

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 025**

51 Int. Cl.:

A61F 13/00 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

A01K 67/00 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2007 PCT/US2007/066771**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2007 WO07124302**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2007 E 07760765 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2007196**

54 Título: **Composición de injerto óseo**

30 Prioridad:

19.04.2006 US 407446

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.01.2018

73 Titular/es:

**LIFECCELL CORPORATION (100.0%)
1 MILLENNIUM WAY
BRANCBURG, NJ 08876, US**

72 Inventor/es:

**CONNOR, JEROME y
QIU, QING-QING**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 652 025 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

Composición de injerto óseo

5 Campo técnico

Esta invención se refiere a la ingeniería de tejidos, y más en particular a la remodelación de tejido óseo.

10 Antecedentes

10 El hueso es único entre los tejidos de los vertebrados por su capacidad de cicatrización a través de la formación de hueso nuevo. Otros tejidos, por ejemplo, el músculo, el corazón y el cerebro se curan mediante el reemplazo con tejido conectivo, lo que resulta en la formación de cicatrices. La regeneración del tejido esquelético es el resultado de una interacción compleja y dinámica entre tres componentes: células, factores de crecimiento y un andamiaje permissivo. Un andamiaje osteoinductivo tiene la capacidad de inducir la formación de hueso nuevo al influir en el reclutamiento, la diferenciación y la maduración de las células pluripotenciales de un paciente en células formadoras de hueso.

20 El documento US2006/073592 proporciona métodos de almacenamiento de matrices de tejido acelular en las que una porción sustancial de agua en las matrices se reemplaza con un agente de reemplazo de agua, por ejemplo, glicerol. También incluidas en la invención del documento US 2006/073592 hay composiciones hechas por estos métodos, así como también métodos de tratamiento que usan dichas composiciones.

25 Sumario

25 La presente invención se refiere a un método para preparar una composición de injerto óseo (CIO); caracterizado porque dicho método comprende: combinar fragmentos de una matriz de tejido acelular (MTA) con fragmentos de matriz ósea desmineralizada (MOD) para crear una mezcla, en la que los fragmentos de MTA y los fragmentos de MOD en la mezcla están sustancialmente hidratados; secar e irradiar la mezcla para proporcionar una forma que se ha secado e irradiado; en la que dicha forma puede almacenarse durante seis meses y posteriormente rehidratarse para proporcionar una CIO osteoinductiva.

35 La presente invención también se refiere a una CIO preparada mediante el método anterior, así como a un artículo de fabricación que comprende dicha CIO.

Los inventores han descubierto que una mezcla hidratada de fragmentos de matriz de tejido acelular (MTA) y fragmentos de matriz ósea desmineralizada (MOD) se puede secar para formar una composición de injerto óseo (CIO) que, cuando se hidrata, es osteoinductiva. Además, los inventores observaron que la CIO retenía la osteoinductividad después del almacenamiento (por ejemplo, almacenamiento a largo plazo). La invención proporciona así métodos para elaborar una CIO, métodos de tratamiento que usan la CIO y artículos de fabricación que incluyen la CIO.

45 Más específicamente, la invención proporciona un método para preparar una composición de injerto óseo (CIO). El método implica: (a) combinar fragmentos (por ejemplo, una pluralidad de fragmentos) de una matriz de tejido acelular (MTA) con fragmentos (por ejemplo, una pluralidad de fragmentos) de matriz ósea desmineralizada (MOD) para crear una mezcla, los fragmentos de MTA y los fragmentos de MOD en la mezcla que están sustancialmente hidratados; y (b) secar la mezcla para formar una CIO, de modo que, cuando se hidrata, la CIO es osteoinductiva. Los fragmentos de MTA pueden ser partículas (por ejemplo, partículas de un tamaño uniforme) y los fragmentos de MOD pueden ser partículas (por ejemplo, partículas de un tamaño uniforme).

50 La mezcla puede ser una masilla semisólida y, antes del secado, la masilla semisólida se puede moldear. La MTA puede ser, o puede incluir, dermis (o fascia, tejido pericárdico, duramadre, tejido del cordón umbilical, tejido placentario, tejido valvular cardíaco, tejido ligamentario, tejido del tendón, tejido arterial, tejido venoso, tejido conectivo neural, tejido de la vejiga urinaria, tejido de uréter, o tejido intestinal) del que se han eliminado todas, o sustancialmente todas, las células viables. La MTA puede estar hecha de tejido humano o tejido de mamífero no humano (por ejemplo, cerdo) y el mamífero no humano puede modificarse por ingeniería genética para que carezca de expresión de restos de α -1,3-galactosilo. El mamífero genéticamente modificado puede carecer de un gen funcional de la α -1,3-galactosiltransferasa. Además, la MOD se puede preparar a partir de cualquiera de los mamíferos mencionados anteriormente. La etapa de secado puede incluir, por ejemplo, liofilización y el método implica además irradiar la CIO con, por ejemplo, radiación γ , radiación X, radiación con haz de electrones o radiación ultravioleta. La CIO puede irradiarse de manera que absorba de 6 kGy a 30 kGy de la radiación. En lugar de, o además de irradiar la CIO, la mezcla se puede irradiar (utilizando cualquiera de los tipos y dosis de radiación anteriores) antes del secado. La invención también presenta una CIO realizada mediante el método descrito anteriormente. También se desvela un método de tratamiento. El método incluye: (a) identificar un sujeto mamífero que tiene un órgano receptor, o tejido, que necesita una mejora o reparación; y (b) colocar la CIO de la invención (véase más arriba) en o sobre el órgano o tejido. La CIO puede mantenerse en su lugar mediante un dispositivo

estructural de apoyo. La mezcla a partir de la cual se fabricó la CIO puede haber sido una masilla semisólida y, antes del secado, la masilla semisólida puede tener forma. El tejido u órgano receptor puede ser hueso cortical o hueso esponjoso.

La invención también proporciona un artículo de fabricación que incluye: (a) la CIO de la invención (véase más arriba); y (b) material de embalaje, o un prospecto, que incluye instrucciones para un método de tratamiento. El método de tratamiento puede implicar (i) identificar un sujeto mamífero que tiene un órgano receptor, o tejido, que necesita una mejora o reparación; y (ii) colocar la CIO en o sobre el órgano o tejido. Una realización descrita es un kit que incluye: (a) un fragmento (por ejemplo, una pluralidad de fragmentos) de MOD; (b) fragmentos (por ejemplo, una pluralidad de fragmentos) de MTA; y (c) material de embalaje, o un prospecto, que incluye instrucciones para un método de fabricación de una CIO. El método implica: (i) combinar los fragmentos de MTA con los fragmentos de MOD para crear una mezcla, los fragmentos de MTA y los fragmentos de MOD en la mezcla están sustancialmente hidratados por completo; y (ii) secar la mezcla para formar la CIO, de modo que, cuando se hidrata, la CIO es osteoinductiva.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Los métodos y materiales preferidos se describen a continuación, aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la puesta en práctica o a prueba de la presente invención. Los materiales, métodos y ejemplos descritos en este documento son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención, por ejemplo, métodos de reparación de defectos óseos, serán evidentes a partir de la siguiente descripción, de los dibujos y de las reivindicaciones.

Descripción detallada

Los materiales y métodos proporcionados en la presente memoria se pueden usar para hacer una composición de injerto óseo (CIO) que se puede implantar en tejido óseo dañado o defectuoso para facilitar la reparación del tejido óseo dañado o defectuoso. Como se usa en este documento, el término "composición de injerto óseo" es un material que a) está compuesto de matrices de tejido acelular (producidas a partir de tejidos que contienen colágeno) y matrices óseas desmineralizadas; b) está deshidratado para su almacenamiento a largo plazo; y c) retiene la mayoría, y de manera óptima, todas las funciones biológicas del tejido óseo nativo y que contiene colágeno nativo del que se formó, incluso durante el almacenamiento a largo plazo.

"Injerto óseo" como se describe en este documento es un procedimiento que coloca material óseo o formador de hueso en, sobre o alrededor, o adyacente a defectos óseos, por ejemplo, huecos, agujeros o espacios en el hueso o roturas en el hueso, para ayudar a la curación. El hueso es un material denso y multifásico o "material compuesto" formado por células integradas en una matriz compuesta de elementos orgánicos, que incluyen fibras de colágeno, lípidos, péptidos, glicoproteínas, polisacáridos y citratos, y elementos inorgánicos, incluidos fosfatos de calcio, carbonatos, y sales de sodio, magnesio y fluoruro. Al proporcionar un andamiaje tridimensional, los materiales de injerto óseo pueden actuar para reemplazar temporalmente el hueso perdido y proporcionar un marco dentro o fuera del cual el hueso anfitrión y la red vascular pueden regenerarse y sanar. Además, los materiales de injerto óseo pueden facilitar la reparación ósea de varias maneras, dependiendo de su capacidad para interactuar con las células formadoras de hueso.

Los materiales osteoconductivos proporcionan un andamiaje que facilita la neovascularización y la infiltración del injerto por medio de una "sustitución progresiva" en los bordes del injerto. Los materiales osteoconductivos dependen del sitio de implantación (es decir, inician la formación de hueso nuevo solamente cuando se implanta en o sobre el hueso) y actúan simplemente como soporte para el nuevo hueso para formar un puente sobre el sitio de un defecto en el hueso. Por el contrario, los materiales osteoinductivos se distinguen por su capacidad para estimular las propias células pluripotenciales pluripotentes del receptor para que se diferencien en células osteogénicas funcionales tales como osteoblastos y osteoclastos. Por lo tanto, los materiales osteoinductivos son capaces de iniciar un nuevo crecimiento óseo esencialmente independiente del sitio del implante, es decir, pueden inducir la formación de hueso en cualquier tejido, incluido el hueso, en o sobre el que se ponen. La CIO proporcionada en este documento es una composición que conserva la osteoinductividad tras el almacenamiento a largo plazo y, como tal, es útil para tratar una variedad de trastornos óseos.

I. Componentes de la CIO

En este documento se proporciona una composición de injerto óseo (CIO). La composición de injerto óseo (CIO) incluye un componente de matriz de tejido acelular (MTA) y un componente de matriz ósea desmineralizada (MOD).

Matrices de tejido acelular

Como se usa en este documento, una "matriz de tejido acelular" ("MTA") es una estructura derivada de tejido que está compuesta de cualquiera de una amplia gama de tejidos que contienen colágeno eliminando todas, o sustancialmente todas, las células viables y, preferentemente, todos los componentes subcelulares detectables y/o desechos generados por células asesinas. Como se usa en este documento, una MTA que carece de "sustancialmente todas las células viables" es una MTA en la que la concentración de células viables es inferior al 1 % (por ejemplo, inferior al: 0,1 %, 0,01 %, 0,001 %, 0,0001 %; 0,00001 %; 0,000001 %, o incluso inferior al 0,000001 %) en el tejido u órgano del que se fabricó la MTA. La MTA preferentemente también carece sustancialmente de células muertas y/o componentes celulares.

La MTA de la invención puede tener, o no tener, una membrana basal epitelial. La membrana basal epitelial es una lámina delgada de material extracelular contigua al aspecto basilar de las células epiteliales. Las láminas de células epiteliales añadidas forman un epitelio. Así, por ejemplo, el epitelio de la piel se llama epidermis, y la membrana basal epitelial de la piel se encuentra entre la epidermis y la dermis. La membrana basal epitelial es una matriz extracelular especializada que proporciona una función de barrera y una superficie de unión para células epiteliales; sin embargo, no contribuye a ningún papel estructural o biomecánico significativo al tejido subyacente (por ejemplo, la dermis). Los componentes únicos de las membranas basales epiteliales incluyen, por ejemplo, laminina, colágeno tipo VII y nidógeno. La organización temporal y espacial única de la membrana basal epitelial la distingue, por ejemplo, de la matriz extracelular dérmica. La presencia de la membrana basal epitelial en una MTA podría ser desventajosa ya que la membrana basal epitelial probablemente contenga una variedad de componentes específicos de especie que podrían provocar la producción de anticuerpos y/o unirse a anticuerpos preformados en receptores de injerto xenogénico de la matriz acelular. Además, la membrana basal epitelial puede actuar como barrera para la difusión de células y/o factores solubles (por ejemplo, quimioatrayentes) y a la infiltración celular. Por lo tanto, su presencia en una MTA puede retrasar significativamente la formación de nuevo tejido de la MTA en un animal receptor. Como se usa en este documento, una MTA que "carece sustancialmente" de una membrana basal epitelial es una matriz de tejido acelular que contiene menos del 5 % (por ejemplo, menos del: 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,1 %; 0,01 %, 0,001 %, o incluso menos del 0,001 %) de la membrana basal epitelial poseída por el correspondiente tejido no procesado del que se deriva la MTA.

Las MTA retienen los atributos biológicos y estructurales de los tejidos a partir de los cuales están hechas, incluyendo el reconocimiento celular y la unión celular, así como la capacidad de soportar la propagación celular, la proliferación celular y la diferenciación celular. Dichas funciones son proporcionadas por proteínas colágenas no desnaturalizadas (por ejemplo, colágeno tipo I) y una variedad de moléculas no colágenas (por ejemplo, proteínas que sirven como ligandos para moléculas tales como receptores de integrinas, moléculas con alta densidad de carga tales como los glicosaminoglicanos (por ejemplo, hialuronano o proteoglicanos, u otras adhesinas). Las funciones estructurales retenidas por matrices acelulares útiles incluyen el mantenimiento de la arquitectura histológica, el mantenimiento del conjunto tridimensional de los componentes del tejido y las características físicas tales como resistencia, elasticidad y durabilidad, porosidad definida y retención de macromoléculas. La eficacia de las funciones biológicas de una MTA puede medirse, por ejemplo, mediante la capacidad de la MTA para soportar la proliferación celular (por ejemplo, células epiteliales) y es al menos del 50 % (por ejemplo, al menos: 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 100 % o más del 100 %) del tejido u órgano nativo del que se fabrica la MTA.

