

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 615**

51 Int. Cl.:

A61L 27/22 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2009** **E 09716106 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016** **EP 2259804**

54 Título: **Método para producir una composición ósea implantable**

30 Prioridad:

26.02.2008 HU 0800134

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

17.10.2016

73 Titular/es:

LACERTA TECHNOLOGIES INC. (100.0%)
176 Mine Lake Court, Suite 100
Raleigh, NC 27615, US

72 Inventor/es:

LACZA, ZSOMBOR y
WESZL, MIKLÓS

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 586 615 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para producir una composición ósea implantable

5 Campo de la invención

La invención se refiere a métodos para producir composiciones óseas implantables adecuadas para unir células madre a las mismas, caracterizados porque las partículas óseas se ponen en contacto con una solución que comprende albúmina. Dichas partículas óseas pueden ser partículas óseas mineralizadas y/o liofilizadas de origen animal o humano. En una realización preferente la solución que comprende albúmina no inmunógena se liofiliza sobre dichas partículas óseas. La invención se refiere también a composiciones óseas adecuadas para su uso en implantación de injerto que pueden obtenerse mediante dichos métodos.

Antecedentes de la invención

Los injertos óseos son unos de los tejidos transplantados más comunes. En todo el mundo se realizan anualmente más de 2,2 millones de procedimientos de injerto óseo para reparar defectos óseos en ortopedia, neurocirugía y odontología (9, 10, 12, 13). Los autoinjertos y los aloinjertos óseos se usan convencionalmente para reemplazar los defectos óseos.

Los autoinjertos son la referencia para rellenar los defectos óseos, debido a que proporcionan la incorporación más rápida sin complicaciones inmunológicas (15, 17). Pocos osteoblastos maduros sobreviven al trasplante, pero el número de células precursoras que permanecen vivas es adecuado. El potencial osteogénico se deriva de estas células precursoras. Es bien conocido en la técnica que existen graves limitaciones en el uso de autoinjertos, incluyendo estas un tiempo de operación prolongado, una biodisponibilidad limitada y una morbilidad significativa relacionada con la pérdida de sangre, complicaciones de heridas, pérdida sensorial local y, lo más importante, un dolor crónico (14, 16, 18, 19).

Los aloinjertos como enfoque alternativo ofrecen características similares con la exclusión de células osteogénicas (9, 10). No existe una norma estándar relacionada con la preparación de aloinjertos óseos y, así, se divulgan varios tipos de los mismos en publicaciones, tales como aloinjertos óseos frescos, frescos congelados, liofilizados o desmineralizados (9, 10). Los aloinjertos poseen propiedades osteoconductoras y osteoinductoras, pero estas últimas pueden no reconocerse a menos que el injerto se use en una forma morselizada o desmineralizada. Las complicaciones asociadas con aloinjertos incluyen fracturas, falta de unión, complicaciones inmunológicas e infección.

Urist y otros (3, 20, 21, 22, 23, 24) demostraron el efecto de la matriz ósea desmineralizada o la proteína morfogenética ósea en la inducción ósea. También demostraron que los componentes activos de la matriz ósea desmineralizada son las proteínas de bajo peso molecular (LMWP). Bolander y col. (1, 2) recubrieron el injerto óseo desmineralizado con proteínas de bajo peso molecular adicionales. Este método podría potenciar el potencial osteoinductor del injerto. Actualmente, el aloinjerto desmineralizado se considera aún el sustituto alogénico más apropiado para reemplazar defectos óseos debido a que posee capacidad osteoinductora y osteoconductoras; no obstante, sus propiedades mecánicas no son adecuadas (22). Además, la fabricación de matriz ósea desmineralizada con propiedad osteoinductora alta constante representa aún un desafío. Los aloinjertos óseos mineralizados o no desmineralizados, por ejemplo liofilizados, frescos o frescos congelados poseen buenas propiedades mecánicas, pero su capacidad osteoinductora es muy pobre en comparación con una matriz ósea desmineralizada. Rust y col. (4) demostraron que las células madre mesenquimales (MSC) podrían diferenciarse en osteoblastos en la superficie de un aloinjerto óseo mineralizado, que contiene las proteínas originales del hueso normal. Encontraron que las MSC podrían no diferenciarse en la superficie de aloinjertos tratados térmicamente. Esta observación muestra que ciertas proteínas óseas particulares pueden tener un papel clave en la adherencia y el compromiso de MSC. Booland y col. (5) probaron que las células sobreviven a la fuerza del impacto sobre el aloinjerto mineralizado, que puede ser durante el uso clínico. Lewandrowski y col. (6) recubrieron injertos óseos corticales con biopolímeros para fomentar la adherencia de células óseas derivadas del periostio a la superficie del injerto. El documento WO 01/82993 (26) divulga un implante óseo reticulado osteogénico.

Se han desarrollado actualmente nuevos biomateriales combinados con células osteogénicas como una alternativa a los injertos óseos (11). Los biomateriales se crean para construir un armazón tridimensional al que pueden adherirse células, proliferar y diferenciarse en células osteogénicas funcionales (7, 9). Ore y col. (8) demostraron la diferenciación potenciada de las células derivadas de la médula ósea humana sobre una apatita carbonatada al 70 %, que tenía una composición similar a minerales óseos.

Los presentes inventores encontraron previamente que el recubrimiento de huesos esponjosos con proteínas que se sabe que ayudan a la adherencia células no había ayudado siempre a la adherencia de células sobre el hueso. Aunque el recubrimiento con fibronectina aumentó el número de células unidas, el recubrimiento con colágeno no ayudó a aumentar el número de células unidas. Además, ninguno de los mismos fomentó la proliferación de las células unidas (<http://www.tdk.sote.hu/ortopedia.pdf>).

Un injerto óptimo debería tener todas las ventajas de los aloinjertos y los autoinjertos, incluidas la capacidad osteoinductora, buenas propiedades mecánicas y compatibilidad inmunológica con el huésped (10, 11). Además, preferentemente, está fácilmente disponible y no provoca una carga operativa al recogerlo, como los autoinjertos.

Nuestro objetivo era desarrollar un método de recubrimiento fiable y seguro que asegure la unión de células madre a la superficie de aloinjertos óseos mineralizados. En otras palabras, el objetivo de la presente invención era desarrollar nuevos métodos que proporcionen injertos óseos que sean compatibles con el huésped y no provoquen ninguna complicación inmunológica, mientras que al mismo tiempo estén fácilmente disponibles.

Sumario de la invención

Los presentes inventores resolvieron el problema anterior según la invención recubriendo aloinjertos óseos de origen humano o animal con albúmina de suero humano liofilizado. La presente invención proporciona condiciones excelentes, no solo para la unión, sino también para la proliferación de células madre, por ejemplo células madre mesenquimales (MSC).

La presente invención se refiere a un método para producir composiciones óseas implantables adecuadas para unir células madre a las mismas, caracterizado porque las partículas óseas se ponen en contacto con una solución proteica que comprende albúmina. Aunque la concentración de albúmina en dicha solución no es un factor estrictamente limitante, preferentemente dicha solución que comprende albúmina es una solución de albúmina que comprende del 1 al 50 % de albúmina, preferentemente del 3 al 30 % de albúmina, más preferentemente del 5 al 25 % de albúmina y del modo más preferente de aproximadamente el 10 % de albúmina, siendo los porcentajes porcentajes peso/peso. Preferentemente, dicha albúmina es albúmina humana y más preferentemente albúmina humana de origen sérico. Según una realización preferente de la invención, dichas partículas óseas son partículas óseas liofilizadas y/o partículas óseas mineralizadas que están sustancialmente limpias de componentes orgánicos.

Dicha solución que comprende albúmina se seca sobre dicha composición ósea mineralizada por liofilización. Dichas partículas óseas pueden ser de origen humano o animal.

Ventajosamente, en el método anterior alguno/s de los ingredientes de dicha solución que comprende albúmina es/son de origen humano o es/son humanizado(s) inmunológicamente y/o dicha solución que comprende albúmina se obtiene de un paciente con necesidad de una implantación ósea. Preferentemente, dicha solución que comprende albúmina comprende el suero de dicho paciente o cualquier fracción de dicho suero.

Según otra realización preferente de la presente invención, dicha solución que comprende albúmina comprende preferentemente albúmina recombinante, comprendiendo dicha solución que comprende albúmina además opcionalmente fibronectina o colágeno o una combinación de los mismos.

Ventajosamente, dichas soluciones proteicas están exentas de componentes que sean potencialmente inmunógenos para pacientes para los que se ha diseñado dicha composición ósea según la invención. Los métodos para analizar la inmunogenicidad potencial de una solución proteica son bien conocidos en la técnica.

La invención se refiere a un método en el que los métodos anteriores comprenden además la etapa de unir células capaces de potenciar la formación ósea a la superficie de dichas partículas óseas.

En una realización preferente de la presente invención en los métodos anteriores dichas células capaces de potenciar la formación ósea se obtienen de un paciente con necesidad de una implantación ósea, siendo dichas células preferentemente células madre mesenquimales (MSC).

