de los intersticios de la matriz porosa, en la que las MSPCs están presentes como un componente de la fracción.

25 En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entera que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

- 30 a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm ,
 b) un primer material de coagulo coagulado *in situ* presente dentro de los intersticios de los poros, y
 c) MSPCs presentes dentro del material de coagulo coagulado *in situ*,

en el que la coagulación del material de coagulo coagulado *in situ* se produce durante al menos 2,1 minutos.

35 Preferiblemente, el material compuesto comprende además d) una fracción fisiológica del BMA que tiene las MSPCs sustancialmente eliminadas del mismo. El material compuesto puede comprender también igualmente d) una fracción fisiológica del BMA, estando presente la fracción dentro del primer material de coagulo coagulado *in situ*, en el que las MSPCs están presentes como un componente de la fracción fisiológica.

En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

- 40 a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm ,
 b) un primer material de coagulo coagulado *in situ* presente dentro de los intersticios de los poros, y
 c) MSPCs presentes dentro del material de coagulo coagulado *in situ*,

en el que la gelación del material de gel *in situ* se produce durante no más de 1,9 minutos.

45 Preferiblemente, el material compuesto comprende además d) una fracción fisiológica del BMA que tiene las MSPCs sustancialmente eliminadas del mismo. Este puede comprender también igualmente d) una fracción fisiológica del BMA, estando la fracción presente dentro del primer material de coagulo coagulado *in situ*, en el que las MSPCs están presentes como un componente de la fracción.

En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

- 50 a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm ,

- b) un material de coagulo coagulado *in situ* presente dentro de los intersticios de los poros, y
- c) MSPCs predominantemente unidos a la superficie de la matriz,

en el que el material de coagulo comprende una fracción fisiológica del BMA que tiene las MSPCs substancialmente eliminadas del mismo.

- 5 En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

- a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm ,
- b) un material de coagulo pre-coagulado presente dentro de los intersticios de los poros, y

- 10 c) MSPCs presentes dentro de los intersticios de los poros,

en el que el material de coagulo comprende una fracción fisiológica de BMA que tiene las MSPCs substancialmente eliminadas del mismo.

- 15 Preferiblemente, las MSPCs están predominantemente unidas sobre la superficie de la matriz porosa. En algunas realizaciones, las MSPCs están predominantemente presentes dentro del material de coagulo pre-coagulado, o predominantemente presentes en un coagulo formado *in situ*, en el que la coagulación del material de coagulo coagulado *in situ* se produce durante al menos 2,1 minutos, o durante no más de 1,9 minutos.

En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entera que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

- 20 a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm ,
- b) un material de coagulo pre-coagulado presente dentro de los intersticios de los poros,
 - c) MSPCs predominantemente presentes dentro del material de coagulo, y
 - d) un suplemento de MSG predominantemente unido a la superficie de la matriz.

- 25 Preferiblemente, el material compuesto comprende además e) una fracción fisiológica del BMA que tiene las MSPCs eliminadas del mismo. Preferiblemente, el material compuesto comprende además f) un primer material de coagulo coagulado *in situ*, en el que la fracción fisiológica está presente dentro del primer material de coagulo coagulado *in situ*.

En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

- 30 a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm ,
- b) un material de coagulo coagulado *in situ* presente dentro de los intersticios de los poros,
 - c) MSPCs predominantemente presentes dentro del material de coagulo, y
 - d) un suplemento de MSG predominantemente unido a la superficie de la matriz.

- 35 Preferiblemente, el material compuesto comprende además e) una fracción fisiológica del BMA que tiene las MSPCs substancialmente eliminadas del mismo. En otras realizaciones, el material compuesto comprende además e) una fracción fisiológica del BMA, estando la fracción fisiológica está presente dentro del material de coagulo coagulado *in situ*, en el que las MSPCs están presentes como un componente de la fracción fisiológica.

- 40 En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

- a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm ,
- b) MSPCs predominantemente unidas a la superficie de la matriz, y
- c) suplemento de plasma rico en plaquetas PRP predominantemente unido a la superficie de la matriz.

Preferiblemente, el material compuesto comprende además d) una fracción fisiológica del BMA que tiene las MSPCs eliminadas del mismo.