No es necesario que la MTA esté formada de tejido que sea idéntico al tejido huésped circundante, sino que simplemente debe ser remodelable invadiendo o infiltrando células tales como células diferenciadas del tejido huésped relevante, células pluripotenciales tales como células pluripotenciales mesenquimales, o células progenitoras. Se entiende que la MTA se puede producir a partir de cualquier tejido blando y esqueleto muscular que contenga colágeno (por ejemplo, dermis, fascia, pericardio, duramadre, cordones umbilicales, placentas, válvulas cardíacas, ligamentos, tendones, tejido vascular (arterias y venas tales como venas safenas), tejido conectivo neural, tejido de vejiga urinaria, tejido de uréter o tejido intestinal), siempre que las propiedades descritas anteriormente sean retenidas por la matriz.

Una MTA útil para la invención opcionalmente puede fabricarse a partir de un tejido propio del receptor a base de colágeno. Además, aunque una MTA generalmente se habrá fabricado a partir de uno o más individuos de la misma especie que la del receptor de la CIO, este no es necesariamente el caso. Por lo tanto, por ejemplo, una MTA se puede haber fabricado a partir de un tejido porcino y se puede usar para fabricar una CIO que se pueda implantar en un paciente humano. Las especies que pueden servir como receptoras de una CIO y donantes de tejidos u órganos para la producción del componente de MTA de la CIO pueden incluir, sin limitación, seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos, mandriles o chimpancés), cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas, perros, gatos, conejos, conejillos de indias, jerbos, hámsteres, ratas o ratones.

De particular interés como donantes son los animales (por ejemplo, cerdos) que han sido diseñados genéticamente para carecer de la fracción galactosa- α -1,3-galactosa terminal. Para descripciones de los animales apropiados, véase la Solicitud publicada pendiente de aprobación de Estados Unidos n.º 2005/0028228 A1 y la Patente de Estados Unidos n.º 6.166.288. Un problema importante de los xenotrasplantes en animales receptores (por ejemplo, seres humanos) que no expresan la enzima UDP-galactosa: β -D-galactosil-1,4-N-acetil-D-glucosaminida α -1,3

galactosil-transferasa (α -1,3 galactosiltransferasa; " α -GT") que cataliza la formación de la estructura de disacárido terminal, la galactosa α -1,3 galactosa (" α -gal"), es el rechazo hiperagudo de xenoinjertos en dichos receptores. Este rechazo es en gran parte debido, si no exclusivamente, a la acción de anticuerpos específicos para el epítipo de α -gal en la superficie de las células en el xenoinjerto. Se han obtenido animales transgénicos (por ejemplo, cerdos) que carecen, o carecen sustancialmente, de α -GT funcional y, por lo tanto, también carecen, o carecen sustancialmente, de epítopos α -gal. Los métodos divulgados para producir animales transgénicos, y en particular animales transgénicos alterados genéticamente, son bien conocidos en la técnica. Los métodos para producir animales alterados genéticamente implican la incorporación de una forma alterada de un gen de interés en la línea germinal de un individuo de una especie. El gen puede alterarse de modo que no se produce ningún producto proteico (por ejemplo, α -GT) o se produce un producto proteico que carece de la actividad, o sustancialmente carece de la actividad, de la proteína nativa. Como se usa en el presente documento, una proteína α -GT "que sustancialmente carece de actividad α -GT" es una proteína α -GT que tiene menos del 5 % (por ejemplo, menos del: 4 %; 2 %; 1 %; 0,1 %; 0,01 %; 0,001 %; o incluso menos del 0,001 %) de la capacidad de la α -GT de tipo silvestre para generar epítopos de α -gal. Los métodos divulgados para alterar genes, y en particular, el gen de α -GT, son conocidos en la técnica y generalmente implican el proceso conocido como recombinación homóloga. En este proceso, una o ambas copias de un gen de interés de tipo silvestre pueden alterarse insertando una secuencia en el gen o genes de tipo silvestre de manera que no se produce transcripción a partir del gen o genes; o se produce una transcripción de la cual no se traduce ninguna proteína; o se produce una transcripción que dirige la síntesis de una proteína que carece, o carece sustancialmente, de la actividad funcional de la proteína de interés. Dichas construcciones normalmente incluyen toda o parte de la secuencia genómica del gen de interés y contienen, dentro de esa secuencia genómica, una secuencia que interrumpirá la expresión del gen de interés de una de las formas descritas anteriormente. La secuencia utilizada para interrumpir la expresión del gen puede ser una secuencia que codifica una proteína que confiere resistencia a los antibióticos (por ejemplo, resistencia a la neomicina) en células diana que han incorporado la construcción en sus genomas. Dicha secuencia codificante facilita la selección in vitro de células que han incorporado la construcción genética en sus genomas. Pueden usarse metodologías de selección de fármacos adicionales conocidas en la técnica para seleccionar células en las que ha tenido lugar la recombinación entre la construcción y al menos una copia del gen diana.

En algunos métodos descritos para generar animales con genes alterados, se pueden usar células totipotentes (es decir, células capaces de dar lugar a todos los tipos de células de un embrión) como células diana. Dichas células incluyen, por ejemplo, células pluripotenciales embrionarias (ES) (en forma de líneas celulares ES) o óvulos fertilizados (oocitos). Una población de células ES en la que se interrumpe al menos una copia del gen de interés se puede inyectar en blastocitos apropiados y los blastocitos inyectados se pueden implantar en madres de crianza. Como alternativa, los óvulos fertilizados inyectados con la construcción de interés disruptora de genes pueden implantarse en las madres de crianza. Además, los oocitos implantados en madres de crianza pueden ser aquellos que han sido enucleados e inyectados o fusionados con núcleos de células ES alteradas genéticamente con éxito [Campbell et al., (1996) Nature 380: 64-66]. Los descendientes que contienen mutaciones resultantes que surgen en dichas madres de crianza pueden identificarse y, a partir de estos animales fundadores, pueden producirse líneas animales distintas usando métodos de selección y cría conocidos por los expertos en la técnica. Realización divulgada: los animales transgénicos convencionales y alterados genéticamente también se pueden producir usando células somáticas (por ejemplo, fibroblastos fetales) como células diana para la alteración génica. Dichas células crecen mucho más rápido y se manipulan más fácilmente in vitro que, por ejemplo, las células ES, facilitando así la alteración del gen y los procedimientos posteriores de selección celular con genes alterados. Una vez que se ha seleccionado una línea de células somáticas alteradas genéticamente in vitro, los núcleos de las células somáticas alteradas genéticamente se pueden incorporar a las células totipotentes (por ejemplo, células ES u oocitos), que luego se manipulan como se ha descrito anteriormente. Los métodos para el trasplante nuclear son conocidos por los expertos en la técnica y pueden incluir técnicas tales como, por ejemplo, fusión celular o trasplante nuclear. Realización divulgada: lo más comúnmente posible, los procedimientos de alteración del gen dan como resultado la alteración de solo un alelo de un gen de interés. En estos casos, los animales transgénicos serán heterocigotos para el gen alterado. Se puede usar la cría de dichos heterocigotos y los procedimientos de selección apropiados familiares para los expertos en la técnica para obtener animales que son homocigóticos para el gen alterado. Naturalmente, dichos procedimientos de reproducción no son necesarios cuando el procedimiento de alteración de genes descrito anteriormente da como resultado la alteración de ambos alelos del gen de interés.

Para la producción de la CIO, generalmente se usan MTA en forma de fragmentos (es decir, partículas, hilos o fibras) (véase a continuación). La MTA se puede producir por cualquiera de una variedad de métodos. Todo lo que se requiere es que los pasos usados en su producción den como resultado matrices con las propiedades biológicas y estructurales descritas anteriormente. Los métodos de producción particularmente útiles incluyen los descritos en las Patentes de Estados Unidos n.º 4.865.871; 5.366.616; 6.933.326 y la Solicitud copendiente publicada de Estados Unidos n.º 2003/0035843 A1 y 2005/0028228 A1. En resumen, los pasos implicados en la producción de una MTA generalmente incluyen recoger el tejido de un donante (por ejemplo, un cadáver humano o cualquiera de los mamíferos mencionados anteriormente), el tratamiento químico para estabilizar el tejido y evitar la degradación bioquímica y estructural junto con, o seguida de, eliminación de células en condiciones que de manera similar preservan la función biológica y estructural. La MTA puede tratarse opcionalmente con un agente de criopreservación y criopreservarse y, opcionalmente, liofilizarse, de nuevo bajo las condiciones necesarias para mantener las propiedades biológicas y estructurales descritas de la matriz. Después de congelar o liofilizar, el tejido

se puede fragmentar, por ejemplo, pulverizar o micronizar, para producir una MTA particuladas en condiciones similares de preservación de la función. Todos los pasos generalmente se llevan a cabo en condiciones asépticas, preferentemente estériles.

- 5 Un método ejemplar de producción de MTA, que se describe con mayor detalle en la Patente de Estados Unidos n.º 5.366.616, se resume a continuación.

Después de la extracción del donante, el tejido se pone en una solución estabilizadora inicial. La solución estabilizadora inicial detiene y previene la degradación osmótica, hipóxica, autolítica y proteolítica, protege contra la contaminación microbiana y reduce el daño mecánico que puede ocurrir con los tejidos que contienen, por ejemplo, componentes del músculo liso (por ejemplo, vasos sanguíneos). La solución estabilizante generalmente contiene un tampón apropiado, uno o más antioxidantes, uno o más agentes oncóticos, uno o más antibióticos, uno o más inhibidores de la proteasa y, en algunos casos, un relajante del músculo liso.

15 El tejido se pone en una solución de procesamiento para eliminar células viables (por ejemplo, células epiteliales, células endoteliales, células de músculo liso y fibroblastos) de la matriz estructural sin dañar el complejo de la membrana basal o la integridad biológica y estructural de la matriz de colágeno. La solución de procesamiento generalmente contiene un tampón apropiado, sal, un antibiótico, uno o más detergentes, uno o más agentes para evitar la reticulación, uno o más inhibidores de la proteasa y/o una o más enzimas. El tratamiento del tejido debe ser (a) con una solución de procesamiento que contenga agentes activos a una concentración y (b) durante un período de tiempo tal que se mantenga la integridad estructural de la matriz.

Después de la descelularización, el tejido se puede congelar (es decir, crioconservar) y opcionalmente, liofilizar. Antes de la congelación, el tejido puede incubarse en una solución de crioconservación. Esta solución generalmente contiene uno o más crioprotectores para minimizar el daño del cristal de hielo a la matriz estructural que podría ocurrir durante la congelación. Si el tejido va a liofilizarse, la solución generalmente también contendrá uno o más componentes de protección en seco, para minimizar el daño estructural durante el secado y puede incluir una combinación de un disolvente orgánico y agua que no sufre expansión o contracción durante la congelación. Los agentes crioprotectores y de protección en seco pueden ser la misma sustancia o algunas otras. Si el tejido no va a liofilizarse, se puede congelar colocándolo (en un recipiente esterilizado) en un congelador a aproximadamente -80 °C, o sumergiéndolo en nitrógeno líquido estéril, y posteriormente almacenando a una temperatura inferior a -160 °C hasta su uso. La muestra puede descongelarse antes de su uso, por ejemplo, sumergiendo un recipiente estéril no permeable (véase a continuación) que contiene un baño de agua a aproximadamente 37 °C o permitiendo que el tejido llegue a la temperatura ambiente en condiciones ambientales.

Si el tejido debe congelarse y liofilizarse, después de la incubación en la solución de crioconservación, el tejido puede empaquetarse dentro de un recipiente estéril que sea permeable al vapor de agua pero impermeable a las bacterias, por ejemplo, una bolsa permeable al vapor de agua o un vial de vidrio. Un lado de la bolsa preferido consiste en una membrana Tyvek® porosa de calidad médica, un producto de marca registrada de DuPont Company of Wilmington, DE. Esta membrana es porosa al vapor de agua e impermeable a las bacterias y el polvo. La membrana Tyvek se sella térmicamente con una lámina laminada de polietileno impermeable, dejando un lado abierto, formando así una bolsa de dos lados. La bolsa abierta se esteriliza por irradiación (por ejemplo, irradiación y) antes del uso. El tejido se pone asépticamente (a través del lado abierto) en la bolsa estéril. El lado abierto se sella asépticamente por calor para cerrar la bolsa. El tejido empaquetado a partir de ahora se protege de la contaminación microbiana a lo largo de los pasos de procesamiento posteriores.

El recipiente que contiene el tejido se enfría a baja temperatura a una velocidad especificada que es compatible con la formulación crioprotectora específica para minimizar el daño por congelación. Véase la Patente de Estados Unidos n.º 5.336.616 para ejemplos de protocolos de enfriamiento apropiados. El tejido se seca después a baja temperatura en condiciones de vacío, de manera que el vapor de agua se elimina secuencialmente de cada fase de cristal de hielo.

Al finalizar el secado de las muestras en el recipiente permeable al vapor de agua, el vacío del aparato de liofilización se invierte con un gas inerte seco tal como nitrógeno, helio o argón. Mientras se mantiene en el mismo entorno gaseoso, el recipiente semipermeable se pone dentro de un recipiente impermeable (es decir, impermeable al vapor de agua así como a los microorganismos) (por ejemplo, una bolsa) que se sella adicionalmente, por ejemplo, mediante calor y/o presión. Cuando la muestra de tejido se congela y se seca en un vial de vidrio, el vial se sella a vacío con un tapón inerte apropiado y el vacío del aparato de secado se invierte con un gas inerte antes de la descarga. En cualquier caso, el producto final está sellado herméticamente en una atmósfera gaseosa inerte. El tejido liofilizado se puede almacenar en condiciones de refrigeración hasta la fragmentación o, si se desea, la rehidratación.