La invención se refiere también a una composición ósea adecuada para su uso en implantación de injertos que puede obtenerse mediante los métodos de la invención anteriores.

La invención también se refiere, además, al uso de dichas composiciones en tratamientos.

Un injerto preparado a partir de una composición ósea según la presente invención combina las propiedades beneficiosas de aloinjertos y de autoinjertos. Se usó aloinjerto óseo mineralizado humano como almacén. Un experto en la técnica apreciará que en vez de aloinjertos óseos mineralizados humanos podrían usarse de forma igualmente satisfactoria aloinjertos mineralizados de origen animal. El aloinjerto humano se limpió de las proteínas originales del hueso. De este modo, el almacén proporciona una estabilidad mecánica buena al injerto; además, dado que está mineralizado, reduce la posibilidad de cualquier complicación inmunológica. La superficie del almacén se recubre con proteínas de origen humano, como fibronectina o albúmina, para suministrar la adherencia al sembrado de MSC humanas y proliferación. Sorprendentemente se encontró que el recubrimiento con una solución sérica (suero de bovino fetal, FCS) fomentaba la adherencia de MSC en una medida incluso superior. El recubrimiento es necesario para la viabilidad celular sobre el aloinjerto de la presente invención y la liofilización de dichas proteínas o soluciones proteicas sobre el hueso potenció el número de células que se unieron y fomentó

también su proliferación. En una realización preferente de la presente invención, el injerto consiste en materiales de origen humano, como albúmina autóloga y MSC. Esta propiedad podría permitir que el injerto de la invención se incorpore rápidamente en el huésped sin complicaciones inmunológicas y podría apoyar una recuperación temprana de los pacientes.

5 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra la fluorescencia medida, provocada por las células adheridas a la superficie de aloinjertos sin tratar 3, 10 y 18 días después de la adición de MSC.

10 La figura 2A muestra la fluorescencia medida 3, 10 y 18 días después de la adición de MSC, provocada por las células adheridas sobre la superficie de aloinjertos sobre los que se liofilizó colágeno de tipo I, mientras que la figura 2B muestra la fluorescencia medida 3, 10 y 18 días después de la adición de MSC, provocada por las células adheridas sobre la superficie de aloinjertos que se sumergieron en una solución de colágeno de tipo I.

15 La figura 3A muestra la fluorescencia medida 3, 10 y 18 días después de la adición de MSC, provocada por las células adheridas sobre la superficie de aloinjertos sobre los que se liofilizó fibronectina, mientras que la figura 3B muestra la fluorescencia medida 3, 10 y 18 días después de la adición de MSC, provocada por las células adheridas sobre la superficie de aloinjertos que se sumergieron en una solución de fibronectina.

20 La figura 4A muestra la fluorescencia medida 3, 10 y 18 días después de la adición de MSC, provocada por las células adheridas sobre la superficie de aloinjertos sobre los que se liofilizó colágeno de tipo I y fibronectina, mientras que la figura 4B muestra la fluorescencia medida 3, 10 y 18 días después de la adición de MSC, provocada por las células adheridas sobre la superficie de aloinjertos que se sumergieron en una solución de colágeno de tipo I y fibronectina.

25 La figura 5 muestra la comparación de la fluorescencia medida, provocada por los materiales de recubrimiento exentos de albúmina.

30 La figura 6A muestra la fluorescencia medida 3, 10 y 18 días después de la adición de MSC, provocada por las células adheridas sobre la superficie de aloinjertos sobre los que se liofilizó albúmina humana, mientras que la figura 6B muestra la fluorescencia medida 3, 10 y 18 días después de la adición de MSC, provocada por las células adheridas sobre la superficie de aloinjertos que se sumergieron en una solución de albúmina humana.

35 La figura 7A muestra la fluorescencia medida 3, 10 y 18 días después de la adición de MSC, provocada por las células adheridas sobre la superficie de aloinjertos sobre los que se liofilizó albúmina humana y fibronectina, mientras que la figura 7B muestra la fluorescencia medida 3, 10 y 18 días después de la adición de MSC, provocada por las células adheridas sobre la superficie de aloinjertos que se sumergieron en una solución de albúmina humana y fibronectina.

40 La figura 8A muestra la fluorescencia medida 3, 10 y 18 días después de la adición de MSC, provocada por las células adheridas sobre la superficie de aloinjertos sobre los que se liofilizó suero de bovino fetal, mientras que la figura 8B muestra la fluorescencia medida 3, 10 y 18 días después de la adición de MSC, provocada por las células adheridas sobre la superficie de aloinjertos que se sumergieron en una solución de suero de bovino fetal.

45 La figura 9 muestra la comparación de la fluorescencia medida, provocada por los materiales de recubrimiento que contienen albúmina.

50 La figura 10A muestra la superficie de un aloinjerto óseo de rata recubierto con albúmina humana liofilizada cuya dosis no contiene células madre adheridas (actúa como control), mientras que la figura 10B muestra células madre derivadas de médula ósea de rata viables adheridas sobre la superficie de aloinjerto óseo de rata recubierto con albúmina humana liofilizada.

55 La figura 11A-B muestra instantáneas micro-CT de los espaciadores de PMMA insertados entre los extremos del hueso diseccionado, mientras que la figura 11C-D muestra que el aloinjerto de hueso humano liofilizado no recubierto no facilitó una nueva formación de tejido óseo, por lo tanto no pudo integrarse en el sitio del defecto óseo.

60 La figura 12A-B muestra que un injerto óseo humano recubierto con albúmina humana liofilizada promovió la formación de hueso nuevo en el hueco de la osteotomía después de 4 semanas de la implantación.

Descripción detallada de la invención

La expresión "hueso mineralizado" en el contexto de la presente invención significa que el hueso está en su forma nativa en el sentido de que contiene todos sus componentes minerales y opcionalmente puede contener sus componentes orgánicos también. En otras palabras, la expresión "hueso mineralizado" se usa para distinguirlo de huesos desmineralizados en el sentido en que el hueso mineralizado es un hueso no desmineralizado.

Según el significado que se usa en el presente documento, una composición ósea se dice que está "sustancialmente limpia de componentes orgánicos", por ejemplo, si se preparó mediante el método descrito en los ejemplos en la sección "Preparación de aloinjerto mineralizado liofilizado" o mediante cualquier otro método de mineralización ósea que comprenda una etapa de lavado realizada en un disolvente orgánico y subsiguiente digestión en un compuesto ácido. Un experto en la técnica entenderá que existen numerosas vías para producir una composición ósea mineralizada equivalente.

Se observó, sorprendentemente, que el recubrimiento de aloinjertos con diferentes proteínas potenciaba el número de MSC unidas a la superficie del injerto y también facilitaba la proliferación de células. Los aloinjertos usados como armazón se limpiaron de casi todas las proteínas alogénicas del hueso para reducir la posibilidad de cualesquiera complicaciones inmunológicas en el huésped. Las proteínas eliminadas, como las proteínas de bajo peso molecular (LMWP) o la proteína morfogenética ósea (BMP) son importantes para la adherencia y la proliferación de células óseas y osteoprogenitoras (1, 2, 22, 24). Dado que estas proteínas se han eliminado, las MSC no pudieron unirse a la superficie del aloinjerto mismo, que consistían principalmente en compuestos inorgánicos, tales como hidróxido de apatita. Los presentes inventores han hallado que si las proteínas eliminadas se reemplazan por otras, por ejemplo por fibronectina, albúmina o colágeno, preferentemente y del modo más sorprendente con albúmina, estas proteínas facilitan la adherencia de células a la superficie. Además, esta adherencia facilitada también se observó usando una solución sérica. Los datos muestran sorprendentemente que no solo las LMWP o las BMP pueden fomentar exclusivamente la unión de células progenitoras óseas, sino de otros tipos de células también. Se observó proliferación sobre los injertos recubiertos, excepto en aquellos que se recubrieron con fibronectina o colágeno de tipo I solamente. No obstante, la combinación de fibronectina con albúmina y la combinación de colágeno de tipo I con fibronectina proporcionan buenas condiciones para la proliferación de MSC. La mejor proliferación se observó cuando se usó FCS como material de recubrimiento. Se observó proliferación a lo largo de todo el periodo de investigación sobre los injertos que se recubrieron con albúmina sola o en combinación con fibronectina y en los que contenían suero de bovino fetal (FCS).

Nuestros resultados muestran que la albúmina, la fibronectina y el suero mismo podrían ser el material de recubrimiento más apropiado para el aloinjerto óseo. Estos materiales de recubrimiento están fácilmente disponibles y proporcionan la adherencia y la proliferación de MSC. No escapó a nuestra atención que en una realización preferente de la invención la albúmina, la fibronectina, el suero y por supuesto las MSC podrían ser autólogos. Un armazón, que está exento de proteínas óseas alogénicas y que contiene proteínas autólogas de MSC derivadas de médula ósea de origen sérico y autóloga, podría incorporarse al huésped más rápidamente que los aloinjertos o los autoinjertos usados convencionalmente y posibilita una recuperación más temprana del paciente (9, 10, 11, 17).