En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

- 5
- a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm ,
 - b) un material de coagulo coagulado *in situ* presente dentro de los intersticios de los poros,
 - c) un suplemento de MSG predominantemente unido a la superficie de la matriz,
 - d) una fracción fisiológica del BMA que tiene las MSPCs eliminadas del mismo,

10 en el que las fracción fisiológica está presente dentro del material de coagulo coagulado *in situ*.

Preferiblemente, el material compuesto comprende además e) MSPCs, en el que las MSPCs están predominantemente unidas sobre la superficie de la matriz porosa. En otras realizaciones, el material compuesto comprende además e) MSPCs y f) un material de coagulo pre-coagulado, en el que las MSPCs están predominante presentes dentro del material de coagulo coagulado.

15 En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

- a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm ,
- b) un material de coagulo coagulado *in situ* presente dentro de los intersticios de los poros,
- 20 c) un suplemento de MSG predominantemente unido a la superficie de la matriz,
- d) una fracción fisiológica del BMA que tiene las MSPCs eliminadas del mismo,

en el que la fracción está presente dentro del material de coagulo coagulado *in situ*.

25 Preferiblemente, el material compuesto comprende además e) MSPCs, en el que las MSPCs están predominantemente unidas sobre la superficie de la matriz porosa. En otras realizaciones, el material compuesto comprende además e) MSPCs y f) un material de coagulo coagulado *in situ*, en el que las MSPCs están predominantemente presentes dentro del material de gel gelificado *in situ*. En otras realizaciones, el material compuesto comprende además e) una fracción fisiológica del BMA, estando presente la fracción dentro del material de coagulo pre-coagulado, en el que las MSPCs están presentes como un componente de la fracción.

30 En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

- a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm ,
- b) un material de coagulo pre-coagulado presente dentro de los intersticios de los poros,
- c) MSPCs predominantemente presentes dentro del material de coagulo,
- 35 d) un material de coagulo coagulado *in situ* presente dentro de los intersticios de los poros, y
- e) un suplemento de MSG presente dentro del material de coagulo coagulado *in situ*.

Preferiblemente, el material compuesto comprende además e) una fracción fisiológica del BMA que tiene las MSPCs eliminadas de la misma. Preferiblemente, el material compuesto comprende además f) un primer material de coagulo coagulado *in situ*, en el que la fracción está presente dentro del primer material de coagulo coagulado *in situ*.

40 En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

- a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm ,
- b) un primer material de coagulo coagulado *in situ* presente dentro de los intersticios de los poros,
- 45 c) un suplemento de MSG presente dentro del material de coagulo coagulado *in situ*, y

d) MSPCs presentes dentro del material de coagulo coagulado *in situ*,

en el que la coagulación del material de coagulo coagulado *in situ*.se produce en no más de 1,9 minutos.

Preferiblemente, el material compuesto comprende además e) una fracción fisiológica del BMA que tiene MSPCs eliminadas de la misma. En otras realizaciones, el material compuesto de la reivindicación C11 comprende además

5 e) una fracción fisiológica del BMA, estando presente la fracción dentro del material de coagulo coagulado *in situ*, en el que las MSPCs están presentes como un componente de la fracción.

En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

- 10
- a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 µm,
 - b) un primer material de coagulo coagulado *in situ* presente dentro de los intersticios de los poros,
 - c) un suplemento de MSG presente dentro del material de coagulo coagulado *in situ*, y
 - d) MSPCs presentes dentro del material de coagulo coagulado *in situ*,

en el que la gelación del material de coagulo coagulado *in situ*.se produce durante al menos 2,1 minutos.

15 Preferiblemente, el material compuesto de la reivindicación C21 comprende además e) una fracción fisiológica del BMA que tiene las MSPCs eliminadas de la misma. En algunas realizaciones, el material compuesto comprende además e) una fracción fisiológica del BMA, estando presente la fracción dentro del material de coagulo coagulado *in situ*, en el que las MSPCs están presentes como un componente de la fracción.

20 En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

- a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 µm,
- b) un material de coagulo pre-coagulado presente dentro de los intersticios de los poros,
- c) un suplemento de MSG presente dentro del material de coagulo coagulado *in situ*,
- 25 d) un material de coagulo pre-coagulado presente dentro de los intersticios de los poros, y
- e) una fracción fisiológica del BMA que tiene las MSPCs eliminadas de la misma,

en la que la fracción está presente dentro del material de coagulo pre-coagulado.