Las partículas de MTA tienen una forma generalmente esférica o incluso irregular, con la dimensión más larga que no es mayor de 1000 micrómetros. La MTA particulada puede fabricarse a partir de cualquiera de las MTA no particuladas descritas anteriormente mediante cualquier proceso que tenga como resultado la preservación de las

funciones biológicas y estructurales descritas anteriormente y, en particular, se debe minimizar el daño a las fibras de colágeno, incluidos los extremos de fibras cortadas.

Un método apropiado para fabricar MTA particuladas se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 6.933.326. El proceso se describe brevemente a continuación con respecto a una MTA dérmica liofilizada, pero un experto en la técnica podría adaptar fácilmente el método para su uso con MTA congelada o liofilizada derivada de cualquiera de los otros tejidos enumerados en este documento.

La matriz dérmica acelular se puede cortar en tiras (utilizando, por ejemplo, un mallador Zimmer equipado con una rueda de corte "continua" sin interrupción). Las tiras largas resultantes se cortan entonces en longitudes de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 2 cm. Un homogeneizador y una sonda homogeneizadora esterilizada (por ejemplo, un homogeneizador LabTeck Macro disponible en OMNI International, Warrenton, VA) se ensamblan y se enfría a temperaturas criogénicas (es decir, de aproximadamente -196 °C a aproximadamente -160 °C) utilizando nitrógeno líquido estéril que se vierte en la torre homogeneizadora. Una vez que el homogeneizador ha alcanzado una temperatura criogénica, se añaden trozos de MTA a la torre de homogeneización que contiene el nitrógeno líquido. El homogeneizador se activa entonces para fracturar criogénicamente las piezas de MTA. El tiempo y la duración de la etapa de fracturación criogénica dependerán del homogeneizador utilizado, el tamaño de la cámara de homogeneización, y la velocidad y el tiempo de funcionamiento del homogeneizador, y son fácilmente determinables por un experto en la técnica. Como alternativa, el proceso de crio fracturación se puede llevar a cabo en refrigeración criogénica a una temperatura criogénica.

La MTA particulada crio-fracturada se clasifica, opcionalmente, por el tamaño de partícula lavando el producto de la homogeneización con nitrógeno líquido estéril a través de una serie de tamices metálicos que también se han enfriado a una temperatura criogénica. En general, es útil eliminar partículas grandes no deseadas con un tamiz de un tamaño de poro relativamente grande antes de proceder a uno (o más tamices) con un tamaño de poro más pequeño. Una vez aisladas, las partículas se pueden liofilizar para asegurarse de que se elimine toda la humedad residual que pueda haber sido absorbida durante el procedimiento. El producto final es un polvo (habitualmente blanco o blanquecino) que generalmente tiene un tamaño de partícula de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 900 micrómetros, de aproximadamente 30 micrómetros a aproximadamente 750 micrómetros, o de aproximadamente 150 a aproximadamente 300 micrómetros.

Los fragmentos de MTA también pueden ser fibras o hilos. Dichas fibras o hilos generalmente no deberían ser mayores de 5 cm (por ejemplo, no superiores a: 4,5 cm, 4,0 cm, 3,5 cm, 3,0 cm, 2,5 cm, 2,0 cm, 1,5 cm, 1,0 cm, 0,5 cm, 0,25 cm; 0,1 cm; 0,05 cm; o 0,02 cm) de longitud y no más de 3 mm (por ejemplo, no superiores a: 2,5 mm; 2,0 mm; 1,5 mm; 1,0 mm; 0,5 mm; 0,2 mm; 0,1 mm; 0,05 mm; 0,02 mm o 0,01 mm) en su punto más ancho. Los métodos para producir fibras e hilos a partir de MTA congeladas o liofilizadas serían evidentes para los expertos en la técnica e incluyen tanto el corte manual como el mecanizado de la MTA congelada o liofilizada.

La MTA fragmentada se rehidrata fácilmente mediante suspensión en solución salina normal o cualquier otro agente rehidratante adecuado conocido en la técnica. También puede suspenderse en cualquier vehículo adecuado conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 5.284.655 incorporada en su totalidad en este documento como referencia). Si se suspende a una alta concentración (por ejemplo, a aproximadamente 600 mg/ml), la MTA fragmentada puede formar una "masilla", y si se suspende a una concentración algo menor (por ejemplo, aproximadamente 330 mg/ml), puede formar una "pasta". El método descrito anteriormente puede aplicarse a cualquier forma de MTA almacenada, por ejemplo, una MTA fragmentada que se ha liofilizado o MTA fragmentada que se ha congelado.

Una MTA liofilizada muy adecuada se produce a partir de dermis humana LifeCell Corporation (Branchburg, NJ) y se comercializa en forma de láminas pequeñas como AlloDerm®. Dichas láminas se comercializan por LifeCell Corporation como láminas rectangulares con unas dimensiones de, por ejemplo, 1 cm x 2 cm, 3 cm x 7 cm, 4 cm x 8 cm, 5 cm x 10 cm, 4 cm x 12 cm y 6 cm x 12 cm. El crioprotector utilizado para congelar y secar AlloDerm® es una solución del 35 % de maltodextrina y etilendiaminotetraacetato (EDTA) 10 mM. De este modo, el producto seco final contiene aproximadamente el 60 % en peso de MTA y aproximadamente el 40 % en peso de maltodextrina. LifeCell Corporation también fabrica un producto análogo fabricado con dermis porcina (designada XenoDerm™) con las mismas proporciones de MTA y maltodextrina que AlloDerm®. Además, LifeCell Corporation comercializa una matriz dérmica acelular particulada fabricada mediante crio-fractura de AlloDerm® (como se ha descrito anteriormente) bajo el nombre de Cymetra®. El tamaño de partícula para Cymetra está en el intervalo de aproximadamente 60 micrómetros a aproximadamente 150 micrómetros, según lo determinado por la masa. Las partículas de MTA particuladas o pulverizadas (en polvo) serán menores a 1,0 mm en su dimensión más larga. Los trozos de MTA con dimensiones superiores a esta son matrices acelulares no particuladas.

Matriz ósea desmineralizada

Como se usa en el presente documento, "matriz ósea desmineralizada" (MOD) se refiere al hueso que se ha tratado para eliminar la totalidad o sustancialmente la totalidad de los componentes minerales inorgánicos. La MOD de la cual se ha eliminado sustancialmente la totalidad de los componentes minerales es una matriz ósea que tiene

menos del 5 % de la concentración mineral de la encontrada en el hueso del que se preparó la MOD. Los procedimientos de extracción responsables de la desmineralización también eliminan todas o sustancialmente todas las células viables de la matriz ósea. La MOD de la cual se han eliminado sustancialmente todas las células viables es una matriz ósea que tiene menos del 1 % (por ejemplo, menos del: 0,1 %, 0,01 %, 0,001 %, 0,0001 %, 0,00001 %, 0,000001 % o 0,0 %) de la concentración de células viables encontradas en el hueso del que se preparó la MOD.

El componente proteico principal de la MOD es el colágeno, que representa el 70-90 % del componente no mineralizado de la matriz ósea. Otros constituyentes de proteína de matriz no colágeno incluyen glicoproteínas, por ejemplo, osteonectina y trombospodina; proteoglicanos, por ejemplo, biglicano y decorina; sialoproteínas, por ejemplo, osteopontina y sialoproteína ósea; y proteínas Gla de hueso, por ejemplo, osteocalcina. La matriz ósea es rica en factores de crecimiento, un grupo diverso de péptidos y pequeñas proteínas que regulan la formación de nuevos tejidos a través de sus efectos sobre el crecimiento, la función y la motilidad de las células. La MOD normalmente incluye proteínas morfogenéticas óseas (PMO), una familia de factores de crecimiento multifuncionales con fuertes capacidades para inducir la formación de hueso o cartílago nuevo, así como otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) que desempeña papeles críticos en la regulación del crecimiento óseo.

La MOD posee la mayoría, idealmente todas, las propiedades biológicas del hueso nativo que son importantes para un injerto óseo exitoso. La MOD es osteoinductiva. Las PMO y otros factores de crecimiento en la MOD indican a las células pluripotenciales mesenquimales para que diferencien en células osteoprogenitoras para producir nuevo crecimiento óseo. Por lo tanto, la MOD permite que ocurra la regeneración a lo largo de un defecto que necesita reparación en lugar de solo en los bordes de un defecto. La MOD también es osteoconductiva, ya que es compatible con la neovascularización y la invasión de los osteoblastos.

La MOD se puede preparar a partir de uno o más individuos de la misma especie que el receptor de la CIO; también se puede preparar a partir de individuos de una especie diferente que el receptor de la CIO. Por lo tanto, por ejemplo, una MOD se puede haber preparado a partir de un tejido porcino y usarse para hacer una CIO que se pueda implantar en un paciente humano. Las especies que pueden servir como receptoras de la CIO y donantes de tejidos u órganos para la producción de la MOD incluyen, sin limitación, seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos, mandriles o chimpancés), cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas, perros, gatos, conejos, conejillos de indias, jerbos, hámsteres, ratas o ratones. La MOD también se puede producir a partir de animales (por ejemplo, cerdos) que se han modificado genéticamente para que carezcan del resto galactosa- α -1,3-galactosa terminal. La producción de dichos animales transgénicos se ha descrito anteriormente.

La MOD se puede producir a partir de huesos largos, de la bóveda craneal o cualquier otro tipo de hueso. Normalmente, la MOD puede derivarse, por ejemplo, del tejido óseo de cadáver humano que se recoge no más de aproximadamente 24 horas post mortem. La recolección se realiza después de revisar el historial médico detallado del donante y la familia del donante. La sangre del donante se analiza para detectar diversas afecciones patógenas, por ejemplo, anticuerpos contra la hepatitis A, antígeno de superficie de la hepatitis B, anticuerpos del núcleo de la hepatitis B, anticuerpos contra la hepatitis C, anticuerpos del virus VIH-1 y 2, antígeno directo del VIH, anticuerpo del virus-1/2 de linfoma de células T humanas, sífilis y bacterias aeróbicas y anaeróbicas. Los tejidos circundantes también se analizan para contaminantes superficiales y medulares.

La MOD se puede preparar por una variedad de métodos. Todo lo que se requiere es que el método utilizado dé como resultado la producción de la MOD con las propiedades biológicas y estructurales descritas anteriormente (véase más arriba). Las normas y directrices para la preparación de la MOD a partir de tejidos humanos han sido desarrolladas por la United States Pharmacopeia y la American Association of Tissue Banks. Esencialmente, las muestras óseas se tratan para eliminar tejido, sangre y lípidos, se fragmentan a un tamaño relativamente uniforme, se desmineralizan por extracción con ácido, se esterilizan y liofilizan para su almacenamiento a largo plazo.

Después de la prueba inicial, las muestras óseas se despojan de tejido blando. Para el transporte, el hueso puede incubarse en una solución de agentes antimicrobianos, por ejemplo, bacitracina y polimixina B. Las muestras de hueso se pueden cortar en trozos pequeños utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, utilizando sierras y rectificadoras, y posteriormente se tratan para eliminar la médula ósea, la sangre y los lípidos. Los procedimientos típicos para la extracción de médula ósea, sangre y lípidos pueden incluir la incubación en etanol al 70 % o una mezcla 1:1 de cloroformo:metanol durante 6 horas a temperatura ambiente. La desmineralización puede llevarse a cabo mediante extracción con ácido, por ejemplo, ácido clorhídrico 0,6 N durante 3-24 horas. La extracción de ácido reduce el contenido de calcio a menos del 5 % del encontrado en la matriz ósea no desmineralizada. Los expertos en la técnica conocen los métodos para medir el contenido de calcio en los huesos. Las muestras luego se pueden enjuagar con agua y neutralizarse en un tampón biológicamente compatible, por ejemplo, fosfato de sodio 0,1 M. También se pueden incluir otros procedimientos de extracción diferencial, por ejemplo, extracción con álcali-urea para eliminar moléculas que puedan tener efectos inhibidores sobre la osteoinducción [Behnam et al. (2004) Connective Tissue Research 45: 257-60]. La MOD también se puede preparar como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.284.655. Para la producción de la CIO, generalmente se usan MOD en forma de fragmentos (por ejemplo, partículas, fibras e hilos) (véase a continuación). Los fragmentos

de la MOD se pueden producir mediante cualquiera de una variedad de métodos. Todo lo que se requiere es que los pasos utilizados en su producción den como resultado matrices con las propiedades biológicas y estructurales descritas anteriormente. Dichos procedimientos son similares a los utilizados para fabricar fragmentos de MTA de MTA congeladas o secas (por ejemplo, liofilizadas) (véase más arriba). Los fragmentos de la MOD pueden tener una forma irregular y una distribución de tamaño no uniforme. La molienda de la matriz ósea en partículas de tamaño apropiado se puede llevar a cabo en varios puntos durante la preparación, por ejemplo, después de la eliminación de lípidos o después de la extracción de ácido. El proceso de molienda normalmente se lleva a cabo usando una trituradora o mezcladora convencional y se puede realizar en matriz ósea húmeda o seca. Las fibras de la MOD se pueden producir como virutas de matriz ósea. Los tamaños de partícula de la MOD generalmente son los mismos que los de MTA particuladas (véase más arriba). Por ejemplo, la dimensión más larga para una partícula de la MOD puede variar de 50-3000 micrómetros; por ejemplo, 100-250 micrómetros; 100-500 micrómetros; 100-850 micrómetros; 100-1000 micrómetros; 100-1500 micrómetros; 100-2000 micrómetros; 100-2500 micrómetros; 100-3000 micrómetros; 125-300 micrómetros; 125-500 micrómetros; 125-600 micrómetros; 125-850 micrómetros; 200-500 micrómetros; 200-850 micrómetros; 200-1000 micrómetros; 200-1500 micrómetros; 200-2000 micrómetros; 200-3000 micrómetros; 500-1000 micrómetros; 500-1500 micrómetros; 500-2000 micrómetros; 500-2500 micrómetros; 500-3000 micrómetros; 1000-2000 micrómetros; 1000-2500 micrómetros; o 1000-3000 micrómetros. Se pueden obtener partículas de tamaños particulares usando tamices disponibles en el mercado. Los fragmentos de la MOD se pueden preparar como se describe en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.284.655 y 5.510.396. Para el almacenamiento a largo plazo, la MOD fragmentada puede someterse a uno o más ciclos de liofilización. La liofilización se puede llevar a cabo como se describe para la MTA (véase más arriba). La esterilización puede realizarse en las muestras de la MOD usando cualquier método convencional, por ejemplo, tratamiento con óxido de etileno, irradiación y, irradiación con haz de electrones, irradiación con rayos X o irradiación ultravioleta.