Aunque algunas MSC podrían adherirse incluso a la superficie de aloinjertos sin recubrir, la superficie de hueso mineralizado que se limpió de sustancialmente todos las BMP no podría proporcionar buenas condiciones para la supervivencia de las MSC (figura 1).

La viabilidad de células unidas se investigó con colorante alamar azul después de 3, 10 y 18 días. El cambio de color de alamar azul indicó que las células unidas estaban vivas en todos los injertos al comienzo del experimento. El alamar azul también indicó que las células unidas no estaban vivas cuando su número hubo empezado a decrecer en los injertos. La viabilidad de las células unidas también se investigó con colorante fluorescente calceína AM para confirmar los resultados que se obtuvieron en las mediciones con alamar azul.

El colágeno de tipo I no pudo proporcionar la supervivencia de MSC, sin embargo facilitó su adherencia a los injertos (figuras 2A, B). Aunque la fibronectina se usa habitualmente para fomentar la unión de células a diferentes superficies, no facilitó ni la adherencia ni la expansión de las MSC sobre aloinjertos de hueso mineralizado (figuras 3A, B). Sobre aquellos injertos que contenían fibronectina y colágeno de tipo I en combinación se observó proliferación al comienzo, pero las células no mostraron actividad metabólica después de 10 días (figuras 4A, B). El contenido de humedad de las composiciones proteicas usadas no influyó en los resultados. Estos datos muestran que aunque la fibronectina y el colágeno de tipo I son proteínas estructurales óseas importantes, por sí mismas no pueden generar un medio apropiado para la supervivencia de las MSC (figura 5).

Sorprendentemente, la presencia de albúmina liofilizada sola o en combinación con otras proteínas secadas de origen sérico sobre injertos potenció el número de MSC unidas y proporcionó buenas condiciones para la proliferación de células a lo largo de todo el periodo experimental. Cuando las proteínas de recubrimiento de albúmina o con carga de albúmina no se sometieron a liofilización en injertos después de la incubación en solución proteica, la cantidad de células se redujo a lo largo de toda la duración del periodo experimental (figuras 6B, 7B, 8B).

Sobre los injertos que se recubrieron con albúmina liofilizada solo no se unieron muchas más MSC que sobre aloinjertos sin tratar. No obstante, se observó que había una diferencia significativa y esta fue que la albúmina facilitó la proliferación de MSC (figura 6A). La combinación de albúmina liofilizada y fibronectina proporcionó la adherencia y también la expansión de MSC (figura 7A). La mayor tasa de proliferación en los últimos 8 días del experimento se observó en los injertos que contenían suero de bovino fetal liofilizado (figura 8A) (datos no mostrados en la figura 9).

En conclusión, nuestros datos muestran que el recubrimiento de partículas óseas mineralizadas con suero y/o albúmina no solo fomentó la unión de células madre sobre aloinjertos óseos mineralizados, sino que también fomentó la proliferación celular. Por lo tanto, se desarrolló un método de recubrimiento fiable por parte de los presentes inventores, método de recubrimiento que hace que la superficie de aloinjertos óseos, preferentemente aloinjertos óseos mineralizados y/o liofilizados, sea apropiada para proporcionar la unión y la supervivencia de MSC.

Ejemplos

Fuente de materiales usados

| | |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| Medio Eagle modificado de Dulbecco | Biochrom AG, Alemania |
| Suero de bovino fetal | Gibco, Invitrogen, Estados Unidos |
| Penicilina-estreptomicina | Biochrom AG, Alemania |
| L-glutamina | Biochrom AG, Alemania |
| Albúmina humana | BIOTEST HUNGARIA KFT., Hungría |

1000 ml de solución contiene:

200 g de proteína de plasma humano de la que la albúmina es al menos el 96 %

| | |
|--------------------|--|
| Fibronectina | Sigma Aldrich |
| Colágeno de tipo I | Colágeno de cerdo, 1,5 %, Biom' up, Francia |
| Colorantes Vybrant | Molecular Probes, Invitrogen, Estados Unidos |
| Calceína AM | Molecular Probes, Invitrogen, Estados Unidos |
| Alamar azul | Biosource, Invitrogen, Estados Unidos |

10 Los porcentajes de la presente descripción, si no se indica lo contrario, son siempre porcentajes peso/peso.

Ejemplo 1. Preparación e investigación de aloinjertos

Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales

15 Se aislaron células madre mesenquimales (MSC) derivadas de médula ósea a partir de médula ósea humana y se expandieron en medio de cultivo DMEM que contenía el 10 % de suero de bovino fetal, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina. Las muestras de médula ósea se obtuvieron de hombres y mujeres jóvenes de 2-20 años de edad. Solo se usaron los tejidos que de otro modo se habrían descartado. Semmelweis
20 Orthopedic Clinic Management Committee, Budapest, Hungría, aprobó el uso de estos tejidos. La médula ósea se recogió en matraces T75 y se diluyó con medio de cultivo DMEM. Esta mezcla se almacenó en incubadora a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 3 días. Después del periodo de incubación, las MSC adheridas a la superficie del matraz y los componentes remanentes de médula ósea se eliminaron mediante lavado con PBS. Las células usadas se sometieron a entre 1 y 5 pasajes durante el experimento.

Caracterización de MSC

30 La identidad de las células adheridas se confirmó mediante la presencia de marcadores de superficie celular específicos del linaje con citometría de flujo (BD® FacsCalibur, Beckton Dickinson, NJ, Estados Unidos). Se investigaron marcadores de superficie específicos de linaje hematopoyéticos, tales como CD34, CD45, y marcadores de superficie mesenquimales, tales como CD73, CD90, CD 105 y CD166.

Preparación de aloinjerto mineralizado liofilizado

35 Los huesos usados se obtuvieron de cadáveres o de intervenciones quirúrgicas. En la primera etapa, los huesos se lavaron en metanol durante 4 horas. El metanol se cambió continuamente durante el procedimiento. Después del lavado, los huesos se digirieron en una solución que consistía en solución salina tamponada con fosfatos (PBS) 0,1 M, azida de sodio 10 mM y ácido monoyodoacético 10 mM durante 24 horas. Subsiguientemente, los huesos se sometieron a descalcificación parcial con HCl 0,6 M a temperatura ambiente durante 4 a 6 horas y después se lavaron en PBS. Las estructuras óseas mineralizadas producidas (matrices) se esterilizaron en dióxido de etileno a
40 27 °C y después se liofilizaron asépticamente. Proceso de la liofilización: primer secado a 32 °C, 2 Pa durante 12 horas; segundo secado a 32 °C, 0 Pa durante 12 horas.

Preparación de aloinjerto recubierto

45 El aloinjerto mineralizado se cortó en piezas de forma cúbica o redonda. Las superficies de las piezas del aloinjerto

eran de un centímetro cuadrado y su altura era de 5 milímetros. Los aloinjertos preparados de este modo se incubaron en solución proteica a +4 °C durante la noche. Las soluciones proteicas usadas fueron de 10-20 mg/ml de fibronectina y el 10-20 % de albúmina de origen sérico humano, además suero de bovino fetal y el 1,5 % de colágeno de tipo I se derivó de cerdo. Las proteínas también se usaron en combinación, como fibronectina con albúmina, fibronectina con colágeno de tipo I. Estos huesos se usaron o bien directamente para los experimentos "sin secado" o bien subsiguientemente los huesos incubados se liofilizaron a 32 °C a 1 Pa durante 24 horas. Los aloinjertos recubiertos se sometieron a irradiación UV para su descontaminación durante 30 minutos.

Preparación del aloinjerto recubierto con células madre

Las MSC se marcaron con el colorante de membrana fluorescente Vybrant DID (excitación/emisión: 644/665 nm) durante 30 minutos a 37 °C. Las marcadas con DID se suspendieron en medio de cultivo DMEM y se añadieron gota a gota con una pipeta a la superficie de los aloinjertos recubiertos. Se usaron 60.000 células/armazón en todos los experimentos. Las MSC se expandieron en el aloinjerto in vitro durante 18 días.

Investigación de las MSC sembradas

Se observó proliferación de las MSC marcadas con DiD sembradas con microscopía confocal (Zeiss LSM 510 META, Carl Zeiss, Jena, Alemania) sobre el aloinjerto recubierto. Se seleccionaron aleatoriamente zonas individuales del injerto en las que la cantidad de las células adheridas se midió por fluorescencia. La viabilidad de las células se investigó con colorantes alamar azul y calceína AM.

Ejemplo 2. Hueso animal recubierto con albúmina humana liofilizada

Preparación y recubrimiento de aloinjertos de hueso de rata

Se recogieron fémures de ratas Wistar (400-450 g) para usarlos como aloinjertos óseos de rata. Después de la retirada de la médula ósea los fémures de rata se trituraron en partículas óseas homogéneas con un diámetro de 1 mm. Subsiguientemente, las partículas de hueso de rata obtenidas se sumergieron en solución de albúmina humana y se incubaron a +4 °C durante la noche y a continuación la albúmina humana se liofilizó en la superficie de dichas partículas óseas. Las condiciones de la liofilización: 32 °C, a 0,5 Pa durante 24 horas.