30 Preferiblemente, el material compuesto comprende además e) MSPCs, en las que las MSPCs están predominantemente unidas sobre la superficie de la matriz porosa. En otras realizaciones, el material compuesto comprende además e) MSPCs, en las que las MSPCs están presentes como un componente de la fracción. En otras realizaciones, el material compuesto comprende además e) MSPCs, en las que las MSPCs están presentes dentro del material de coagulo coagulado *in situ*.

35 En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

- a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 µm,
- b) un material de coagulo coagulado *in situ* presente dentro de los intersticios de los poros,
- c) un suplemento de MSG presente dentro del material de coagulo coagulado *in situ*, y
- d) una fracción fisiológica del BMA que tiene las MSPCs eliminadas de la misma,

40 en el que la fracción fisiológica está presente dentro del material de coagulo coagulado *in situ*.

En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

- a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 µm,
- 45 b) un material de coagulo coagulado *in situ* presente dentro de los intersticios de los poros,

c) un suplemento de MSG que comprende una fracción fisiológica del BMA, estando el suplemento de MSG presente dentro del material de coagulo coagulado *in situ*, y

e) MSPCs predominantemente unidas a la superficie de la matriz porosa.

5 En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm ,

b) un material de coagulo coagulado *in situ* presente dentro de los intersticios de los poros,

c) un suplemento de MSG libre de constituyentes obtenidos del BMA, y

10 d) MSPCs predominantemente unidas a la superficie de la matriz porosa.

En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm ,

15 b) un material de coagulo pre-coagulado presente dentro de los intersticios de los poros,

c) MSPCs predominantemente presentes dentro del material de coagulo, y

d) un suplemento de MSG presente dentro del material de coagulo.

20 Preferiblemente, el material compuesto comprende además e) una fracción fisiológica del BMA que tiene MSPCs eliminados de la misma. Preferiblemente, el material compuesto comprende además f) un primer material de coagulo coagulado *in situ*, en el que la fracción está presente dentro del primer material gelificado *in situ*. En otras realizaciones, el material compuesto comprende además e) una fracción fisiológica del BMA, estando presente la fracción fisiológica dentro del material de coagulo pre-coagulado, en el que las MSPCs están presentes como un componente de la fracción.

25 En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm ,

b) un material de coagulo pre-coagulado presente dentro de los intersticios de los poros,

c) un suplemento de MSG presente dentro del material de coagulo,

30 d) un material de coagulo coagulado *in situ* presente dentro de los intersticios de los poros, y

f) MSPCs presentes dentro del material de coagulo coagulado *in situ*,

35 Preferiblemente, el material compuesto comprende además f) una fracción fisiológica del BMA que tiene MSPCs eliminados de la misma. Preferiblemente, la fracción está presente dentro del primer material de coagulo coagulado *in situ*. En algunas realizaciones, el material compuesto comprende además f) una fracción fisiológica del BMA, estando presente la fracción fisiológica dentro del material de coagulo pro-coagulado, en el que las MSPCs están presentes como un componente de la fracción.

En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea MBA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

40 a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm ,

b) un material de coagulo pre-coagulado presente dentro de los intersticios de los poros,

c) un suplemento de MSG presente dentro del material de coagulo,

d) un material de coagulo coagulado *in situ* presente dentro de los intersticios de los poros,

45 e) una fracción fisiológica del BMA que tiene las MSPCs eliminados de la misma y presentes dentro del material de coagulo coagulado *in situ*, y

f) MSPCs predominantemente unidas a la superficie de la matriz.

En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea MBA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

- 5
- a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm ,
 - b) un material de coagulo pre-coagulado presente dentro de los intersticios de los poros,
 - c) un suplemento de MSG que comprende una fracción fisiológica del BMA, estando el suplemento de MSG presente dentro del material de coagulo pre-coagulado, y
 - d) MSPCs predominantemente unidas a la superficie de la matriz porosa.

10 En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea MBA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

- a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm ,
- b) un material de coagulo pre-coagulado presente dentro de los intersticios de los poros,
- 15 c) un suplemento de MSG predominantemente unido a la superficie de la matriz,
- d) una fracción fisiológica del BMA que tiene las MSPCs eliminadas de la misma,

en la que la fracción está presente dentro del material de coagulo coagulado *in situ*.