La MOD también se puede obtener de fuentes comerciales, incluido cualquier banco de tejidos de la AATT, por ejemplo, LifeLink (Tampa, FL), LifeNet (Virginia Beach, VA) o AlloSource (Centennial, Colorado). Los ejemplos de la MOD incluyen Accell DBM100 (IsoTis OrthoBiologics, Irvine, California), Accell Connexus™ (IsoTis OrthoBiologics, Irvine, California), Allogro (AlloSource, Denver, Colorado), AlloMatrix Putty (Wright Medical Technologies, Arlington, Tennessee), DBX® Putty (Synthes, Paoli, Pennsylvania), DynaGraft™ (GenSci Regeneration Sciences and Innova Technologies Corporation, Toronto, Ontario, Canadá), Grafton™ Allogenic Bone Matrix (Osteotech, Shrewsbury, Nueva Jersey), InterGro™ Putty (Interpore Cross International, Irvine, California), Opteform (Exactech, Gainesville, Florida), Optium (LifeNet, Virginia Beach, Virginia) y Osteofil™ (Regeneration Technologies, Alachua,

Se proporciona una preparación muy adecuada de la MOD particulada con AlloCraft-MOD™ (LifeCell Corporation, Branchburg, NJ).

II. Preparación de la CIO

Formación de la CIO

La CIO proporcionada en este documento es un compuesto de MTA fragmentada y MOD fragmentada. La MTA fragmentada y la MOD fragmentada se pueden mezclar en cualquier proporción que varíe, en peso, desde el 5 % de MTA:95 % de MOD hasta el 95 % de MTA:5 % de MOD, por ejemplo, 5 % de MTA:95 % de MOD; 10 % de MTA:90 % de MOD; 15 % de MTA:85 % de MOD; 20 % de MTA:80 % de MOD; 25 % de MTA:75 % de MOD; 30 % de MTA:70 % de MOD; 35 % de MTA:65 % de MOD; 40 % de MTA:60 % de MOD; 45 % de MTA:55 % de MOD; 50 % de MTA:50 % de MOD; 55 % de MTA:45 % de MOD; 60 % de MTA:40 % de MOD; 65 % de MTA:35 % de MOD; 70 % de MTA:30 % de MOD; 75 % de MTA:25 % de MOD; 80 % de MTA:20 % de MOD; 85 % de MTA:15 % de MOD; 90 % de MTA:10 % de MOD, 95 % de MTA:5 % de MOD.

Se puede combinar cualquier tipo de MTA fragmentada y MOD fragmentada. Por lo tanto, se puede combinar cualquier forma de MTA fragmentada, por ejemplo, partículas, hilos o fibras con cualquier forma de MOD fragmentada, por ejemplo, partículas, hilos o fibras. También se puede combinar más de un tipo de MTA fragmentada y MOD fragmentada, por ejemplo, la MTA fragmentada puede incluir una mezcla de partículas, fibras o hilos de MTA y la MOD puede incluir una mezcla de partículas, fibras o hilos de MOD. Se puede usar cualquier combinación de diferentes formas de MTA fragmentada y MOD fragmentada. Por lo tanto, tanto la MTA fragmentada como la MOD fragmentada pueden haberse liofilizado; o la MTA fragmentada y liofilizada o la MOD fragmentada y liofilizada se pueden combinar con MTA fragmentada congelada o MOD fragmentada congelada, o tanto la MTA fragmentada como la MOD fragmentada pueden haberse congelado.

Las mezclas de MTA fragmentada/MOD fragmentada utilizadas para la formación de la CIO están sustancialmente hidratadas. Las mezclas sustancialmente hidratadas pueden tener niveles de humedad entre el 20 % y el 70 %, es decir, al menos el 20-30 % de matrices totalmente hidratadas. Las matrices totalmente hidratadas son matrices que contienen la cantidad máxima de agua unida y no unida posible para esa matriz a presión atmosférica.

Tal como se usa en la presente memoria, las mezclas de MTA fragmentada/MOD fragmentada que están sustancialmente hidratadas contienen no menos del 20 % (por ejemplo, no menos del: 20 %; 25 %; 30 %; 35 %; 40 %; 45 %; 50 %; 55 %; 60 %; 65 %; 70 %) del agua que contiene la mezcla de MTA fragmentada/MOD

fragmentada relevante cuando está completamente hidratada. Como se usa en el presente documento, una "mezcla de MTA fragmentada/MOD fragmentada totalmente hidratada" es una mezcla de MTA fragmentada/MOD fragmentada que contiene la cantidad máxima de agua unida y no unida posible para dicha mezcla de MTA fragmentada/MOD fragmentada a presión atmosférica. Al comparar las cantidades de agua (unida y/o no unida) en dos (o más) mezclas de MTA fragmentadas/MTA fragmentadas totalmente hidratadas, dado que la cantidad máxima de agua que una mezcla de MTA fragmentada/MOD fragmentada preparada a partir de cualquier tejido en particular varía con la temperatura de la mezcla de MTA fragmentada/MOD fragmentada, naturalmente, es importante que las mediciones para las dos (o más) mezclas de MTA fragmentada/MOD fragmentada se realicen a la misma temperatura. El agua unida en una mezcla de MTA fragmentada/MOD fragmentada es el agua en la mezcla de MTA fragmentada/MOD fragmentada cuya movilidad molecular (rotacional y traslacional) es reducida (en comparación con la pura voluminosa) debido a las interacciones moleculares (por ejemplo, enlaces de hidrógeno) entre el agua y las moléculas de la mezcla de MTA fragmentada/MOD fragmentada y/u otros fenómenos (por ejemplo, tensión superficial y restricción geométrica) que limitan la movilidad del agua en la mezcla de MTA fragmentada/MOD fragmentada. El agua no unida dentro de la mezcla de MTA fragmentada/MOD fragmentada tiene las mismas propiedades de movilidad molecular que el agua voluminosa en soluciones acuosas diluidas tales como, por ejemplo, fluidos biológicos. Tal como se usa en la presente memoria, una "mezcla de MTA fragmentada/MOD fragmentada sustancialmente hidratada" es una mezcla de MTA fragmentada/MOD fragmentada que contiene, a presión atmosférica, más del 20 % (por ejemplo, más del 20 %; 25 %; 30 %; 35 %; 40 %; 45 %; 50 %; 55 %; 60 %; 65 %; 70 %) del agua no unida y/o unida que contendría la misma mezcla de MTA fragmentada/MOD fragmentada a presión atmosférica cuando estuviera completamente hidratada. Las mediciones de las cantidades de agua en la mezcla de MTA fragmentada/MOD fragmentada sustancialmente hidratada y completamente hidratada se deben hacer a la misma temperatura.

Como se usa en el presente documento, el término "temperatura ambiente" significa temperaturas de entre 2 °C y 30 °C (por ejemplo, 4 °C a 10 °C; 4 °C a 15 °C; 4 °C a 25 °C; 4 °C a 30 °C; 10 °C a 15 °C; 10 °C a 20 °C; 10 °C a 25 °C; 10 °C a 30 °C; 15 °C a 20 °C; 15 °C a 25 °C; 15 °C a 30 °C; 20 °C a 25 °C; 20 °C a 30 °C; o 25 °C a 30 °C).

Con respecto a la MTA fragmentada liofilizada, es importante minimizar las fuerzas osmóticas y los efectos de la tensión superficial durante la rehidratación. El objetivo de la rehidratación es aumentar la conservación selectiva de la matriz de soporte extracelular. La rehidratación apropiada se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante una incubación inicial de la MTA fragmentada seca en un entorno de aproximadamente el 100 % de humedad relativa, seguido de la inmersión en una solución de rehidratación adecuada. Como alternativa, la MTA fragmentada seca puede sumergirse directamente en la solución de rehidratación, sin incubación previa, en un entorno de alta humedad. La rehidratación no debe causar daño osmótico a la muestra. La rehidratación con vapor idealmente debería alcanzar un nivel de humedad residual de al menos el 15 % y la rehidratación de fluidos debería dar como resultado un nivel de humedad de la MTA fragmentada de entre el 20 % y el 70 %. Dependiendo de la MTA fragmentada que se rehidrate, la solución de rehidratación puede ser, por ejemplo, solución salina normal, PBS, lactato de Ringer o un medio de cultivo celular estándar. Cuando la MTA fragmentada está sujeta a la acción de colagenasas endógenas, elastasas o actividad autolítica residual de células previamente eliminadas, se preparan aditivos para la solución de rehidratación y se incluyen inhibidores de la proteasa. Cuando haya presente actividad residual de radicales libres, se usan agentes para proteger contra radicales libres que incluyen antioxidantes y agentes enzimáticos que protegen contra el daño de radicales libres. También se pueden incluir antibióticos para inhibir la contaminación bacteriana. También se pueden incluir agentes oncóticos en forma de proteoglicanos, dextrano y/o aminoácidos para prevenir el daño osmótico a la matriz durante la rehidratación. La rehidratación de una muestra seca es especialmente adecuada para este proceso, ya que permite una distribución rápida y uniforme de los componentes de la solución de rehidratación. Además, las soluciones de rehidratación pueden contener componentes específicos, por ejemplo, difosfonatos para inhibir la fosfatasa alcalina y prevenir la calcificación posterior. También se pueden incluir agentes en la solución de rehidratación para estimular la neovascularización y la infiltración de la célula huésped después del trasplante de la matriz extracelular rehidratada. La rehidratación y las etapas de mezcla pueden tener lugar en cualquier orden. Por lo tanto, la MTA fragmentada y la MOD fragmentada pueden rehidratarse por separado y posteriormente mezclarse, o mezclarse y posteriormente rehidratarse.

La MTA fragmentada y la MOD fragmentada se pueden mezclar en cualquier método que mantenga las propiedades osteoinductivas de la CIO. Por ejemplo, la MTA fragmentada y la MOD fragmentada pueden ponerse en un contenedor o recipiente y mezclarse con una espátula. Otro método adecuado de mezcla es a través del movimiento recíproco de la MTA fragmentada y MOD fragmentada en dos jeringas luer bloqueadas para formar una masilla homogénea.

La consistencia de la mezcla utilizada para hacer la CIO puede variar dependiendo de la concentración de los componentes de la matriz. Si las matrices se suspenden a una concentración relativamente baja, el material puede formar una pasta; en concentraciones más altas, el material puede formar una masilla semisólida. Los expertos en la técnica podrían establecer, utilizando experimentación completamente rutinaria, proporciones relativas de una MTA fragmentada de interés y una MOD fragmentada de interés para mezclar con el fin de obtener una mezcla con una consistencia particular deseada.

Una vez que los componentes de la MTA fragmentada y la MOD fragmentada se han mezclado, se pueden moldear en una forma adecuada para su uso en injertos óseos. Los materiales se pueden alicuotar directamente en jeringas para su posterior procesamiento. Como alternativa, la mezcla se puede moldear o conformar en cualquier forma que sea de un tamaño o forma conveniente para su uso en injertos óseos. Dichas formas pueden incluir, sin limitación, hojas, cubos, rectángulos, discos, cuñas, esferas, óvalos, cilindros, conos o poliedros o cualquier forma que imite la forma del hueso nativo. La CIO también se puede moldear o conformar alrededor de un componente de andamiaje preparado a partir de cualquier material natural o sintético apropiado.

La mezcla puede secarse mediante cualquier método conocido en la técnica que dé como resultado la conservación de la osteoinductividad, por ejemplo, secado al aire, secado en atmósfera, o bajo una corriente, de gas inerte (por ejemplo, nitrógeno o argón), o secado en frío. La liofilización es una técnica de rutina utilizada en la materia (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos n.º: 4.619.257; 4.676.070; 4.799.361; 4.865.871; 4.964.280; 5.024.838; 5.044.165; 5.154.007; 6.194.136; 5.336.616; 5.364.756; y 5.780.295) y el equipo adecuado está disponible en fuentes comerciales como Labconco (Kansas City, MI, Estados Unidos). La liofilización implica la eliminación de agua u otro disolvente de un producto congelado mediante un proceso llamado sublimación. La sublimación ocurre cuando un líquido congelado pasa directamente al estado gaseoso sin pasar por la fase líquida. Los expertos en la técnica son conscientes de las diferentes metodologías de liofilización disponibles en la materia [véase, por ejemplo, "A Guide to Freeze-drying for the Laboratory"- una publicación de servicio de la industria de Labconco, (2004); y Franks (1994) Proc. Inst. Refrigeration. 91: 32-39]. La liofilización se puede llevar a cabo mediante cualquiera de una variedad de métodos, que incluyen, por ejemplo, los métodos de colector múltiple, por lotes o a granel.