Recuperación de células madre derivadas de médula ósea de rata

Se recogieron fémures de ratas Wistar (400-450 g) para recuperar células madre derivadas de médula ósea. Después de la recogida de fémures de rata se diseccionaron sus extremos proximal y distal y se descargó la médula ósea en placas de Petri usando medio de cultivo DMEM que comprendía el 10 % de FCS, 100 U/ml de penicilina y 10 mg/ml de estreptomina, L-glutamina 2 mM y 1 g/l de glucosa. Las células adheridas al fondo de las placas de Petri se cultivaron a 37 °C en atmósfera totalmente humidificada del 5 % de CO₂ (condiciones de cultivo estándar) hasta que las células se volvieron confluentes. Subsiguientemente, las células se tripsinizaron y se sembraron 80.000 células en la superficie de aloinjertos óseos de rata individuales recubiertos con albúmina humana liofilizada. Los injertos preparados de este modo se almacenaron en condiciones de cultivo estándar durante 7 días y a continuación se investigó la viabilidad de las células unidas con colorante fluorescente calceína AM usando microscopio confocal (Zeiss LSM 510 META, Carl Zeiss, Jena, Alemania).

Resultados

Encontramos que los aloinjertos óseos de rata recubiertos con albúmina humana liofilizada proporcionaron condiciones adecuadas para la unión y la supervivencia de células madre en la superficie durante el periodo de incubación (figuras 10A, B).

Ejemplo 3. Modelo animal

Materiales y métodos

La capacidad de osteointegración de injertos óseos liofilizados recubiertos con albúmina de suero humano liofilizada se investigó en un modelo animal. En la primera etapa del estudio se desarrollo un modelo de pseudoartrosis. En el fémur de ratas Wistar (400-450 g) se realizó una osteotomía diafisal media transversal amplia de 2-3 mm y a continuación los extremos del hueso se fijaron mediante placa y tornillos. Se dispuso un espaciador de poli(metacrilato de metilo) (PMMA) entre los sitios de la osteotomía y el periostio se retiró del fémur preparado para bloquear la curación natural del hueso. Después de 4 semanas de operación la placa de PMMA se retiró y el hueco de la osteotomía se dejó vacío otras 4 semanas. Después de 4 semanas de periodo posoperativo los animales se sacrificaron y sus fémures se recogieron y se sometieron a examen con mCT para comprobar el desarrollo de una pseudoartrosis. En la segunda etapa, el modelo de pseudoartrosis se preparó exactamente como se ha detallado anteriormente, pero después de la eliminación de los espaciadores de PMMA se implantaron aloinjertos óseos liofilizados sin recubrir (como control) y recubiertos con albúmina humana liofilizada en los huecos de la osteotomía.

4 semanas después de la implantación de injertos óseos los animales se sacrificaron y los fémures recogidos se sometieron a examen por mCT (25).

Resultados

5 No se observó nueva formación de huesos en los huecos de la osteotomía que se dejaron vacíos después de la retirada del espaciador de PMMA. Esto prueba que el modelo es adecuado para la investigación de la capacidad de osteointegración de los injertos óseos según la presente invención (figura 11A, B).

10 Los aloinjertos óseos liofilizados sin recubrir (controles) no fueron capaces de integrarse en el sitio de defectos óseos (figura 11C, D). Por otra parte, la fusión ósea pudo detectarse 4 semanas después de la implantación del injerto óseo humano liofilizado con albúmina. El hueso esponjoso entre los bordes de osteotomía con una estructura suelta y los agujeros más anchos se refieren a los remanentes del injerto implantado. Los rayos X muestran la curación del defecto (figura 12A, B).

15 **Lista de referencias**

1. MARK E. BOLANDER, GARY BALIAN.: Use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. Patente de Estados Unidos. Número de patente: 4743259, 10 de mayo de 1988.

20 2. MARK E. BOLANDER, GARY BALIAN.: Use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. Patente de Estados Unidos. Número de patente: 4902296, 20 de febrero de 1990.

3. BARBARA L. MERBOTH, MOON HAE SUNWOO, ARTHUR A. GERTZMAN.: Allograft bone composition having gelatin binder. Patente de Estados Unidos. Número de patente: 704514, 16 de mayo de 2006.

25 4. RUST PA, KALSI P, BRIGGS TW, CANNON SR, BLUNN GW.: Will mesenchymal stem cells differentiate into osteoblasts on allograft? Clin Orthop Relat Res. 2007, abril; 457:220-6.

30 5. BENJAMIN JRF BOLLAND], KRIS PARTRIDGE, SIMON TILLEY], ANDREW MR NEW], DOUGLAS G DUNLOP] Y RICHARD OC OREFFO.: Biological and mechanical enhancement of impacted allograft seeded with human bone marrow stromal cells: potential clinical role in impaction bone grafting. Regenerative Medicin. Julio, 2006, Vol. 1, Nº 4, Páginas 457-467.

35 6. KAI-UWE LEWANDROWSKI, SHRIKAR BONDRE, DEBRA J. TRANTOLO, MAURICE V. CATTANEO, JOSEPH D. GRESSER, DONALD L. WISE.: Osteoinduction of cortical bone allografts by coating with biopolymers seeded with recipient periosteal bone cells. Patente de Estados Unidos. Número de patente: 6899107 B2, 31 de mayo de 2005.

40 7. VALERIE OLIVIER, NATHALIE FAUCHEUX y PIERRE HARDOUIN: Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery. Drug Discov Today. 2004, 15 de septiembre; 9(18):803-11. Vol. 9, Nº 18, septiembre, 2004.

8. RICHARD O. C. OREFFO, FERDINAND C. M. DRIESSENS, JOSEPH A. PLANELL y JAMES T. TRIFFITT.: Growth and differentiation of human bone marrow osteoprogenitors on novel calcium phosphate cements. Biomaterials. 1998, octubre; 19(20):1845-54.

45 9. PERRY CR: Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. Clin Orthop Relat Res. 1999, marzo; (360):71-86. Revisión.

50 10. GIANNOUDIS PV, DIPOPOULOS H, TSIRIDIS E.: Bone substitutes: an update. Injury. 2005, noviembre; 36 Supl 3:S20-7. Revisión.

11. KARIN A. HING: Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering?Philos Transact A Math Phys Eng Sci. 2004, 15 de diciembre; 362(1825):2821-50. Revisión.

55 12. LEWANDROWSKI KU, GRESSER JD, WISE DL, TRANTOL DJ.: Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: a histologic evaluation of osteointegration of poly(propylene glycol-co-fumaric acid)-based cement implants in rats. Biomaterials. 2000, abril; 21(8):757-64.

60 13. WAHL DA, CZERNUSZKA JT.: Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. Eur Cell Mater. 2006, 28 de marzo; 11:43-56. Revisión.

14. ARRINGTON ED, SMITH WJ, CHAMBERS HG, BUCKNELL AL, DAVINO NA.: Complications of iliac crest bone graft harvesting. Clin Orthop Relat Res. 1996, agosto; (329):300-9.

65 15. KORBLING M, CHAMPLIN R.: Peripheral blood progenitor cell transplantation: a replacement for marrow autoor

allografts.Stem Cells. 1996, marzo; 14(2):185-95. Revisión.

16. CHERN B, McCARTHY N, HUTCHINS C, DURRANT ST.: Analgesic infiltration at the site of bone marrow harvest significantly reduces donor morbidity.Bone Marrow Transplant. 1999, mayo; 23(9):947-9.

5

17. PARIKH SN.: Bone graft substitutes: past, present, future. J Postgrad Med. 2002 abril-junio; 48(2): 142-8.

18. DODD CA, FERGUSON CM, FREEDMAN L, HOUGHTON GR, THOMAS D .: Allograft versus autograft bone in scoliosis surgery.J Bone Joint Surg Br. 1988, mayo; 70(3):431-4.

10

19. SUMMERS BN, EISENSTEIN SM.: Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion.J Bone Joint Surg Br. 1989, agosto; 71(4):677-80.

20. SAMPATH TK, REDDI AH.: Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation.Proc Natl Acad Sci U S A. 1981, diciembre; 78(12):7599-603.

15

21. REDDI AH.: Interplay between bone morphogenetic proteins and cognate binding proteins in bone and cartilage development: noggin, chordin and DAN.Arthritis Res. 2001;3(1):1-5. Epub 2000, 14 de noviembre. Revisión.

20

22. TULI, S, M., and SINGH, A. D.: The Osteoinductive Property of Decalcified Bone Matrix. An experimental study. J. Bone and Joint Surg., 60-B: 116-123, 1978.

23. URIST, M. R., IWATA, H., CRECCOTT, P. L., DORFMAN, R. L., BOZD, S. D., MCDOWELL, R. M., and CHIEN, C.: Bone Morphogenesis in implants of Insoluble Bone Gelatin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70: 511, 1973.

25

24. TAKAGI K, URIST MR.: The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. Ann Surg. 1982, julio; 196(1):100-9.

25. SCHMIDHAMMER R, ZANDIEH S, MITTERMAYR R, PELINKA LE, LEIXNERING M, HOPF R, KROEPFL A, REDL H. Assessment of bone union/nonunion in an experimental model using microcomputed technology. J Trauma. 2006, julio; 61(1):199-205.