En algunas realizaciones, se proporciona un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea MBA entero que tiene una proporción nativa de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs, que comprende:

- 20
- a) una matriz porosa que tiene un tamaño de poro promedio de al menos 20 μm ,
 - b) un material de coagulo pre-coagulado presente dentro de los intersticios de los poros,
 - c) un suplemento de MSG presente dentro del material de coagulo pre-coagulado, y
 - d) una fracción fisiológica del BMA que tiene las MSPCs eliminadas de la misma,

25 en la que la fracción está presente dentro del material de coagulo pre-coagulado.

Ejemplos

A continuación, se presentan seis procedimientos a modo de ejemplo para proporcionar un compuesto de la presente invención. Cada uno de estos ejemplos usa como un material de partida una suspensión que comprende un recubrimiento de linfa cuajada entera. Sin embargo, pueden usarse otras suspensiones ricas en NBMC, tal como cualquier suspensión que tenga células de médula ósea nucleadas NBMCs presentes en una población de células al menos 3 veces mayor que su proporción nativa.

Ejemplo 1

En esta realización, las MSPCs están selectivamente unidas a la matriz porosa, mientras que una porción de los constituyentes no adherentes del BMA (es decir, el efluente) están suspendidos dentro de los intersticios de la matriz.

Una suspensión de recubrimiento de linfa cuajada entera concentrada se pasó o percoló sobre un recipiente que contenía la matriz porosa con el fin de retener las células que se adhieren a la matriz porosa. A continuación, las células no adherentes eluidas de la re-suspensión (por ejemplo, HCs, POs y RCs) pueden recogerse y volverse a percolar sobre el recipiente, o bien una porción de las mismas puede agregarse a la mezcla de células adherentes-matriz porosa, con el fin de mantenerlas en suspensión. Los constituyentes no unidos de la suspensión pueden ser atrapados dentro de la suspensión mediante la adición a la mezcla de agentes gelificantes tal como fibrinógeno y activadores gelificantes tal como trombina.

El material compuesto resultante contiene células MSG unidas (tales como MSPCs enriquecidas), plaquetas unidas, células MSG libremente suspendidas (tal como ECs), y constituyentes de soporte libremente suspendidos (tal como fibrinógeno).

De acuerdo con ello, se proporciona un procedimiento que comprende las etapas de:

a) proporcionar una suspensión que comprende células de médula ósea nucleadas NBMCs presentes en una población de células al menos 3 veces mayor que su proporción nativa (preferiblemente substancialmente libre de glóbulos rojos y plasma), y opcionalmente fibrinógeno, y opcionalmente un componente BMA entero,

5 b) combinar la suspensión con una matriz porosa, y, opcionalmente,

c) agregar un activador de coagulación a la suspensión para formar un coagulo dentro de los intersticios de la matriz porosa.

En otras realizaciones, se proporciona un procedimiento que comprende las etapas de:

10 a) proporcionar una suspensión que comprende una suspensión que comprende células de médula ósea nucleadas NBMCs presentes en una población de células al menos 3 veces mayor que su proporción nativa, comprendiendo las NBMCs MSPCs y células no adherentes (y opcionalmente fibrinógeno, y opcionalmente un componente BMA entero),

b) pasar la suspensión a través de una matriz porosa para producir un material compuesto que comprende:

i) una matriz porosa, y

15 ii) MSPCs unidas a la matriz porosa, y

iii) un efluente que comprende las células no adherentes,

c) suspender el efluente dentro de la matriz porosa, de manera que el material compuesto comprenda además:

iv) células no adherentes libremente suspendidas, y, opcionalmente,

20 d) agregar un activador de coagulación a la suspensión para formar un coagulo.

Ejemplo 2

En esta realización, las MSPCs concentradas se suspendieron libremente dentro de los intersticios de la matriz porosa.

25 Una suspensión de recubrimiento de linfa cuajada entera concentrada se combinó con un material de plasma rico en plaquetas y se introdujo en un recipiente de reacción que permite la coagulación de la suspensión de células con un plasma ricos en plaquetas.

De acuerdo con ello, se proporciona un procedimiento que comprende las etapas de:

30 a) proporcionar una suspensión que comprende células de médula ósea nucleadas NBMCs presentes en una población de células al menos 2 veces mayor que su proporción nativa (preferiblemente substancialmente libre de glóbulos rojos y plasma), comprendiendo las NBMCs MSPCs,

b) mezclar la suspensión con una composición que comprende una cantidad eficaz de fibrinógeno para formar un coagulo capaz de suspender libremente las NBMCs (comprendiendo la composición preferiblemente además factores de crecimiento (preferiblemente, PRP), para producir una mezcla.