Generalmente, la CIO se rehidrata antes del injerto o la implantación. Como alternativa, la CIO se puede injertar o implantar sin rehidratación previa; en este caso, la rehidratación ocurre in vivo. Para la rehidratación, la CIO puede incubarse en cualquier solución biológicamente compatible, por ejemplo, solución salina normal, solución salina tamponada con fosfato, lactato de Ringer o medio de cultivo celular estándar. La CIO se incuba en una solución durante un tiempo suficiente para que la CIO se hidrate por completo o para que recupere sustancialmente la misma cantidad de agua que contiene la mezcla con la que se fabricó la CIO. En general, el tiempo de incubación en la solución de rehidratación será de aproximadamente dos minutos a aproximadamente una hora, por ejemplo, de aproximadamente cinco minutos a aproximadamente 45 minutos, o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos. La solución de rehidratación opcionalmente puede reemplazarse con solución nueva tantas veces como se desee. Esto puede ser deseable cuando uno o más de los agentes de reemplazo de agua utilizados en el proceso de reemplazo de agua no sea biológicamente compatible o sea tóxico. La temperatura de las incubaciones generalmente será temperatura ambiente (por ejemplo, de la habitación) o puede estar entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 40 °C, por ejemplo, entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 35 °C, y el recipiente que contiene la CIO y la solución de rehidratación se puede agitar suavemente durante la incubación si así se desea. Después de la rehidratación, la CIO se puede conformar o moldear adicionalmente en una forma adecuada para la implantación.

La consistencia de la CIO rehidratada varía según la cantidad de líquido añadido a la CIO. Por ejemplo, si se añade una cantidad relativamente grande de fluido, la CIO puede formar una pasta después de su adición; si se añade una cantidad relativamente baja de fluido, la CIO puede formar una masilla semisólida después de su adición. Los expertos en la materia podrán establecer, utilizando experimentación completamente rutinaria, cantidades relativas de fluido para añadir a una CIO de interés con el fin de obtener una CIO rehidratada con una consistencia deseada.

La CIO puede contener una o más sustancias (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12) (por ejemplo, compuestos de maltodextrina y polihidroxilo en general) que pueden mejorar la capacidad de la MOD para formar composiciones similares a pasta o de tipo masilla tras la rehidratación. En general, los componentes de la MTA de la CIO proporcionan esta función y la CIO de la invención puede no contener dichas sustancias portadoras. Cuando la CIO contiene las sustancias portadoras, se pueden añadir a la mezcla que se seca (por ejemplo, por liofilización) para crear la CIO (véase más arriba). Así, por ejemplo, la MTA, la MOD o ambas preparaciones de MTA y MOD utilizadas para crear dichas mezclas, pueden contener las sustancias portadoras. Como alternativa, las sustancias portadoras se pueden añadir a la CIO antes, al mismo tiempo que, o después de la rehidratación de la CIO. Sustancias portadoras adecuadas, y en particular los compuestos de polihidroxilo adecuados, se describen en las patentes de Estados Unidos n.º 5.284.655 y 5.510.396, cuyas descripciones se incorporan en su totalidad en este documento como referencia.

Osteoinductividad

La CIO como se proporciona en este documento es osteoinductiva, es decir, puede inducir la formación de hueso nuevo en o sobre tejido óseo o en o sobre tejido no óseo en un receptor estimulando el reclutamiento de células pluripotenciales formadoras de hueso. Aunque la invención no está limitada por ningún mecanismo de acción particular, el crecimiento óseo generalmente está mediado por tres tipos de células, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos que son responsables respectivamente de la producción, mantenimiento y resorción del hueso. La osteoinductividad de la CIO puede evaluarse mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Se han desarrollado ensayos tanto in vivo como in vitro para la osteoinductividad. Los modelos in vivo pueden incluir la implantación de la CIO en un sitio intramuscular en un modelo animal comprometido con el sistema

inmunitario, por ejemplo, una rata o un ratón sin pelo, o un análisis de la CIO en modelos de defectos esqueléticos. La cantidad de hueso producido en un sitio de implantación puede evaluarse mediante métodos convencionales que incluyen análisis histomorfométricos, mediciones de contenido de calcio o ensayos enzimológicos que controlan los niveles de enzimas que son abundantes en osteoblastos formadores de hueso, por ejemplo, fosfatasa alcalina. Los modelos de cultivo celular in vitro también se pueden usar para evaluar el potencial osteoinductivo. Se ha demostrado que ciertas líneas celulares, por ejemplo, células de osteosarcoma Saos 2, proliferan cuando se cultivan en presencia de agentes osteoinductores; un índice de esta actividad proliferativa puede correlacionarse con el potencial osteoinductor de la CIO.

Almacenamiento

La CIO deshidratada puede almacenarse durante un período de tiempo prolongado, por ejemplo, 1 día, 2 días, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 1 año, 2 años, 3 años. El almacenamiento puede realizarse a temperatura ambiente o en refrigeración, por ejemplo, en líquido N₂ o a -80 °C, -50 °C, -20 °C, -10 °C, 0 °C, 4 °C, 10 °C, 20 °C o 25 °C.

Opcionalmente, la CIO puede someterse a tratamientos para disminuir la biocarga. Se espera que este proceso disminuya el nivel de microorganismos infecciosos dentro de la CIO. Como se usa en este documento, un proceso utilizado para inactivar o matar "sustancialmente todos" los microorganismos (por ejemplo, bacterias, hongos (incluyendo levaduras) y/o virus) en la CIO es un proceso que reduce el nivel de microorganismos en la CIO por lo menos 10 veces (por ejemplo, al menos: 100 veces, 1000 veces, 10⁴ veces, 10⁵ veces, 10⁶ veces, 10⁷ veces, 10⁸ veces, 10⁹ veces o incluso 10¹⁰ veces) en comparación con el nivel en la CIO antes del proceso. Se puede usar cualquier método de ensayo convencional para determinar si el proceso ha tenido éxito. Estos ensayos pueden incluir técnicas que miden directamente el crecimiento microbiano, por ejemplo, el cultivo de muestras de hisopo en medios de crecimiento artificiales, o métodos de detección molecular, tales como PCR cuantitativa. La CIO según la invención se irradia, en particular la CIO puede exponerse a radiación γ , x, haz de electrones, y/o ultravioleta (longitud de onda de 10 nm a 320 nm, por ejemplo, de 50 nm a 320 nm, de 100 nm a 320 nm, de 150 nm a 320 nm, de 180 nm a 320 nm, o de 200 nm a 300 nm) para disminuir el nivel de, o eliminar, bacterias viables y/o hongos y/o virus infecciosos. Más importante que la dosis de radiación a la que está expuesto la CIO es la dosis absorbida por la CIO. Mientras que para una CIO más gruesa, la dosis absorbida y la dosis de exposición generalmente estarán cercanas, en una CIO más delgada la dosis de exposición puede ser mayor que la dosis absorbida. Además, si se administra una dosis particular de radiación a una tasa de dosis baja durante un período de tiempo prolongado (por ejemplo, de dos a 12 horas), se absorbe más radiación que si se administra a una tasa de dosis alta durante un breve período de tiempo (por ejemplo, de 2 segundos a 30 minutos). Un experto en la técnica sabrá cómo evaluar si, para una CIO particular, la dosis absorbida es significativamente inferior a la dosis a la que está expuesta la CIO y cómo explicar esa discrepancia al seleccionar una dosis de exposición. Las dosis absorbidas apropiadas de irradiación con rayos γ , x o haz de electrones pueden ser de 6 kGy-45 kGy, por ejemplo, 8 kGy-38 kGy, 10 kGy-36 kGy, 12 kGy-34 kGy. Por lo tanto, la dosis de irradiación con rayos γ , x o haz de electrones puede ser, por ejemplo, de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 o 34 kGy.

Los componentes de la CIO, la MTA fragmentada y la MOD fragmentada, mezclados o separados, pueden irradiarse (a cualquiera de las dosis anteriores) en cualquier etapa de la preparación de la CIO. Además, la irradiación de la CIO puede ser la segunda o incluso la tercera exposición de los componentes de la CIO a la irradiación. Así, por ejemplo, la MTA fragmentada y la MOD fragmentada pueden irradiarse por separado, mezclarse para formar la CIO y posteriormente la CIO puede irradiarse.

La CIO también se puede esterilizar con ácido peracético. (Véase, Patente de Estados Unidos n.º 5.460.962 cuya descripción se incorpora en su totalidad en este documento como referencia). De este modo, el ácido peracético se puede añadir, por ejemplo, a la mezcla de MTA fragmentada/MOD fragmentada antes del secado de la mezcla.

Generalmente, la CIO se transporta al hospital o centro de tratamiento apropiado antes de la rehidratación y la rehidratación la realiza el personal clínico inmediatamente antes del injerto o la implantación. Sin embargo, la rehidratación se puede realizar antes del transporte al hospital o centro de tratamiento; en este caso, la CIO generalmente se transportará en condiciones de refrigeración. El transporte puede realizarse a través de portadores convencionales y bajo condiciones convencionales relativas a la exposición a la temperatura y tiempos de entrega normales.

III. Tratamiento de trastornos óseos

Trastornos óseos

Las CIO proporcionadas en este documento son útiles para tratar cualquiera de una amplia gama de trastornos óseos que requieren mejora o reparación. Los trastornos óseos pueden surgir de diversas condiciones médicas, por ejemplo, lesiones traumáticas, malformaciones congénitas, resecciones oncológicas e infección. Común a todos estos trastornos son los defectos en el sitio de curación que son particularmente vulnerables a uniones o no uniones retrasadas. Por lo tanto, las aplicaciones de injerto óseo incluyen aumento de curación de fracturas, reconstrucción

de defectos esqueléticos, fusión de articulaciones, procedimientos de reconstrucción articular, fracturas de calcáneo conminutas, empaquetaduras para artrodesis, es decir, fusión inducida quirúrgicamente o espontánea de una articulación, relleno de espacios en el hueso que surgen como resultado de la resección de tumores óseos y relleno de espacios en el hueso infectado desbridado.

Ciertos grupos de pacientes tienen un alto riesgo de trastornos óseos. La CIO proporcionada en este documento se puede usar para tratar afecciones derivadas de estos trastornos. Por ejemplo, los pacientes con afecciones que resultan en huesos débiles, por ejemplo, osteoporosis u osteogénesis imperfecta, tienen una alta propensión a la fractura o lesión grave. Otras condiciones médicas pueden impedir el proceso normal de curación de fracturas. Los individuos en desventaja para la curación ósea incluyen aquellos con condiciones en las que la resorción ósea se produce a un ritmo mayor que la deposición ósea tal como osteoporosis, osteopenia, neuroartropatía de Charcot, así como aquellos pacientes expuestos a agentes que comprometen la curación ósea, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, medicamentos antiinflamatorios no esteroideos o nicotina sistémica resultante del tabaquismo.

Por lo tanto, la CIO proporcionada en este documento se puede usar para la reparación de huesos con cualquiera de los daños o defectos descritos anteriormente. La CIO se puede usar en cualquiera de sus formas y prepararse mediante cualquiera de los procesos enumerados anteriormente. Los huesos a los que se pueden aplicar dichos métodos de tratamiento incluyen, sin limitación, huesos largos (por ejemplo, tibia, fémur, húmero, radio, cúbito o peroné), huesos de la mano y el pie (por ejemplo, hueso calcáneo o hueso del escafoide), huesos de la cabeza y el cuello (por ejemplo, hueso temporal, hueso parietal, hueso frontal, maxilar superior, mandíbula) o vértebras. Como se ha mencionado anteriormente, los defectos de separación crítica del hueso se pueden tratar con la CIO. En dichos defectos de separación crítica, las separaciones pueden llenarse con, por ejemplo, una masilla de la CIO rehidratada o con cualquier forma de la CIO moldeada y conformada como se ha descrito anteriormente.

La CIO también se puede utilizar para ayudar en la incorporación de otros materiales de injerto óseo, andamiajes o dispositivos estructurales de soporte. Por ejemplo, la CIO se puede usar junto con un trasplante o implante que muestre resistencia mecánica, para aumentar los injertos corticales o en procedimientos de alargamiento para aumentar la conectividad del injerto estructural con el hueso del huésped. Estos otros materiales de injerto óseo, andamiajes o dispositivos estructurales de soporte pueden incluir metales, cerámicas y polímeros naturales y sintéticos. Los materiales cerámicos pueden incluir cerámicas derivadas de fuentes naturales, por ejemplo, hidroxiapatita coralina o compuestos sintéticos, por ejemplo, hidroxiapatita sintética o β -fosfato tricálcico. Los polímeros naturales útiles en el injerto óseo pueden incluir almidón, fibrina, colágeno, quitosano, ácido hialurónico y polihidroxibutirato. Los polímeros sintéticos adecuados pueden ser poli (α -hidroxiácidos), poli (ϵ -caprolactona), poli (propilen fumaratos), poli (iminocarbonatos de BPA), poli (fosfacenos). Se entiende que dichos soportes adicionales o componentes de soporte físico pueden tener cualquier tamaño o forma convenientes, por ejemplo, hojas, cubos, rectángulos, discos o esferas.