30

26. Documento WO 01/82993

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la producción de una composición ósea implantable adecuada para la unión de células madre a la misma, caracterizada porque se hace que una solución proteica que comprende albúmina entre en contacto con partículas óseas y dicha solución proteica se seca sobre dichas partículas óseas por liofilización.
2. El método según la reivindicación 1, en el que dicha solución proteica que comprende albúmina es una solución de albúmina.
- 10 3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha albúmina es albúmina humana y es ventajosamente de origen sérico.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichas partículas óseas son partículas óseas liofilizadas.
- 15 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichas partículas óseas son partículas óseas mineralizadas que están sustancialmente limpias de componentes orgánicos.
- 20 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que alguno/s de los ingredientes de dicha solución proteica es/son de origen humano o es/son humanizado(s) inmunológicamente.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha solución proteica se ha obtenido de un paciente con necesidad de una implantación ósea.
- 25 8. El método según la reivindicación 7, en el que dicha solución proteica comprende el suero de dicho paciente o cualquier fracción del mismo.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha solución proteica comprende adicionalmente una proteína recombinante.
- 30 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha solución proteica comprende adicionalmente fibronectina o colágeno o una combinación de los mismos.
- 35 11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha solución proteica esté exenta de componentes que son potencialmente inmunógenos para un paciente destinado a recibir dicha composición ósea mineralizada como implante.
- 40 12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que además comprende una etapa de unir células capaces de potenciar la formación ósea a la superficie de dichas partículas óseas, siendo dichas células ventajosamente células madre mesenquimales.
13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dichas células capaces de potenciar la formación ósea se obtienen de un paciente con necesidad de una implantación ósea.
- 45 14. Una composición ósea implantable adecuada para su uso en implantación de injerto, obtenible mediante los métodos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
15. Una composición según la reivindicación 14 para su uso en terapia.