35 La mezcla de célula y plasma rico en plaquetas de esta realización puede igualmente combinarse con una matriz porosa en un recipiente de reacción. Esta combinación tendría el efecto de atrapar las MSPCs enriquecidas en la suspensión coagulada, pero no necesariamente en una forma adherente a la superficie del substrato poroso. De acuerdo con ello, dependiendo del tiempo de coagulación, el material compuesto podría tener unos constituyentes MSPC suspendidos o parcialmente unidos.

En consecuencia, preferiblemente, este procedimiento comprende además las etapas de:

40 c) combinar la mezcla con una matriz porosa para producir un material compuesto que comprende:

i) una matriz porosa,

ii) un material de coagulo que ocupa los intersticios de la matriz porosa, y

iii) MSPCs libremente suspendidas dentro del material de coagulo.

En consecuencia, se proporciona un material compuesto que comprende:

45 i) una matriz porosa,

- ii) un material de coagulo que ocupa los intersticios de la matriz porosa, y
- iii) MSPCs libremente suspendidas dentro del material de coagulo.

Igualmente de manera preferible, este procedimiento comprende además las etapas de:

- c) combinar la mezcla con una matriz porosa para producir un material compuesto que comprende:
 - 5 i) una matriz porosa,
 - ii) un material de coagulo que ocupa los intersticios de la matriz porosa, y
 - iii) MSPCs parcialmente unidas a la matriz porosa.

Ejemplo 3

10 En esta realización, las MSPCs están unidas a la matriz porosa, en tanto que los suplementos están libremente suspendidos dentro de un coagulo dentro de los intersticios de la matriz porosa.

15 La suspensión de recubrimiento de linfa cuajada entera concentrada se pasó o percoló sobre un recipiente que contenía la matriz porosa de una manera tal que permite la adherencia de las MSPCs a la matriz porosa, y la población no adherente de células y los componentes solubles se combinaron posteriormente con PRP. A continuación, esta combinación se combinó con la mezcla substrato poroso-NBMC y se agregó un activador de coagulación para crear un coagulo, el cual contiene tanto la mezcla de substrato-NBMC como los agentes bioactivos obtenidos a partir de las plaquetas.

De acuerdo con ello, se proporciona un procedimiento que comprende las etapas de:

- 20 a) proporcionar una suspensión que comprende una suspensión que comprende células de médula ósea nucleadas NBMCs presentes en una población de células al menos 3 veces mayor que su proporción nativa, comprendiendo las NBMCs MSPCs y células no adherentes, y opcionalmente fibrinógeno, y opcionalmente un componente BMA entero),
- b) pasar la suspensión a través de una matriz porosa, para producir un primer material compuesto que comprende:
 - 25 i) una matriz porosa, y
 - ii) MSPCs unidas a la matriz porosa, y
 - iii) un efluente que comprende las células no adherentes,
- c) combinar el efluente con una composición que comprende una solución que contiene fibrinógeno (y preferiblemente plaquetas), para producir una mezcla.

Preferiblemente, este procedimiento comprende además las etapas de:

- 30 d) suspender la mezcla dentro de los intersticios de la matriz porosa del primer material compuesto, y, opcionalmente,
- e) agregar un activador de coagulación a la mezcla para formar un segundo material compuesto que comprende:
 - 35 i) una matriz porosa, y
 - ii) MSPCs unidas a la matriz porosa,
 - iii) un coagulo de fibrina dentro de los intersticios de la matriz porosa, (y opcionalmente)
 - iv) factores de crecimiento libremente suspendidos dentro del coagulo de fibrina.

De acuerdo con ello, se proporciona un segundo material compuesto que comprende:

- 40 i) una matriz porosa, y
- ii) MSPCs unidas a la matriz porosa,
- iii) un coagulo de fibrina dentro de los intersticios de la matriz porosa, (y opcionalmente)
- iv) factores de crecimiento libremente suspendidos dentro del coagulo de fibrina.