La CIO puede: (a) envolverse alrededor de un hueso que está dañado o que contiene un defecto; (b) ponerse en la superficie de un hueso que está dañado o tiene un defecto; (c) enrollarse e insertarse en una cavidad, separación o espacio en el hueso; o (d) colocarse en un sitio no óseo para inducir la formación de hueso. Uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30 o más) de dichas CIO se pueden utilizar en cualquier sitio en particular. Los injertos se pueden mantener en su lugar mediante, por ejemplo, suturas, grapas, tachuelas o pegamentos o selladores tisulares conocidos en la técnica. Como alternativa, si, por ejemplo, se empaquetan con suficiente fuerza en un defecto o cavidad, es posible que no necesiten ningún dispositivo de seguridad.

Se entiende que la CIO se puede aplicar a un tejido u órgano con el fin de reparar o regenerar ese hueso y/o un hueso vecino. Así, por ejemplo, una CIO puede insertarse en un defecto de separación crítica de un hueso largo para generar un equivalente de periosteo que rodea el defecto de separación y el equivalente de periostio a su vez puede estimular la producción de hueso dentro de la separación en el hueso. De manera similar, se puede implantar una CIO en un alveolo de extracción dental para promover la regeneración de cualquier hueso en la base del alveolo que se haya perdido como resultado, por ejemplo, de la extracción del diente. Una CIO también se puede usar en fusión espinal.

Administración de agentes terapéuticos

La CIO también se puede usar como andamiaje para la formación de hueso nuevo y/o como vehículo para el suministro de agentes que ayudan en la curación ósea y la formación de hueso nuevo. Estos agentes pueden incluir células, factores de crecimiento o terapias de moléculas pequeñas. Estos agentes se pueden incorporar a la CIO antes de colocar las matrices en el sujeto. Como alternativa, se pueden inyectar en la CIO que ya está en su lugar en un sujeto. Estos agentes se pueden administrar solos o en combinación. Por ejemplo, una CIO se puede usar para suministrar células, factores de crecimiento y terapias de molécula pequeña al mismo tiempo, o para administrar células más factores de crecimiento, o células más agentes terapéuticos de molécula pequeña, o factores de crecimiento más agentes terapéuticos de molécula pequeña.

Naturalmente, la administración de los agentes mencionados anteriormente puede ser única o múltiple (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 80, 90, 100 o tantas como sea necesario). Cuando sean múltiples, las administraciones pueden ser a intervalos de tiempo fácilmente determinables por un experto en la técnica. Las dosis de las diversas sustancias y factores variarán enormemente según la especie, edad, peso, tamaño y sexo del sujeto y también pueden determinarse fácilmente por un experto en la materia.

Las células histocompatibles y viables pueden restaurarse en la CIO para producir un injerto aceptado permanentemente que puede ser remodelado por el huésped. Las células se pueden derivar del destinatario deseado o de un donador alogénico. Los tipos de células con los que se puede repoblar la CIO incluyen, pero no se limitan a, células pluripotenciales embrionarias (ESC), células pluripotenciales mesenquimales (MSC) adultas o embrionarias, procondroblastos, condroblastos, condrocitos, pro-osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, monocitos, células pluripotenciales hematopoyéticas, células epiteliales gingivales, células endoteliales, fibroblastos o células pluripotenciales del ligamento periodontal. Se puede usar cualquier combinación de dos o más de estos tipos de células (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez) para repoblar la CIO. Los métodos para aislar tipos celulares específicos son bien conocidos en la técnica. Las células donantes se pueden usar directamente después de la recogida o pueden cultivarse in vitro usando técnicas convencionales de cultivo de tejidos. Las células donantes pueden infundirse o inyectarse en la CIO in situ justo antes de la colocación de la CIO en un sujeto mamífero. Las células donantes también se pueden cocultivar con la CIO usando métodos de cultivo de tejidos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Los factores de crecimiento que pueden incorporarse en la CIO incluyen cualquiera de una amplia gama de factores de crecimiento celular, factores angiogénicos, factores de diferenciación, citoquinas, hormonas y quimioquinas conocidas en la técnica. Se puede administrar cualquier combinación de dos o más de los factores a un sujeto por cualquiera de los medios enumerados a continuación. Los ejemplos de factores relevantes incluyen proteínas morfogenéticas óseas (PMO), en particular, PMO 2, 4, 6 y 7 (PMO-7 también se llama OP-1), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) (por ejemplo, FGF1-10), factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de queratinocitos, factores de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF) (por ejemplo, VEGF A, B, C, D y E), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento similar a insulina (IGF) I e IGF-II, interferones (IFN) (por ejemplo, IFN- α , β , o γ), factores de crecimiento transformantes (TGF) (por ejemplo, TGF α o β), factor de necrosis tumoral α , una interleucina (IL) (por ejemplo, IL-1-IL-18), Osterix, Hedgehogs (por ejemplo, sónicos o desiertos), SOX9, hormona paratiroidea, calcitonina, prostaglandinas o ácido ascórbico.

Los factores que son proteínas también pueden administrarse a un sujeto receptor administrando al sujeto: (a) vectores de expresión (por ejemplo, plásmidos o vectores virales) que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican uno cualquiera o más de los factores anteriores que son proteínas; o (b) células que han sido transfectadas o transducidas (de forma estable o transitoria) con dichos vectores de expresión. Dichas células transfectadas o transducidas se derivarán preferentemente de, o serán histocompatibles con, el receptor. Sin embargo, es posible que solo se requiera una breve exposición al factor y, por lo tanto, también se pueden usar células histoincompatibles.

La CIO también se puede usar como vehículo para la administración localizada de fármacos de molécula pequeña. La osteomielitis, es decir, la infección de hueso, generalmente se trata mediante legado de la región infectada, seguido de injerto óseo y administración sistémica a largo plazo de antibióticos. La incorporación de agentes antimicrobianos en la CIO puede proporcionar altas concentraciones locales de antibióticos, lo que minimiza el riesgo de efectos adversos asociados con altas dosis sistémicas a largo plazo. Un agente antimicrobiano puede ser un antibiótico. Los ejemplos de antibióticos incluyen, sin limitación, cualquier clase representativa de antibióticos, por ejemplo, 1) los aminoglucósidos, tales como gentamicina, kanamicina, neomicina, estreptomycin o tobramicina; 2) las cefalosporinas, tales como cefaclor, cefadroxilo o cefotaxima; 3) los macrólidos, tales como azitromicina, claritromicina o eritromicina; 4) las penicilinas, tales como amoxicilina, carbenicilina o penicilina; 5) los péptidos, como la bacitracina, polymixina B o vancomicina; 6) las quinolonas, tales como ciprofloxacina, levofloxacina o enoxacina; 7) las sulfonamidas, tales como sulfametazol, sulfacetimida; o sulfametoxazol; 8) las tetraciclinas, tales como doxiciclina, minociclina o tetraciclina; 9) otros antibióticos con diversos mecanismos de acción como la rifampicina, el cloranfenicol o la nitrofuratoína.

La CIO también se puede usar como vehículo de administración para otros agentes antimicrobianos, por ejemplo, agentes antifúngicos y agentes antivirales.

La CIO también se puede usar para la administración localizada de agentes quimioterapéuticos. Los tumores óseos malignos generalmente se tratan mediante resección tumoral y administración sistémica de fármacos contra el cáncer. La incorporación de agentes anticancerígenos en la CIO puede proporcionar altas concentraciones locales de quimioterapia, mitigando así la toxicidad asociada con dosis sistémicas altas a largo plazo. Los ejemplos de clases de agentes quimioterapéuticos incluyen, sin limitación, 1) agentes alquilantes, por ejemplo, ciclofosfamida; 2) antraciclinas, por ejemplo, daunorrubicina, doxorubicina; 3) disruptores cicloesqueléticos, por ejemplo, paclitaxel; 4) inhibidores de topoisomerasa, por ejemplo, etopósido; 5) análogos de nucleótidos, por ejemplo, azacitidina, fluorouracilo, gemcitabina; 6) péptidos, por ejemplo, bleomicina; 7) agentes basados en platino, por ejemplo,

carboplatino, cisplatino; 8) retinoides, por ejemplo, ácido retinoico todo trans; y 9) alcaloides de la vinca, por ejemplo, vinblastina o vincristina.

IV. Artículos de manufactura

La CIO proporcionada en este documento puede incluirse en un artículo de fabricación o como kit. En una realización, el kit puede incluir la CIO, material de embalaje o un prospecto, que comprende instrucciones para un método de tratamiento. El material de embalaje puede incluir componentes que promuevan la estabilidad a largo plazo y la esterilidad de la CIO. En otra realización, un kit puede incluir componentes de la CIO, de modo que el usuario puede preparar la CIO directamente. Dichos kits pueden incluir un componente de MOD fragmentada, un componente de MTA fragmentada, instrucciones para un método de mezcla de los componentes para fabricar la CIO y los materiales de embalaje adecuados. Los kits también pueden incluir tampones biológicamente compatibles para la hidratación de los componentes y la CIO.

Se han descrito varias realizaciones de la invención. Sin embargo, se entenderá que pueden realizarse diversas modificaciones sin apartarse del alcance de la invención. Por consiguiente, otras realizaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

Métodos y materiales

Preparación de matriz ósea desmineralizada

La MOD utilizada en los experimentos descritos en los Ejemplos 4 y 5 era un componente del kit AlloCraft MOD™ fabricado por LifeCell Corporation y suministrado por LifeLink. La MOD se puede preparar de la siguiente manera. Las muestras de hueso de cadáver se lavan para quitar el tejido blando y la sangre. El hueso lavado se corta en trozos pequeños, se desinfecta mediante una serie de incubaciones en peróxido de hidrógeno y alcohol, y se muele en partículas de 125-850 micrómetros de tamaño.

Después del tratamiento con HCl diluido para reducir el contenido de calcio a menos del 5 %, la MOD resultante se liofiliza y se usa para los experimentos descritos en los Ejemplos 4 y 5 a continuación.

Preparación de matriz de tejido acelular

En los experimentos descritos en los Ejemplos 4 y 5 a continuación, las MTA pertinentes se produjeron utilizando la metodología patentada de LifeCell y eran componentes de los kits AlloCraft-MOD™ fabricados por LifeCell Corporation. Cuando la MTA se preparó a partir de la dermis, se denomina matriz dérmica acelular (MDA). Se obtuvo piel de donantes humanos de varios bancos de tejidos y hospitales por todo Estados Unidos que recolectaron muestras de piel de donantes fallecidos después de obtener el consentimiento de los familiares.

La piel adquirida se colocó en medio de cultivo de tejidos RPMI 1640 que contenía antibióticos (penicilina y estreptomycin) y se envió a las instalaciones de LifeCell en Branchburg, Nueva Jersey, sobre hielo húmedo, en el mismo medio. Al llegar, se midió la temperatura del recipiente del tejido de la piel y el tejido de la piel se descartó si la temperatura era superior a 10 °C. El medio RPMI 1640 se cambió en condiciones asépticas y la piel se almacenó a 4 °C, mientras se realizaban pruebas serológicas para varios patógenos (*Treponema pallidum* (analizado por los métodos RPR y VDRL), VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) I y II, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C y HTLV (virus linfotrópico humano T) I y II) en una muestra de la piel. La piel se descartó si se detecta alguno de los patógenos. De lo contrario, se transfirió a una solución acuosa pre congelación del 35 % en peso a volumen (p/v) de maltodextrina (M180) en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de 2 a 4 horas a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C), la solución que contenía la piel se congeló a -80 °C y se almacenó en un congelador a -80 °C hasta que se procesó como se describe a continuación.

La piel congelada se descongeló a 37 °C en un baño de agua hasta que no se veía hielo. El líquido residual se drenó y la piel se sometió a las siguientes etapas de procesamiento: (i) desepidermización; (ii) descelularización; (iii) lavado.

(i) Desepidermización: se eliminó la epidermis cutánea incubando la muestra de tejido con agitación suave en una solución de desepidermización (NaCl 1 M, Triton X100 al 0,5 % en p/v, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 10 mM) durante 8-32 horas a temperatura ambiente. Para la piel de cerdo, esta incubación se realizó durante 30-60 horas a temperatura ambiente. La capa epidérmica se eliminó físicamente de la dermis. La epidermis se descartó y la dermis se sometió a un procesamiento adicional como se describe a continuación.

(ii) Descelularización: para eliminar células muertas y eliminar componentes y restos celulares, la dermis se enjuagó durante 5 a 60 minutos con una solución de descelularización (desoxicolato sódico al 2 % en p/v, EDTA

10 mM, tampón HEPES 10 mM, pH 7,8-8,2) y posteriormente se incubaron con agitación suave en un lote nuevo de la misma solución durante 12-30 horas a temperatura ambiente.

(iii) Lavado: el régimen de lavado sirve para lavar las células muertas, los restos celulares y los productos químicos residuales utilizados en las etapas de procesamiento previos. La dermis descelularizada se transfirió a una primera solución de lavado (solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene Triton X-100 al 0,5 % en p/v y EDTA 10 mM), que luego se incubó con agitación suave durante 5 a 60 minutos a temperatura ambiente. La dermis se sometió luego a tres lavados secuenciales en una segunda solución de lavado (PBS que contenía EDTA 10 mM) con agitación suave a temperatura ambiente. Los primeros dos lavados fueron cortos (15-60 minutos cada uno) y el tercer lavado fue largo (6-30 horas).

Después del régimen de lavado, la matriz de tejido acelular resultante se usó para preparar MTA particulada como se ha descrito anteriormente en la sección "matrices de tejido acelular".