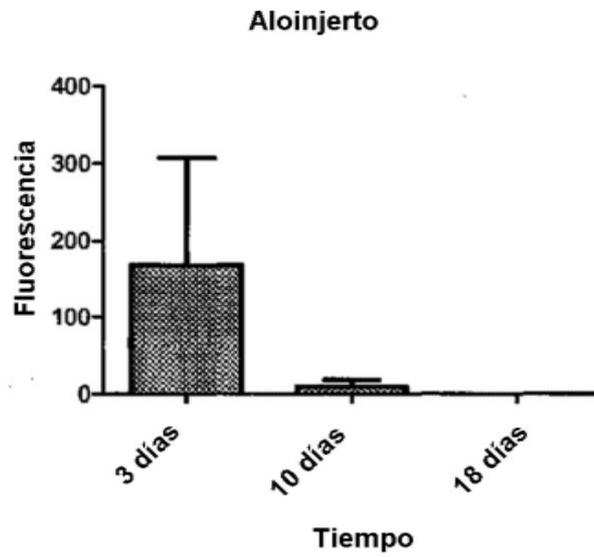


Figura 1

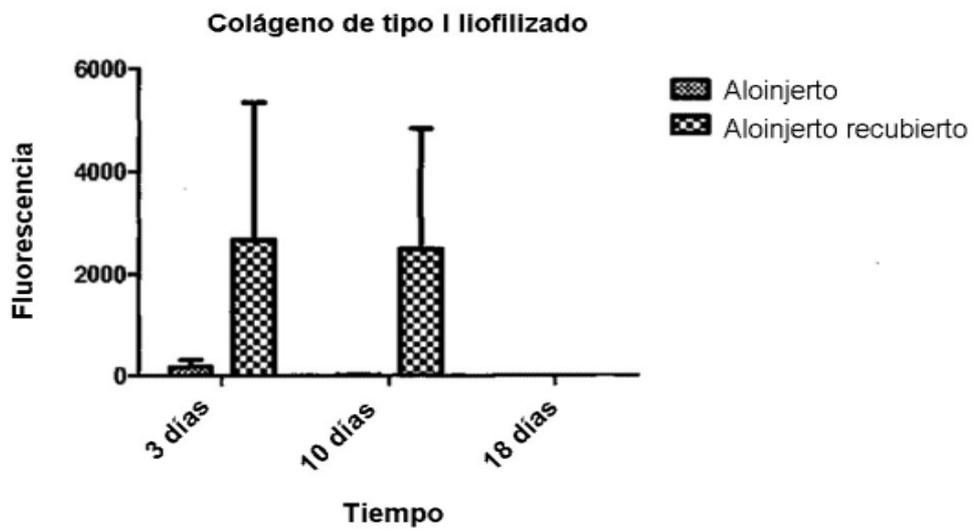


Figura 2A

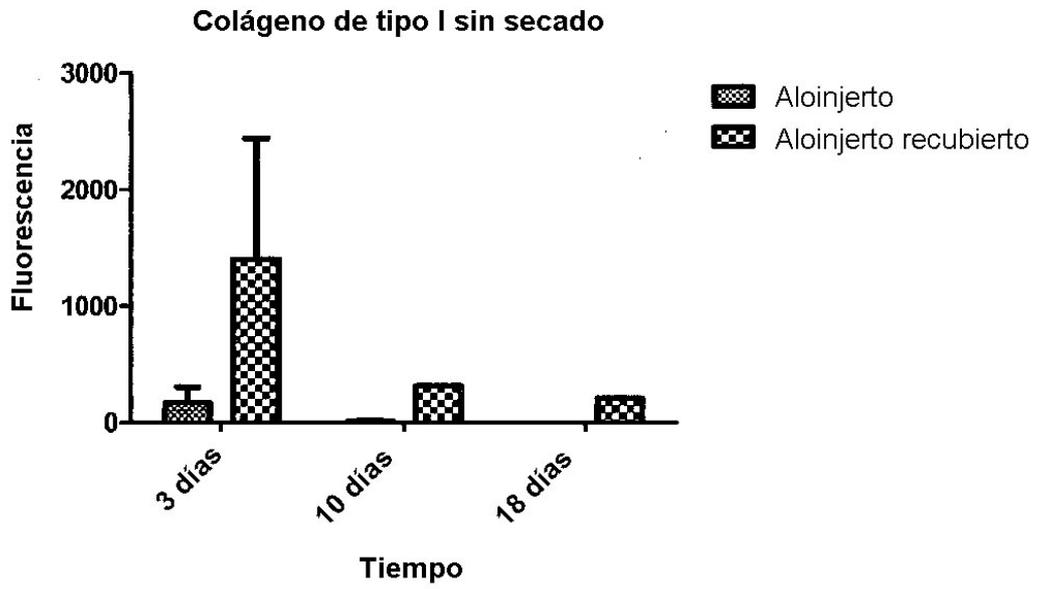


Figura 2B

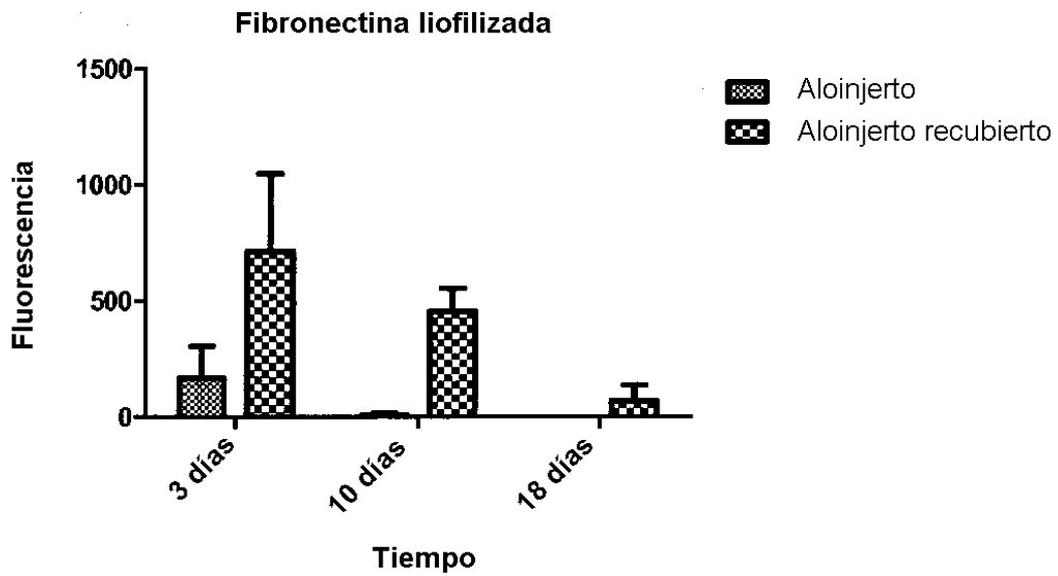


Figura 3A

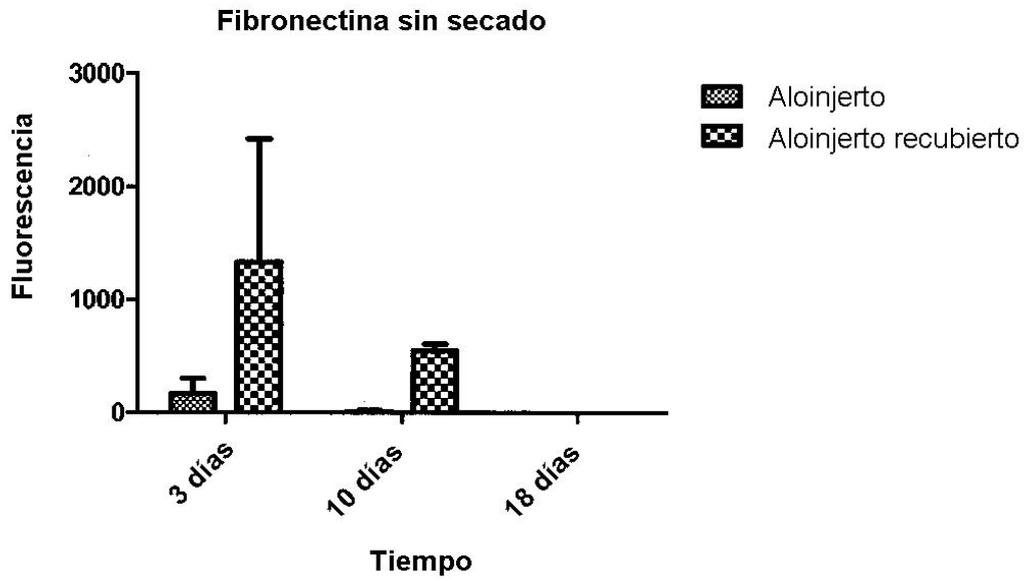


Figura 3B

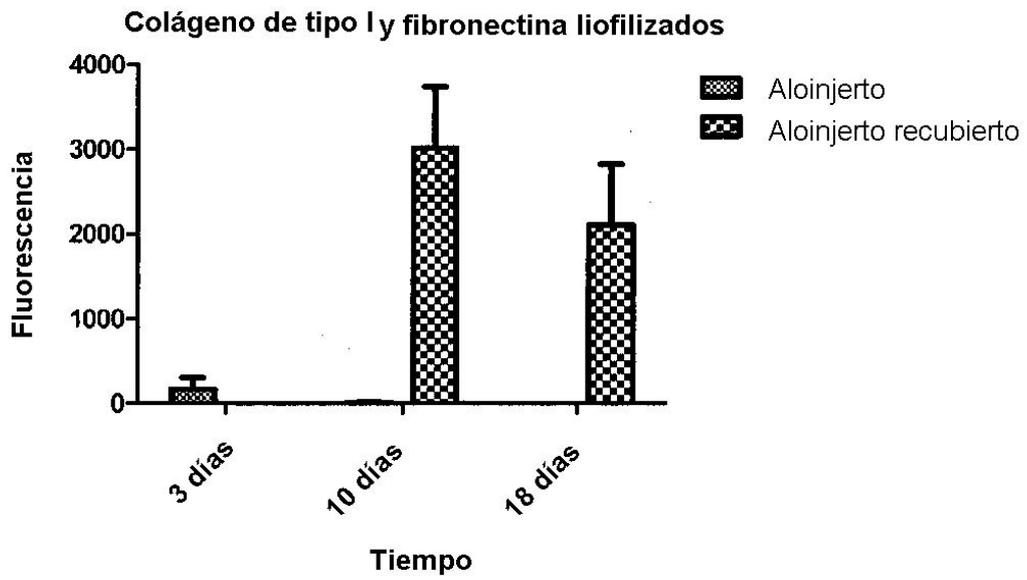


Figura 4A

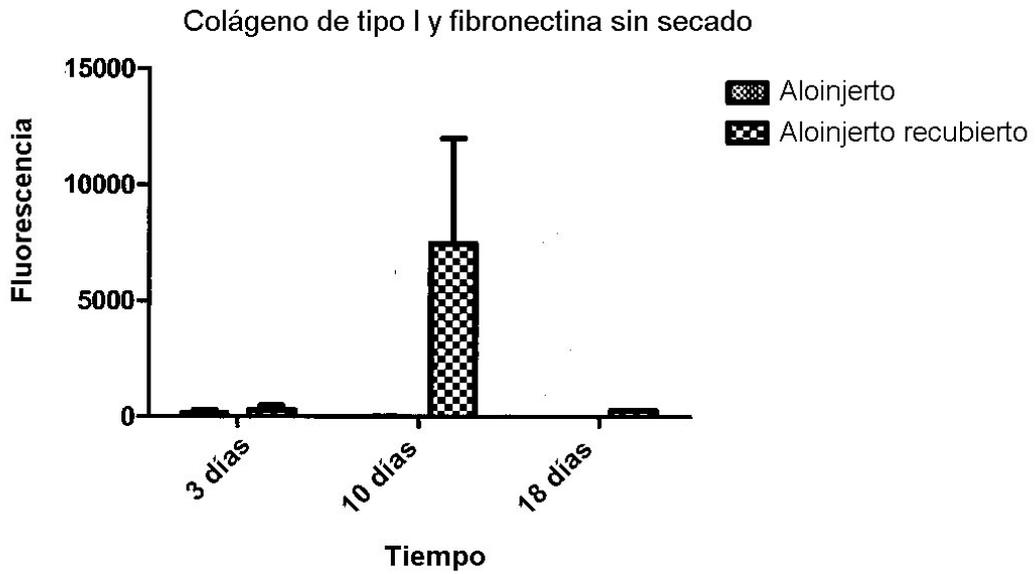
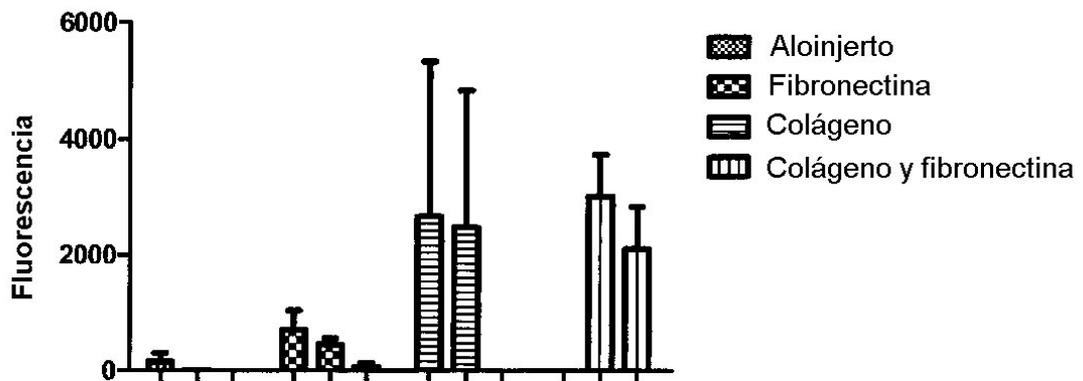