Ejemplo 4

El componente de recubrimiento de linfa cuajada entera concentrada se pasó sobre la matriz porosa. A continuación, el material compuesto de matriz porosa-MSPC adherido se combinó con una parte alícuota del BMA entero o una fracción fisiológica del mismo (tal como PPP o PRP) con el fin de atrapar la composición substrato-NMBC adherida en un coágulo parcial conteniendo los elementos deseables de aspirado de médula ósea entera sin fraccionar, fresca. La fracción no adherente de las NBMCs procedente del aislado de médula ósea original puede agregarse igualmente a la composición de médula ósea fresca-substrato poroso-NBMC.

De acuerdo con ello, se proporciona un procedimiento que comprende las etapas de:

- 10 a) proporcionar una suspensión que comprende células de médula ósea nucleadas NBMCs presentes en una población de células al menos 3 veces mayor que su proporción nativa, comprendiendo las NBMCs MSPCs y células no adherentes, (preferiblemente libres de glóbulos rojos y plasma), y opcionalmente fibrinógeno,
- b) pasar la suspensión a través de una matriz porosa para producir (i) un primer material compuesto que comprende la matriz y células NMBC adheridas, y (ii) un efluente que comprende células no adherentes:
- 15 c) agregar BMA entero al primer material compuesto para producir un segundo material compuesto, y opcionalmente
- d) agregar el efluente al segundo material compuesto.

Preferiblemente, este procedimiento comprende además las etapas de:

- 20 e) agregar un activador de coagulación al segundo material compuesto para formar un coágulo.

Ejemplo 5

En Muschler II, se describe un procedimiento que comprende una primera etapa de pasar el BMA entero a través de una matriz porosa con el fin de retener y concentrar las MSPCs sobre la misma, y una segunda etapa de mezclado mecánico de la combinación de matriz porosa-MSPC con médula ósea coagulada. Sin embargo, se ha encontrado que la etapa de mezclado mecánico afecta negativamente la integridad de la combinación de matriz porosa-MSPC.

De acuerdo con ello, se proporciona a continuación un procedimiento que comprende las etapas de:

- a) mezclar una matriz porosa con partículas coaguladas obtenidas del BMA o de sangre para producir una mezcla, y
- b) pasar el BMA a través de la mezcla.

El material compuesto resultante comprende:

- 30 a) una matriz porosa,
- b) una pluralidad de partículas de coágulo, y
- c) MSPCs unidas tanto a la superficie de la matriz porosa como a las superficies de las partículas de coágulo.

Dado que la matriz porosa y las partículas de coágulo están pre-mezcladas, las MSPCs permanecen unidas a la matriz y las superficies de las partículas de coágulo.

La Tabla III más adelante, proporciona un resumen de la disposición de los diferentes elementos bioactivos del material compuesto de la presente invención producidos mediante los cinco ejemplos directamente anteriores.

Ejemplo 6

El objetivo de este ejemplo profético es generar un material para injerto obtenido de células de médula ósea que es superior a las características de formación ósea *in vivo* de aspirado de médula ósea fresca.

En primer lugar, se obtuvo una muestra de 20 ml de médula ósea humana mediante técnicas de aspiración convencionales. En segundo lugar el aspirado se dividió en dos porciones. La Porción #1 contenía 16 ml de aspirado de médula ósea y se usó para generar un recubrimiento de linfa cuajada (es decir, la porción NBMC aislada del aspirado). La Porción #2 contenía 4 ml de aspirado e inicialmente se mantuvo sin fraccionar. En tercer lugar, se generó un recubrimiento de linfa cuajada mediante un medio de gradiente de densidad apropiado, tal como centrifugación. Después del aislamiento de las células de recubrimiento de linfa cuajada de la Porción #1 (por ejemplo, mediante separación de las fracciones no elegidas mediante pipeta), se agregó solución salina a la porción de recubrimiento de linfa cuajada para re-suspender el recubrimiento de linfa cuajada y formar un volumen de 16 ml. Esta re-