Preparación de la CIO. La CIO se preparó a partir de dos componentes, la MTA particulada y la MOD particulada, suministrados con los kits AlloCraft-MOD™. La MTA particulada incluida en el kit era Cymetra, una matriz dérmica acelular proporcionada en forma de partículas micronizadas (50-150 µm) de AlloDerm®, que se había lavado para eliminar el crioprotector y se resuspendió en solución salina estéril. Para preparar el componente de MTA particulada, se suspendieron 5 g de Cymetra en aproximadamente 200 ml de solución salina de NaCl al 0,9 % estéril (Irrigation USP, Abbott, Laboratories, Abbott Park, Illinois) en un vaso de plástico, se agitó y posteriormente se centrifugó. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 10 ml de solución salina a la copa para resuspender la MTA. Luego se transfirieron 8 ml de MTA resuspendida a una jeringa de 10 ml. Para preparar la MOD particulada, 1 ml (~0,4 g) de la MOD particulada se colocó en una jeringa de 3 ml y se hidrató mediante la adición de 1 ml de solución salina estéril. La MTA particulada hidratada (8 ml) y la MOD particulada hidratada (6 ml) se mezclaron mediante una mezcla de jeringa a jeringa con movimiento recíproco de dos jeringas luer bloqueadas. La mezcla se transfirió luego en alícuotas de 1 ml a una serie de jeringas de 3 ml, se congeló a -80 °C y posteriormente se secó a vacío en condiciones convencionales usando un liofilizador (sistema de secado por congelación Savant Modulyo, Newark, NJ). A continuación, las jeringas se taparon con tapones de sellado y se sellaron en bolsas de aluminio. La composición de injerto óseo resultante tenía forma cilíndrica y aproximadamente 15 mm de largo y 0,7 mm de diámetro. Para su uso, la composición de injerto óseo liofilizada se hidrató con 1,0 ml de solución salina durante 15 minutos antes de la implantación.

Irradiación de muestra. Las muestras se irradiaron con rayos γ a -80 °C en un contenedor aislado de hielo seco en STERIS Isomedix Services (Whippany, NJ) a una dosis administrada de 26,6-28,9 kGy. Las muestras se irradiaron con haz de electrones a temperatura ambiente en Titan Scan Technologies (Denver, CO) a una dosis administrada de 14-16 kGy.

Preparación de los animales e implantación de muestras. Se llevaron a cabo estudios de implantes en animales en Toxikon Laboratories (Bedford, MA). Se anestesiaron ratas atímicas sin pelo y se creó quirúrgicamente una bolsa en la pata trasera entre los músculos semimembranoso y aductor corto. Se administró aproximadamente 0,1-0,2 ml de material de prueba a través de una jeringa dentro de la bolsa muscular. Después de 28 días, las ratas se sacrificaron con CO₂ gaseoso y los implantes se extirpan quirúrgicamente. La muestra de biopsia de cada sitio se dividió en dos partes iguales. La mitad se fijó en formalina tamponada neutra al 10 % y se procesó para la histología. La otra mitad se congeló a -80 °C y se procesó para el análisis de la actividad de la fosfatasa alcalina.

Evaluación histológica de la formación de hueso nuevo. Las muestras de biopsia se evaluaron histológicamente para determinar la presencia de cartílago recién depositado y matriz ósea recién mineralizada. Las muestras fijas se procesaron para histología usando técnicas convencionales y se tiñeron con hematoxilina/eosina y azul de toluidina. El análisis microscópico se realizó en muestras codificadas. Cada muestra se puntuó para la presencia de nueva formación ósea en una escala de 0 a 5 basada en el siguiente sistema de puntuación:

0 = sin hueso nuevo

1 = al menos 1 sitio de formación de hueso nuevo.

2 = más de 1 sitio de hueso nuevo con < 10 % de área de hueso nuevo en la biopsia total.

3 = sitios múltiples de hueso nuevo con > 10 % de área de hueso nuevo en la biopsia total, aunque con distribución no uniforme de los sitios.

4 = número múltiple y significativo de sitios de hueso nuevo bien distribuidos con una distribución uniforme durante toda la biopsia.

5 = formación extensa de hueso nuevo durante toda la biopsia que representa la mayoría de la biopsia.

Evaluación enzimática de la formación de hueso nuevo. Los osteoblastos, o células formadoras de hueso, sintetizan la enzima fosfatasa alcalina que desempeña un papel clave en la mineralización del hueso nuevo. Los niveles de actividad de la fosfatasa alcalina en una muestra pueden ser un indicador de la formación de hueso nuevo.

Las muestras de biopsia congeladas se descongelaron y se diseccionaron para que queden visualmente libres de tejido muscular. Las muestras se homogeneizaron en tampón AP (2-amino-2-metil-1-propanol 1,2 M, pH 10,5 a 25 °C) y los lisados resultantes se centrifugaron para sedimentar los restos no solubilizados. Para realizar el ensayo, se añadieron 200 µl del sobrenadante a 250 µl de tampón AP que contenía el sustrato de fosfatasa alcalina (fosfato de p-nitrofenol, 4 mg/ml) y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. La producción del producto de n-nitrofenol se controló por espectrofotometría a 415 nm. Se usó una curva de calibración separada (derivada usando cantidades conocidas de n-nitrofenol) para determinar la cantidad de producto generado por las muestras de biopsia. El contenido total de proteína de los extractos se midió usando un kit de ensayo de proteína BCA de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, Illinois). La actividad de la fosfatasa alcalina en las muestras experimentales se normalizó para la concentración de proteína y se expresó como µm de pNP/mg de proteína/h.

Criterios de aceptación. Una puntuación histológica de ≥ 1 y una actividad AP de ≥ 1 µm/mg de proteína/min se consideraron como evidencia de nueva formación de hueso.

Ejemplo 2. Osteoinductividad de la CIO: esterilización con rayos γ.

Diseño experimental. La osteoinductividad de la CIO se comparó con la de las formulaciones en las que el componente particulado de la MOD se había sometido a tratamientos (resumidos en la Tabla 1 a continuación) diseñados para explorar sistemáticamente la relación entre las condiciones de almacenamiento y la osteoinductividad. Las variables relevantes incluyeron la temperatura de almacenamiento, la esterilización con rayos γ y el momento de mezcla de los componentes de la MOD particulada y la MTA particulada en relación con el almacenamiento del material particulado MOD, es decir, si la MOD particulada y la MTA particulada se combinaron antes o después del almacenamiento de la MOD particulada. Todas las muestras experimentales se almacenaron durante 6 meses antes de la implantación. En este estudio se utilizaron 16 animales. Se implantaron muestras en animales de prueba como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1, "Preparación de animales e implantación de muestras". Cada animal recibió un implante en cada extremidad posterior. Para controlar la variabilidad entre animales individuales, el material de prueba en cada grupo (A a H) se dividió en 4 alícuotas y cada alícuota se implantó en un sitio diferente en un animal diferente. Después de 28 días, las muestras se sometieron a biopsia y se evaluó el potencial osteoinductivo de las muestras como se describe en el Ejemplo 1 bajo "Evaluación histológica de formación de hueso nuevo" y "Evaluación enzimática de la formación de hueso nuevo".

Los grupos experimentales se designaron A a H y estaban sujetos a las siguientes condiciones. En los grupos F y G, la MOD particulada se combinó con MTA particulada para formar una CIO. La CIO se preparó de acuerdo con el método ("Preparación de la CIO") descrito en el Ejemplo 1. Es decir, la MOD particulada y la MTA particulada se hidrataron, se combinaron para formar una mezcla, se liofilizaron, se irradiaron y se almacenaron durante 6 meses antes de la implantación. Por lo tanto, la MOD particulada y la MTA particulada en estas muestras se combinaron antes del almacenamiento. El Grupo F se almacenó a -80 °C y el Grupo G se almacenó a temperatura ambiente.

En los Grupos A y B, la MOD particulada (en forma de polvo) se almacenó como un polvo seco irradiado con rayos γ. Al final del período de almacenamiento, la MOD particulada se hidrató, se combinó con MTA particulada hidratada y se implantó. Por lo tanto, la MOD particulada y la MTA particulada en estas muestras se combinaron después del almacenamiento. El Grupo A se almacenó a -80 °C y el Grupo B se almacenó a temperatura ambiente.

En los Grupos C, D y E, la MOD particulada se almacenó como una pasta, es decir, después de la hidratación. Para estas muestras, se combinó 1 ml (~0,4 g) de la MOD particulada con 1 ml de solución salina como se describe anteriormente en "Preparación de la CIO". La pasta de la MOD particulada en las Muestras D y E se irradió con rayos γ después de la hidratación y la pasta de la MOD particulada en la Muestra C no se irradió con rayos γ. Todas las muestras de este grupo se almacenaron y, al final del período de almacenamiento, se combinaron con MTA particuladas hidratadas y se implantaron. Por lo tanto, la MOD particulada y la MTA particulada en estas muestras se combinaron después del almacenamiento. El Grupo D se almacenó a -80 °C y los Grupos C y E se almacenaron a temperatura ambiente.

En el Grupo H, un control para los factores relacionados con el almacenamiento y la irradiación, polvo de la MOD particulada no irradiado se hidrató y se mezcló con MTA particulada hidratada inmediatamente antes de la implantación. Por lo tanto, la MOD particulada y la MTA particulada en este grupo se combinaron sin ningún período intermedio de almacenamiento.

Tabla 1: Diseño experimental

Grupo	Forma de almacenamiento de la MOD	MTA y MOD combinadas (en relación con el período de almacenamiento)	Temperatura de almacenamiento de la MOD	Irradiación Y
A	polvo	después del almacenamiento	-80 °C	sí
B	polvo	después del almacenamiento	TA	sí
C	pasta	después del almacenamiento	TA	no
D	pasta	después del almacenamiento	-80 °C	sí
E	pasta	después del almacenamiento	TA	sí
F	CIO (seca)	antes del almacenamiento	-80 °C	sí
G	CIO (seca)	antes del almacenamiento	TA	sí
H	polvo	no aplicable	Sin almacenamiento	no

Resultados. Las puntuaciones de histología para cada alícuota implantada (las columnas marcadas 1, 2, 3 y 4) se muestran en la Tabla 2. Ambos implantes de CIO (Grupos F y G) tenían puntuaciones histológicas de ≥ 1 y por lo tanto mostraron evidencia histológica de formación de hueso nuevo.

5

Tabla 2: Puntuaciones histológicas

Grupo	Forma de almacenamiento de la MOD	MTA y MOD combinadas (en relación con el período de almacenamiento)	Temperatura de almacenamiento de la MOD	Irradiación Y	Número de alícuota				Promedio
					1	2	3	4	
A	polvo	después del almacenamiento	-80 °C	sí	2,5	2,0	1,5	2,3	2,1
B	polvo	después del almacenamiento	TA	sí	2,5	2,3	2,3	2,3	2,4
C	pasta	después del almacenamiento	TA	no	0,5	0	0	0	0,1
D	pasta	después del almacenamiento	-80 °C	sí	2,5	1,3	2,3	2,3	2,1
E	pasta	después del almacenamiento	TA	sí	2,0	0,5	1,0	0,5	1,0
F	CIO (seca)	antes del almacenamiento	-80 °C	sí	2,0	2,5	1,0	2,5	2,0
G	CIO (seca)	antes del almacenamiento	TA	sí	2,0	**	4,0	**	3,0
H	polvo	no aplicable	Sin almacenamiento	no	1,0	2,0	3,0	2,0	2,0

** Faltaban los implantes en estas secciones, por lo que las muestras de biopsia no se analizaron.

Las puntuaciones de actividad de fosfatasa alcalina para cada alícuota implantada (las columnas marcadas 1, 2, 3 y 4) se muestran en la Tabla 3. En general, las muestras de la CIO (Grupos F y G) mostraron niveles más altos de actividad AP que las muestras comparables hechas de pasta de la MOD particulada almacenada (muestras D y E).

10

Tabla 3: Actividad de la fosfatasa alcalina ($\mu\text{mol/mg}$ de proteína/h)

Grupo	Forma de almacenamiento de la MOD	MTA y MOD combinadas (en relación con el período de almacenamiento)	Temperatura de almacenamiento de la MOD	Irradiación Y	Número de alícuota				Promedio
					1	2	3	4	
A	polvo	después del almacenamiento	-80 °C	sí	1,63	-	0,97	2,02	1,54
B	polvo	después del almacenamiento	TA	sí	0,8	1,39	1,88	1,81	1,47
C	pasta	después del almacenamiento	TA	no	0,57	0,57	1,08	0,69	0,72
D	pasta	después del almacenamiento	-80 °C	sí	0,77	-	0,95	1,48	1,07
E	pasta	después del almacenamiento	TA	sí	0,53	0,60	0,72	0,87	0,68
F	CIO (seca)	antes del almacenamiento	-80 °C	sí	1,45	1,58	1,37	0,92	1,33

Grupo	Forma de almacenamiento de la MOD	MTA y MOD combinadas (en relación con el período de almacenamiento)	Temperatura de almacenamiento de la MOD	Irradiación Y	Número de alícuota				Promedio
					1	2	3	4	
G	CIO (seca)	antes del almacenamiento	TA	sí	0,54	2,02	0,45	**	1,00
H	polvo	no aplicable	Sin almacenamiento	no	0,73	1,79	2,36	**	1,62

** Faltaban los implantes en estas secciones, por lo que las muestras de biopsia no se analizaron.

Los perfiles de osteoinductividad (OI) de las muestras se resumen en la Tabla 4. Las muestras se consideraron osteoinductivas cuando la actividad de AP era ≥ 1 y la puntuación histológica ≥ 1 . Ambas muestras de la CIO (Grupos F y G) eran osteoinductivas; además, la CIO almacenada a temperatura ambiente (Grupo G) retuvo la osteoinductividad, mientras que las muestras en las que se había almacenado la pasta de la MOD a temperatura ambiente (Grupo E) no.