Figura 4B

Resumen de materiales de recubrimiento exentos de albúmina



Cambio del número de células durante el periodo experimental

Figura 5

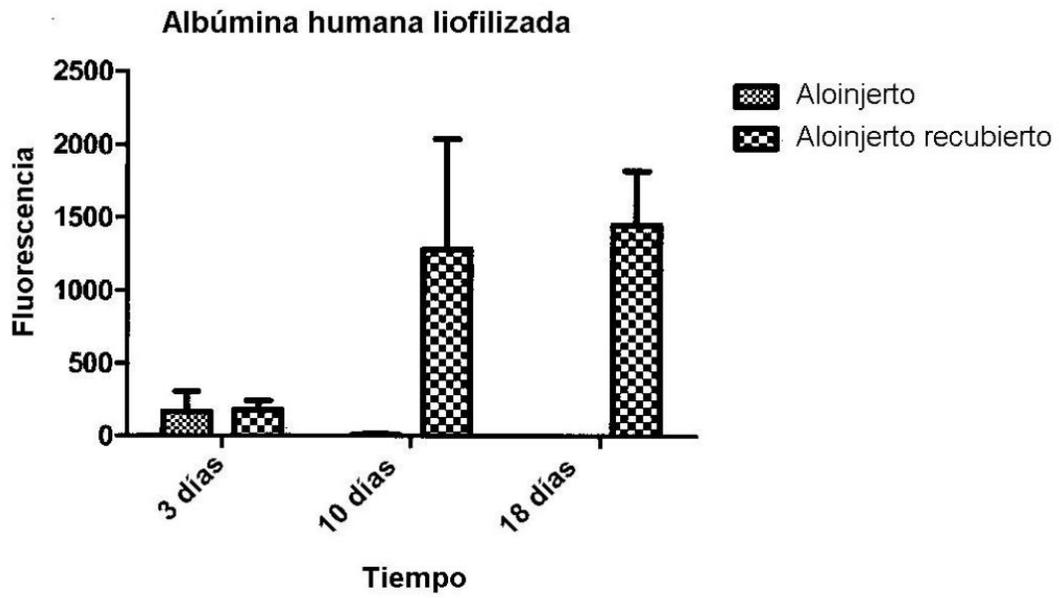


Figura 6A

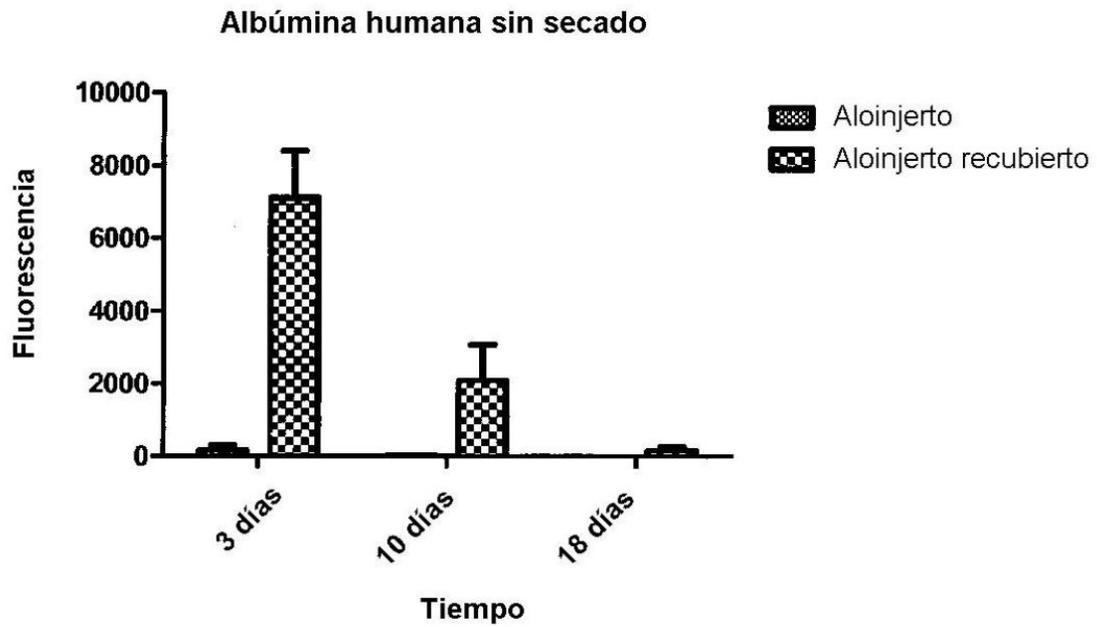


Figura 6B

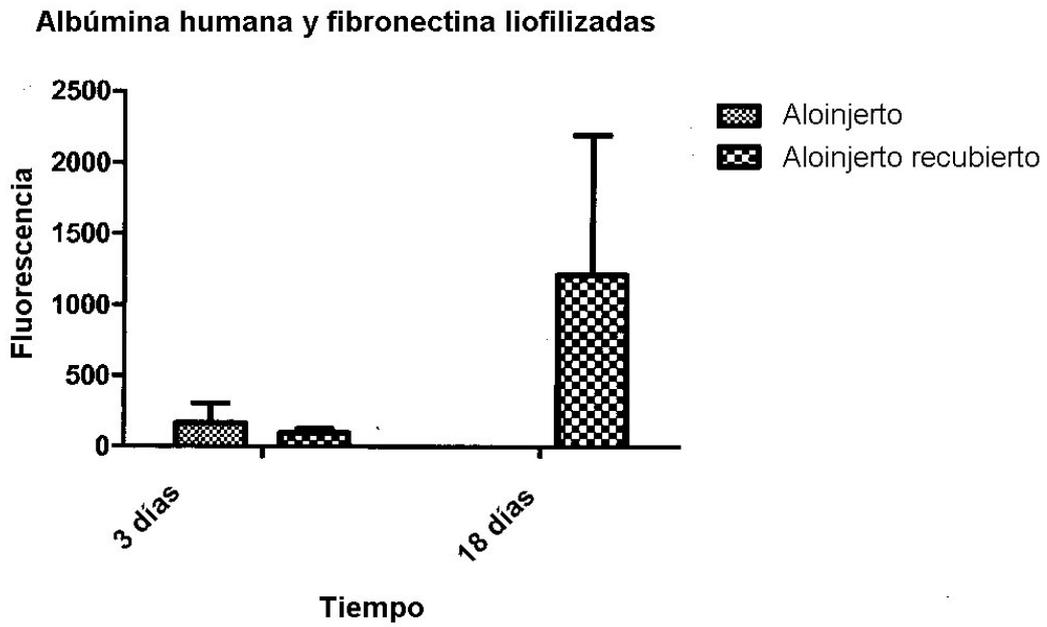


Figura 7A

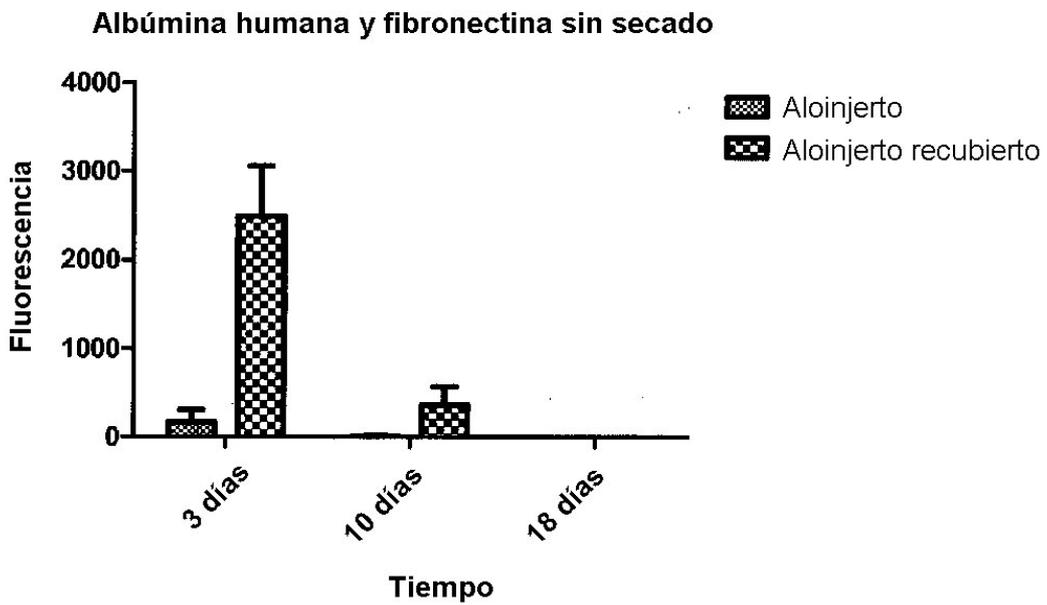


Figura 7B

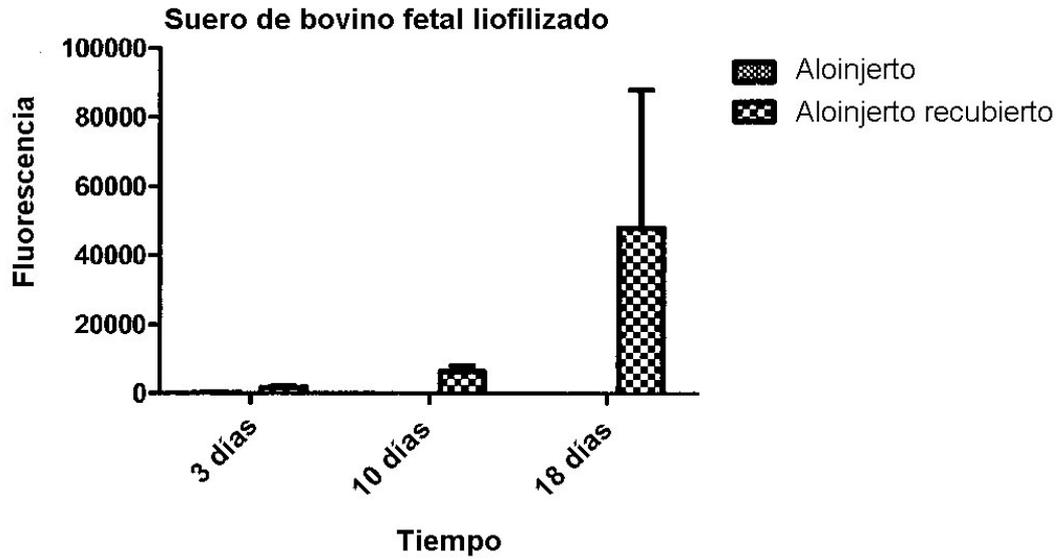


Figura 8A

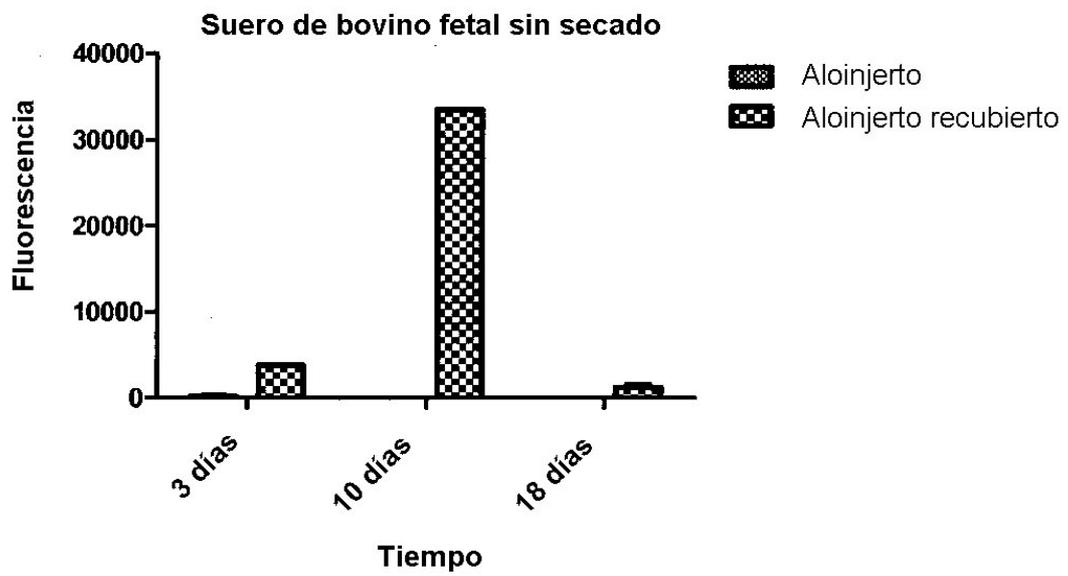
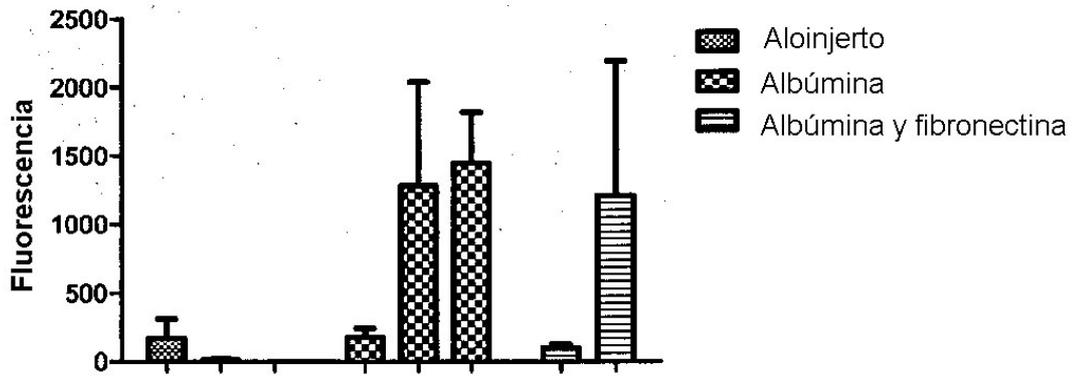


Figura 8B

