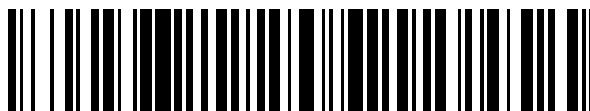


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 876**

51 Int. Cl.:

A61F 2/00	(2006.01)
A61K 33/42	(2006.01)
A61K 9/14	(2006.01)
A61F 2/28	(2006.01)
A61F 2/02	(2006.01)
A61L 27/38	(2006.01)
A61L 27/34	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2010 PCT/IL2010/000409**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2010 WO10146574**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2010 E 10789100 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2442749**

54 Título: **Formas sólidas para reparación tisular**

30 Prioridad:

15.06.2009 US 187081 P
19.10.2009 US 252800 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.08.2019

73 Titular/es:

CARTIHEAL (2009) LTD. (100.0%)
Atir Yeda 17, 4th Floor
Kfar Saba 44643-13, IL

72 Inventor/es:

ALTSCHULER, NIR y
VAGO, RAZI

74 Agente/Representante:

INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E
INVENCIONES, SLP

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes

ES 2 721 876 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

Formas sólidas para reparación tisular

5 Antecedentes de la invención

En ocasiones la intervención quirúrgica y el injerto son necesarios para restablecer la función mecánica y reconstruir la morfología del hueso y el cartílago, como resultado de traumatismos, tumores o desarrollos anómalos del hueso.

10 Los materiales sintéticos tales como metales y cementos óseos también se han usado para restablecer y reconstruir el hueso durante muchos años, pero a menudo dan como resultado una protección contra el estrés del hueso circundante y fallo por fatiga del implante. Otra posibilidad es el injerto de hueso autólogo, aunque el suministro de tejido óseo autólogo es limitado y su recogida es dolorosa, con el riesgo de infección, hemorragia, discapacidad estética, daño nervioso y pérdida de la función del hueso. Además, la morbilidad significativa está asociada con los
15 sitios de recogida de autoinjerto. Estos problemas se pueden superar mediante la ingeniería tisular usando armazones hechos con biomateriales sintéticos o naturales que estimulan la adhesión, migración, proliferación y diferenciación de células madre de médula ósea, también conocidas como células madre mesenquimales (MSC). Una asociación entre los biocomponentes y las respuestas regenerativas y reparadoras biológicas se puede estimular proporcionando un armazón que contenga espacios morfológicamente compatibles con los osteones y sus
20 interconexiones vasculares.

El microentorno inmediato y la organización tridimensional (3D) son factores importantes en la diferenciación en general y en particular en la diferenciación condrogénica y osteogénica.

25 Algunos armazones modificados por ingeniería de tejido óseo consisten en polímeros naturales, tales como colágeno, alginato, ácido hialurónico y quitosano. Los materiales naturales ofrecen las ventajas de interacción celular específica, fácil siembra de células debido a sus interacciones hidrófilas, baja toxicidad y baja respuesta inflamatoria crónica. Sin embargo, estos armazones a menudo son mecánicamente inestables y no contribuyen fácilmente a la creación de estructuras tisulares con una forma definida previamente específica para el trasplante. Para obtener
30 resistencia mecánica, se requiere una modificación química, lo que puede conducir a toxicidad.

Los defectos y la degeneración de las superficies del cartílago articular de las articulaciones causan dolor y rigidez. El daño al cartílago que protege las articulaciones puede ser el resultado de lesiones físicas como resultado de traumatismos, deportes o esfuerzos repetitivos (por ejemplo, fractura osteocondral, daño secundario debido a una
35 lesión del ligamento cruzado) o de una enfermedad (por ejemplo, osteoartritis, artritis reumatoide, necrosis aséptica, osteocondritis disecante).

La osteoartritis (OA) se debe al desgaste general de las articulaciones, especialmente las articulaciones de cadera y rodilla. La osteoartritis es común en las personas de edad avanzada, pero, de hecho, a la edad de 40 años, la
40 mayoría de las personas tienen algunos cambios osteoartíticos en sus articulaciones que soportan peso. Otra tendencia emergente que aumenta la prevalencia de la osteoartritis es el aumento de la obesidad. El CDC calcula que un 30 % de los adultos estadounidenses (o 60 millones de personas) son obesos. Los adultos obesos tienen 4 veces más probabilidades de desarrollar OA en la rodilla que los adultos de peso normal. La artritis reumatoide es una afección inflamatoria que da como resultado la destrucción del cartílago. Se cree que es, al menos en parte, una
45 enfermedad autoinmune que tiene una predisposición genética con respecto a la enfermedad.