Tabla 4: Osteoinductividad de muestras de prueba

Grupo	Forma de almacenamiento de la MOD	MTA y MOD combinadas (en relación con el período de almacenamiento)	Temperatura de almacenamiento de la MOD	Irradiación Y	Actividad AP promedio ($\mu\text{mol/mg}$ de proteína/hora)	Puntuación histológica (promedio)	Osteoinductividad
A	polvo	después del almacenamiento	-80 °C	sí	1,54	2,1	Sí
B	polvo	después del almacenamiento	TA	sí	1,47	2,4	Sí
C	pasta	después del almacenamiento	TA	no	0,72	0,1	No
D	pasta	después del almacenamiento	-80 °C	sí	1,07	2,1	Sí
E	pasta	después del almacenamiento	TA	sí	0,68	1,0	No
F	CIO (seca)	antes del almacenamiento	-80 °C	sí	1,33	2,0	Sí
G	CIO (seca)	antes del almacenamiento	TA	sí	1,0	3,0	Sí
H	polvo	no aplicable	Sin almacenamiento	no	1,62	2,0	Sí

Las muestras de control adicionales no mostradas en las tablas anteriores consistieron en una masilla fabricada mezclando MTA y MOD antes de 6 meses de almacenamiento, irradiación y e implantación como se ha descrito anteriormente. Estas muestras tenían una puntuación histológica promedio de 1,0 y una actividad AP promedio de 0,8 y, por lo tanto, no cumplían con el criterio de osteoinductividad mencionado anteriormente.

Ejemplo 3. Osteoinductividad de la CIO: Esterilización por haz de electrones

Diseño experimental. La osteoinductividad de la CIO se comparó con la de las formulaciones en las que el componente particulado de la MOD se había sometido a tratamientos (resumidos en la Tabla 5 a continuación) diseñados para explorar sistemáticamente la relación entre las condiciones de almacenamiento y la osteoinductividad. Las variables relevantes incluyeron el almacenamiento templado, la esterilización con haz de electrones (haz de e) y el momento de mezcla de los componentes de la MOD particulada y la MTA particulada en relación con el almacenamiento de la MOD particulada, es decir, si la MOD particulada y la MTA particulada se combinaron antes o después del almacenamiento de la MOD particulada. Todas las muestras experimentales se almacenaron durante 6 meses. En este estudio se utilizaron diecisiete animales. Se implantaron muestras en animales de prueba como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1, "Preparación de animales e implantación de muestras". Cada animal recibió dos implantes, uno en cada extremidad posterior, de 0,2 ml cada uno. Para controlar la variabilidad entre animales individuales, el material de prueba en cada Grupo (A a G) se dividió en 5 alícuotas y cada alícuota se implantó en un sitio diferente en un animal diferente. Después de 28 días, las muestras se sometieron a biopsia y se evaluó el potencial osteoinductivo de las muestras como se describe en el Ejemplo 1 en "Evaluación histológica de la formación de hueso nuevo".

Los grupos experimentales fueron designados de A a G y estaban sujetos a las siguientes condiciones. En los Grupos F y G, la MOD particulada se combinó con MTA particulada para formar una CIO. La CIO se preparó de acuerdo con el método ("Preparación de la CIO") proporcionado en el Ejemplo 1. Es decir, la MOD particulada y la MTA particulada se hidrataron, se combinaron para formar una mezcla, se liofilizaron, se irradiaron y se almacenaron para 6 meses antes de la implantación. Por lo tanto, la MOD particulada y la MTA particulada en estas

muestras se combinaron antes del almacenamiento. El Grupo E se almacenó a -80 °C y el Grupo F se almacenó a temperatura ambiente.

5 En los Grupos A y B, la MOD particulada (en forma de polvo) se almacenó como un polvo seco irradiado con haz de electrones. Al final del período de almacenamiento, la MOD particulada se hidrató, se combinó con MTA particulada hidratada y se implantó. Por lo tanto, la MOD particulada y la MTA particulada en estas muestras se combinaron después del almacenamiento. El Grupo A se almacenó a -80 °C y el Grupo B se almacenó a temperatura ambiente.

10 En los Grupos C y D, la MOD particulada se almacenó como una pasta, es decir, después de la hidratación. (Para estas muestras, se combinó un ml (~0,4 g) de la MOD particulada con 1 ml de solución salina como se describe anteriormente en "Preparación de la CIO". Tras la hidratación, la pasta de la MOD particulada en estos grupos se irradió con haz de electrones, se almacenó y al final del período de almacenamiento, se combinó con MTA particulada hidratada y se implantó. Por lo tanto, la MOD particulada y la MTA particulada en estas muestras se combinaron después del almacenamiento. El Grupo C se almacenó a -80 °C y el Grupo D se almacenó a temperatura ambiente.

15 En el Grupo G, un control para los factores relacionados con el almacenamiento y la irradiación, polvo de la MOD particulada no irradiado, se hidrató y se mezcló con MTA particulada hidratada inmediatamente antes de la implantación. Por lo tanto, la MOD particulada y la MTA particulada en este grupo se combinaron sin ningún período intermedio de almacenamiento.

Tabla 5: Diseño experimental

Grupo	Forma de almacenamiento de la MOD	MTA y MOD combinadas (en relación con el período de almacenamiento)	Temperatura de almacenamiento de la MOD	Irradiación con haz de electrones
A	polvo	después del almacenamiento	-80 °C	sí
B	polvo	después del almacenamiento	TA	sí
C	pasta	después del almacenamiento	-80 °C	sí
D	pasta	después del almacenamiento	TA	sí
E	CIO (seca)	antes del almacenamiento	-80 °C	sí
F	CIO (seca)	antes del almacenamiento	TA	sí
G	polvo	no aplicable	Sin almacenamiento	no

25 Resultados. Las puntuaciones de histología para cada alícuota implantada (las columnas marcadas con 1, 2, 3, 4 y 5) se muestran en la Tabla 6. Ambos Grupos de la CIO mostraron evidencia histológica de formación de hueso nuevo.

Tabla 6: Puntuaciones histológicas

Grupo	Forma de almacenamiento de la MOD	MTA y MOD combinadas (en relación con el período de almacenamiento)	Temperatura de almacenamiento de la MOD	Irradiación con haz de electrones	Número de alícuota					Promedio
					1	2	3	4	5	
A	polvo	después del almacenamiento	-80 °C	sí	2,5	1,0	2,0	3,5	2,5	2,3
B	polvo	después del almacenamiento	TA	sí	3,3	**	3,3	1,5	3,3	2,9
C	pasta	después del almacenamiento	-80 °C	sí	0	3,5	2,5	2,5	2,3	2,2
D	pasta	después del almacenamiento	TA	sí	2,0	1,5	2,0	2,0	2,3	2,0
E	CIO seca	antes del almacenamiento	-80 °C	sí	3,5	2,0	3,5	2,5	3,5	3,0
F	CIO seca	antes del almacenamiento	TA	sí	2,8	3,0	3,0	2,5	2,5	2,8
G	polvo	no aplicable	Sin almacenamiento	no	2,3	3,3	2,5	2,0	**	2,5

** Faltaban los implantes en estas secciones, por lo que las muestras de biopsia no se analizaron.

30 Las actividades de fosfatasa alcalina correspondientes para cada alícuota implantada (las columnas marcadas con 1, 2, 3, 4 y 5) se muestran en la Tabla 7. La mayoría de las muestras de la CIO mostraron evidencia enzimológica de formación de hueso nuevo.

Tabla 7: Actividad de fosfatasa alcalina ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína/h)

Grupo	Forma de almacenamiento de la MOD	MTA y MOD combinadas (en relación con el período de almacenamiento)	Temperatura de almacenamiento de la MOD	Irradiación con haz de electrones	Número de alícuota					Promedio $\pm$ SE
					1	2	3	4	5	
A	polvo	después del almacenamiento	-80 °C	sí	1,97	1,59	3,63	1,54	5,48	3,0 $\pm$ 0,8
B	polvo	después del almacenamiento	TA	sí	8,2	0,62	1,27	0,57	3,34	2,8 $\pm$ 1,6
C	pasta	después del almacenamiento	-80 °C	sí	0,58	0,83	0,52	0,83	1,66	0,8 $\pm$ 0,2
D	pasta	después del almacenamiento	TA	sí	0,47	0,65	0,46	0,49	0,53	0,52 $\pm$ 0,04
E	CIO (seca)	antes del almacenamiento	-80 °C	sí	4,69	3,20	2,12	3,85	0,53	2,9 $\pm$ 0,8
F	CIO (seca)	antes del almacenamiento	TA	sí	0,44	0,78	1,18	0,8	1,17	0,9 $\pm$ 0,2
G	polvo	no aplicable	Sin almacenamiento	no	1,62	2,06	0,72	0,40	**	1,2 $\pm$ 0,4

** Faltaban los implantes en estas secciones, por lo que las muestras de biopsia no se analizaron.

Los perfiles de osteoinductividad (OI) de las muestras se resumen en la Tabla 8. En este estudio, una muestra se consideró osteoinductora si la puntuación histológica era ≥ 1 . Las muestras de composición de injerto óseo almacenadas a -80 °C (muestra E) mostraron una mayor actividad osteoinductiva que las muestras comparables hechas de pasta hidratada y almacenada (muestra C). Se observó una tendencia similar con las muestras de composición de injerto óseo almacenadas a temperatura ambiente.

Tabla 8: Osteoinductividad de muestras de prueba

Grupo	Forma de almacenamiento de la MOD	MTA y MOD combinadas (en relación con el período de almacenamiento)	Temperatura de almacenamiento de la MOD	Irradiación con haz de electrones	Puntuación histológica (promedio)	Actividad AP promedio ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína/hora)
A	polvo	después del almacenamiento	-80 °C	sí	2,3	3,0 $\pm$ 0,8
B	polvo	después del almacenamiento	TA	sí	2,9	2,8 $\pm$ 1,6
C	pasta	después del almacenamiento	-80 °C	sí	2,2	0,8 $\pm$ 0,2
D	pasta	después del almacenamiento	TA	sí	2,0	0,52 $\pm$ 0,04
E	CIO (seca)	antes del almacenamiento	-80 °C	sí	3,0	2,9 $\pm$ 0,8
F	CIO (seca)	antes del almacenamiento	TA	sí	2,8	0,9 $\pm$ 0,2
G	polvo	no aplicable	Sin almacenamiento	no	2,5	1,2 $\pm$ 0,4

Las muestras de control adicionales que no se muestran en las tablas anteriores consistieron en una masilla hecha mezclando MTA y MOD antes de 6 meses o 1 año de almacenamiento, irradiación con haz de electrones e implantación como se ha descrito anteriormente. Las muestras almacenadas durante 6 meses tuvieron una puntuación histológica promedio de 1,9 y una actividad AP promedio de 0,5 y, por lo tanto, aunque cumplieron con el criterio de osteoinductividad mencionado anteriormente, tenían puntuaciones histológicas más bajas (y actividad AP) que cualquiera de las otras muestras enumeradas en la Tabla 8. Las muestras almacenadas durante 1 año tenían una puntuación histológica promedio de 0 y una actividad AP promedio de 0,2 y, por lo tanto, no cumplían con el criterio de osteoinductividad mencionado anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Un método para hacer una composición de injerto óseo (CIO); caracterizado porque dicho método comprende:
 - 5 combinar fragmentos de una matriz de tejido acelular (MTA) con fragmentos de matriz ósea desmineralizada (MOD) para crear una mezcla, en la que los fragmentos de MTA y los fragmentos de MOD en la mezcla están sustancialmente hidratados; secar e irradiar la mezcla para proporcionar una forma que se ha secado e irradiado; en el que dicha forma puede almacenarse durante seis meses y posteriormente puede rehidratarse para proporcionar una CIO osteoinductiva.
 - 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la MTA comprende la dermis de la que se han eliminado todas, o sustancialmente todas, las células viables.
 - 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que la MTA comprende un tejido del que se han eliminado todas, o sustancialmente todas, las células viables, en el que dicho tejido se selecciona del grupo que consiste en fascia, tejido pericárdico, duramadre, tejido de cordón umbilical, tejido placentario, tejido de la válvula cardíaca, tejido del ligamento, tejido del tendón, tejido arterial, tejido venoso, tejido conectivo neural, tejido de la vejiga urinaria, tejido del uréter y tejido intestinal.
 - 20 4. El método de la reivindicación 1, en el que la MTA y/o MOD están compuestas de tejido humano.
 5. El método de la reivindicación 1, en el que la MTA y/o MOD están compuestas de tejido de mamífero no humano.
 - 25 6. El método de la reivindicación 5, en el que el mamífero no humano se modifica por ingeniería genética para que carezca de expresión de restos de α -1,3-galactosilo.
 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la CIO o la mezcla se irradia de manera que absorba de 6 kGy a 30 kGy de la radiación.
 - 30 8. Una CIO preparada por el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
 9. Una CIO como se describe en cualquier reivindicación anterior, para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o de un animal mediante cirugía o terapia.
 - 35 10. Una CIO como se describe en la reivindicación 9 para el uso descrito en la misma; en el que dicho tratamiento es el tratamiento del hueso.
 11. Una CIO como se describe en la reivindicación 9 o 10 para el uso descrito en la misma; en el que la CIO se usa en combinación con un dispositivo estructural de soporte.
 - 40 12. Un artículo de fabricación que comprende una CIO como se describe en cualquier reivindicación anterior.
 13. Un artículo de fabricación de acuerdo con la reivindicación 12; en el que el artículo comprende material de embalaje, o un prospecto, que comprende instrucciones para un método de tratamiento; el método que comprende
 - 45 (i) identificar un sujeto mamífero que tiene un órgano receptor, o tejido, que necesita una mejora o reparación; y
 - (ii) poner la CIO en o sobre el órgano o tejido.