Resumen de materiales de recubrimiento que contienen albúmina



Cambio en el número de células durante el periodo experimental

Figura 9

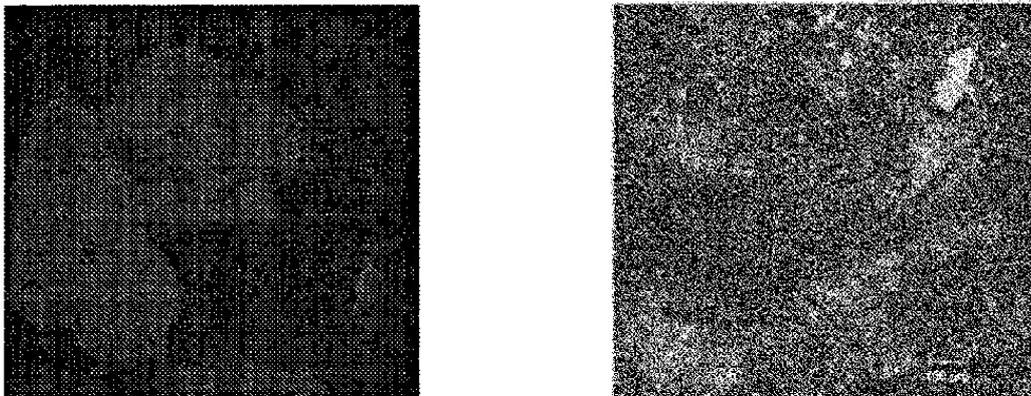


Figura 10

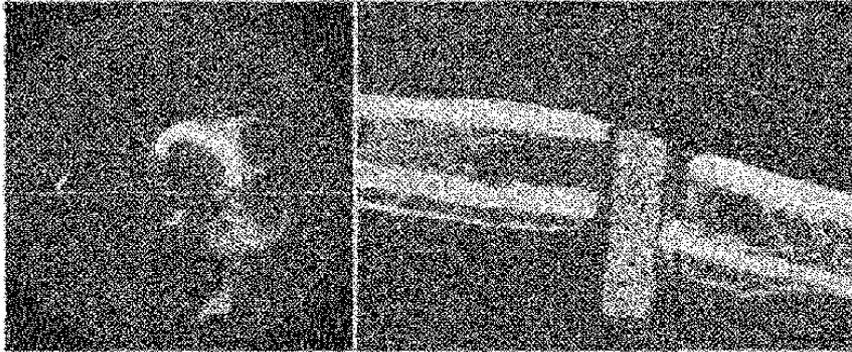


Figura 11A

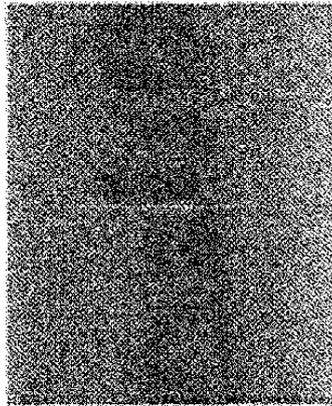


Figura 11B

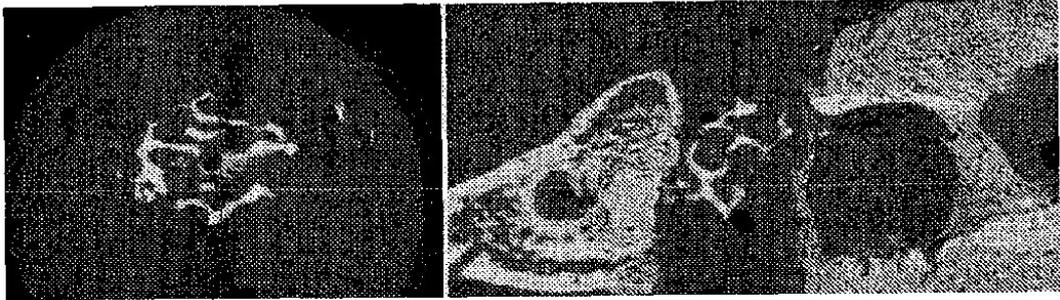


Figura 11C

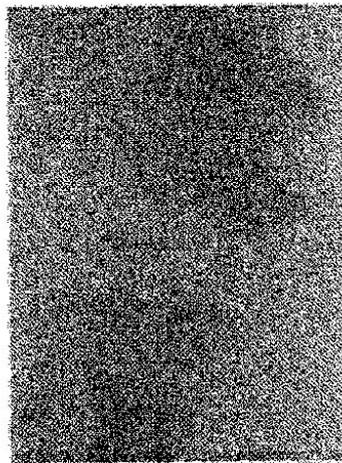


Figura 11D

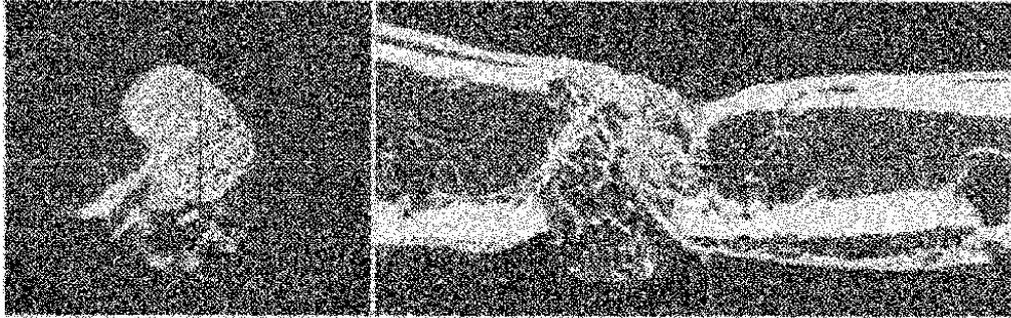


Figura 12A

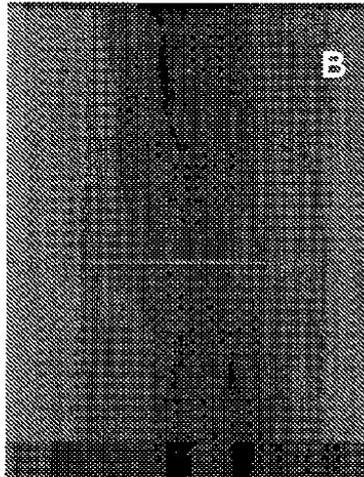


Figura 12B