La prevención y reparación ortopédicas de articulaciones dañadas es una carga significativa para la profesión médica, tanto en términos de gastos como de tiempo dedicado a tratar a los pacientes. En parte, esto se debe a que el cartílago no posee la capacidad de auto reparación. Los intentos de hacer que el cartílago hialino vuelva a crecer
50 para la reparación de los defectos del cartílago siguen sin tener éxito. La cirugía ortopédica está disponible para reparar defectos y prevenir el daño articular en un esfuerzo por prevenir cambios degenerativos graves en una articulación. El uso de técnicas quirúrgicas a menudo requiere la extracción y donación de tejido sano para reemplazar el tejido dañado o enfermo. Las técnicas que usan tejido donado de autoinjertos, aloinjertos o xenoinjertos son totalmente insatisfactorias, ya que los autoinjertos añaden un traumatismo adicional a un sujeto y los aloinjertos y xenoinjertos están limitados por la reactividad inmunológica con respecto al sujeto hospedador y la
55 posible transferencia de agentes infecciosos. Los intentos quirúrgicos de usar materiales distintos del tejido humano o animal para la regeneración del cartílago no han tenido éxito.

El documento US 2008/281431 A1 desvela armazones para reparación de hueso con un armazón cerámico poroso que comprende hidroxiapatita. El documento US 2008/065210 A1 desvela armazones de tapón osteocondral que comprenden una fase polimérica superior porosa y una fase cerámica inferior menos porosa. Todavía falta un
60 material ideal que restablezca la función mecánica y reconstruya la morfología del hueso y el cartílago.

Sumario de la invención

65 La invención proporciona un armazón para reparación de tejido, dicho armazón consistiendo en dos fases en el que:

- una primera fase de dichas dos fases comprende coral sólido, que comprende un polímero biocompatible; y
- una segunda fase de dichas dos fases comprende coral sólido y dicha segunda fase comprende adicionalmente una serie de huecos a lo largo de un eje longitudinal en dicha segunda fase.

5 La invención es útil en un método para inducir o potenciar la formación o reparación de cartílago o hueso, o una combinación de los mismos, dicho método comprendiendo la implantación en un sujeto, de un armazón de la presente invención dentro de un sitio con necesidad de formación, reparación de cartílago o hueso una combinación de los mismos.

10 Un método de ese tipo comprende la exposición de dicho sitio con necesidad de formación o reparación de cartílago o hueso o una combinación de los mismos, y opcionalmente la exposición del tejido óseo situado de forma proximal al sitio de la reparación del cartílago en dicho sujeto con necesidad de reparación o regeneración de cartílago, antes del implante de dicho armazón.

15 Un método de ese tipo para inducir o potenciar la reparación o regeneración de cartílago puede comprender la etapa de fijar al menos una parte de dicho armazón dentro del hueso situado de forma proximal a dicho sitio de preparación de cartílago.

20 También se desvela, pero no forma parte de la intervención que se reivindica, un método para la purificación de armazones de base coralina, dicho método comprendiendo las etapas de:

- poner en contacto aragonito sólido de un tamaño y forma deseados con una solución que comprende un agente oxidante; y
- lavar y secar dicho aragonito sólido

25 de modo que una o cada una de dichas etapas se realiza bajo una presión negativa aplicada.

Un método de ese tipo puede comprender la realización de dicha puesta en contacto en condiciones ligeramente ácidas. La solución puede comprender hipoclorito sódico.

30 Un método de ese tipo puede comprender adicionalmente someter el aragonito sólido a una temperatura de al menos 275 °C bajo una presión negativa aplicada.

35 La presión negativa aplicada puede variar entre aproximadamente 0,02 MPa a 1 Pa (de 0,2 a 0,00001 bares), o entre 0,04 MPa y 0,001 Pa (entre 0,4 y 0,0000001 bares).

Breve descripción de las figuras

40 La Figura 1 representa de forma esquemática la colocación de un implante dentro de un sitio para reparación de cartílago y hueso, en el que el armazón **1-10** se coloca de modo tal que una primera fase se coloca dentro del cartílago y una segunda fase se coloca dentro de huesos situados de forma proximal.

45 La Figura 2 representa la incorporación satisfactoria de realizaciones de un armazón de la presente invención dentro de un defecto de cartílago y hueso. La Figura 2A muestra una fotografía de un agujero perforado en un cóndilo femoral medial de una cabra; D = 6 mm, L = 7,5 mm. Las Figuras 2B y 2C muestran una fotografía del implante del armazón dentro del sitio de la lesión. La Figura 2D muestra que a los 19 días después del implante, implante se incorporó de forma satisfactoria dentro del cartílago, se observan signos de vascularización y un menisco intacto.

50 La Figura 3 muestra microfotografías de luz de tejido osteocondral en el que se ha implantado un armazón realizado de la presente invención. La Figura 3A muestra un aumento bajo (2 x) a las 9 semanas después del implante de un armazón realizado que se describe en el presente documento en un cóndilo femoral medial de una cabra; D = 5,2 mm, L = 7,5 mm; visualizado con tinción de H y E convencional. La Figura 3B muestra la sección comparable del tejido teñido con Tricromo de Masson. Obsérvese que la zona del implante, (destacada con el rectángulo con líneas discontinuas en 3A) se sustituye por hueso y cartílago tejido.