5 suspensión debería contener una proporción nativa de NBMC. En cuarto lugar, el recubrimiento de linfa cuajada re-suspendido y las suspensiones de BMA enteros se mezclaron de acuerdo con los volúmenes listados en la Tabla I, y las mezclas se centrifugaron para producir fracciones de la mezcla recubrimiento de linfa cuajada/célula de médula ósea entera. A continuación, el sobrenadante de esta mezcla centrifugada se eliminó para obtener una fracción
 10 concentrada de la mezcla de recubrimiento de linfa cuajada/célula de médula ósea entera. En quinto lugar, el gránulo se re-suspendió o bien con solución salina o bien con PRP de acuerdo con la Tabla I. Dando por supuesto que la eliminación de las porciones de plasma y RBC tiene como efecto una potenciación de 19X en la proporción de recubrimiento de linfa cuajada, esta re-suspensión debería contener proporciones concentradas de NBMC (es decir, en el entorno de 7-16 veces las proporciones nativas de las NBMCs). En sexto lugar, las formulaciones de gránulo re-suspendidas se cargaron dentro de vehículos de suministro, y se aplicó un vacío al vehículo cargado para extraer el
 15 aire atrapado dentro del vehículo. En séptimo lugar, en los vehículos que contenían PRP, se agregó trombina a los vehículos para formar coágulos. En octavo lugar, se implantaron quirúrgicamente los implantes.

TABLA III

Número de ensayo	Parte alícuota de recubrimiento de linfa cuajada (ml)	Parte alícuota del BMA entero (ml)	Parte alícuota de solución salina/PRP (ml)	Concentración de recubrimiento de linfa cuajada
1	4	0	1	~16X nativa
2	3	0	1	~15X nativa
3	2	0	1	~13X nativa
4	1	0	1	~10X nativa
5	3	1	1	~12X nativa
6	2	1	1	~10X nativa
7	1	1	1	~07X nativa
8	0	1	1	~0,5X nativa
9	0	0	1	0

15 En algunas realizaciones, se proporciona un sistema preferido de desechables para uso en combinación con la combinación deseada de componentes bioactivos descritos anteriormente. Un recipiente que contiene una primera abertura en un primer extremo con un diámetro suficiente para permitir el movimiento de la combinación de fluidos a través del mismo, y, en un segundo extremo, una válvula normalmente cerrada que se puede abrir para aliviar la presión de dentro del recipiente cuando un componente fluido se mueve a través del recipiente y la porosidad de la matriz contenida dentro de él. Esta válvula puede comprender una llave de tres vías convencional. Como alternativa,
 20 puede usarse un filtro que tenga una porosidad suficientemente fina como para permitir el paso del aire pero no del material celular (por ejemplo, un filtro de 0,22 micrómetros), en lugar de la válvula como un modo de mantenimiento de un medioambiente estéril dentro del recipiente. Además, el uso del filtro asegura que se evita el flujo de las células a través del mismo. De acuerdo con ello, esta realización permite la introducción de una solución dentro del recipiente que contiene el sustrato poroso y alivia la presión atmosférica de dentro del recipiente al tiempo que mantiene la esterilidad.

25 El último producto comprende una mezcla de sustrato poroso-NBMC, el cual puede estar opcionalmente embebido dentro de un coágulo de médula ósea o gel de plaquetas. A continuación, este material para injerto puede extraerse a partir del recipiente e implantarse directamente dentro del sitio que requiere aumento de tejido óseo.

30

REIVINDICACIONES

1. Un material compuesto para injerto musculoesqueletogénico MSG hecho a partir de aspirado de médula ósea BMA entero autólogo que tiene proporciones nativas de células progenitoras musculoesqueléticas MSPCs y un constituyente de soporte que comprende una primera fracción del BMA que comprende:

- 5 i) MSPCs presentes en la primera fracción en una proporción mayor que su proporción nativa en el BMA entero, y
- ii) una proporción reducida del constituyente soporte, y

10 **caracterizado porque** el material compuesto para injerto incluye una segunda fracción del BMA que es una fracción fisiológica tal que puede obtenerse mediante centrifugación del BMA entero sin tratamiento adicional, para separar los diversos constituyentes presentes en **dicha** fracción, en el cual el constituyente de soporte está presente en la segunda fracción en una proporción mayor que su proporción nativa en el BMA entero,

en el cual la concentración de al menos uno de los componentes nativos de la primera y segunda fracciones del BMA es menor que la del BMA entero.

15 2. Un material compuesto para injerto tal como se reivindica en la reivindicación 1, en el cual la primera fracción comprende una fracción fisiológica del BMA tal como puede obtenerse mediante centrifugación del BMA entero sin tratamiento adicional, para separar los diversos constituyentes presentes en dicha fracción.

3. Un material compuesto para injerto tal como se reivindica en la reivindicación 1, en el cual la primera fracción comprende una matriz porosa y las MSPCs están adheridas a la matriz porosa.