55 La Figura 4, similar a la Figura 3 muestra microfotografías de luz de tejido osteocondral en el que se ha implantado un armazón realizado de la presente invención, sometido a diferentes protocolos de tinción. La Figura 4A presenta un aumento bajo (2 x) del tejido 9 semanas después del implante en un cóndilo femoral medial de una cabra; D = 5,2 mm, L = 7,5 mm D = 5 teñido con Safranina O, y la Figura 14B muestra una sección comparable teñida para detección de Colágeno de tipo II. La Figura 4A demuestra la presencia de una banda de cartílago homogéneo de color rojo que cubre el hueso normal y la zona del defecto. De forma análoga, la Figura 4B muestra tinción positiva para colágeno de tipo II a lo largo de la banda de cartílago que cubre el defecto (y cartílago normal adyacente como un control positivo interno).

65 La Figura 5 muestra microfotografías de luz de tejido osteocondral en el que se ha implantado un armazón realizado de la presente invención, sometido al tinción de H y E. La sección es de un cóndilo femoral medial de una cabra,

recogido 9 semanas después del implante del armazón; D = 5,2 mm, L = 7,5 mm. La Figura 5A es un aumento bajo del tejido, mientras que la Figura 5B es un aumento más elevado de la inserción que se observa en la Figura 5A. Obsérvese la uniformidad del tejido en la región del cartílago hialino (inserción). Se produce una ligera agrupación de condrocitos dentro de la región de regeneración, en una región de otro modo aparece comparable con el tejido de cartílago circundante.

La Figura 6 representa la preparación y uso de un armazón de múltiples gradientes que no forma parte de la invención que se reivindica. La colocación del tapón dentro del tamiz para la inmersión se muestra en la Figura 6A. Las Figuras 6B y 6C representan imágenes de microscopía de luz de la parte superior (panel B) cortadas desde el tapón (panel C) y visualizadas con un aumento más elevado en el que se puede determinar el tamaño de los huecos. La Figura 6D representa de forma esquemática un armazón de múltiples fases.

La Figura 7 muestra microfotografías de tinción con Safranina O/Verde Rápido de cultivos de MSC, que indica el potencial condrogénico del implante como una función de si las células se cultivaron sobre Aragonito (Figuras 7D, 7E y 7F), Aragonito y Ácido Hialurónico (Figuras 7G, 7H y 7I) o sin ningún armazón (control) (Figuras 7A, 7B y 7C) a lo largo del tiempo.

La Figura 8 muestra la zona de las células teñidas (Figura 8A) y la intensidad (Figura 8B) de la tinción con Safranina O/Verde Rápido de las MSC cultivadas sobre armazón de Aragonito, Aragonito y ácido hialurónico y sin ningún armazón a lo largo del tiempo.

La Figura 9 muestra microfotografías de SEM de las MSC, cultivadas sobre los diversos armazones. Las Figuras 9A y 9B demuestran la morfología de las MSC cultivadas sobre armazones de base de coral con respecto a las cultivadas sobre armazones que contienen coral y ácido hialurónico (Figuras 9C y 9D).

La Figura 10 muestra una realización de un armazón de la presente invención que demuestra un patrón de agujeros perforados en la fase ósea de un implante realizado.

Las Figuras 11A-C representan realizaciones de armazones/implantes de la presente invención. De acuerdo con este aspecto, una fase comprende aragonito y ácido hialurónico **11-10** y otra fase comprende aragonito solo **11-20**, en los que la fase comprende adicionalmente una serie de agujeros o huecos a lo largo de un eje longitudinal **11-30**. El extremo del armazón de acuerdo con este aspecto, ser estrecha **11-40** para facilitar la inserción con un ajuste muy apretado, dentro de un sitio de reparación osteocondral. La Figura 11C muestra un armazón realizado, teñido con Verde Rápido, que tiñe de forma selectiva el componente de ácido hialurónico del armazón.

Descripción detallada de la presente invención

La presente invención proporciona armazones, adecuados para la reparación y/o la formación de cartílago y/o tejido óseo en un sujeto. La presente invención también proporciona kits para la reparación y/o formación de cartílago y/o tejido óseo en un sujeto.

El coral, que está formado por CaCO₃ en la forma cristalina de aragonito o calcita tienen la ventaja de soportar una invasión, adherencia, proliferación y diferenciación celular rápida de células madre mesenquimales en cartílago y/o tejido óseo.

Los armazones de coral tridimensionales (3-D) atraen a las células madre mesenquimales del tejido circundante o situado de forma proximal y estimulan la formación de vasos sanguíneos en un sitio de reparación de cartílago. Los armazones de ese tipo se pueden usar para regeneración, reparación y potenciación de la formación de cartílago y/o hueso en un sujeto para el tratamiento de defectos de cartílago de grosor completo, defectos de cartílago de grosor parcial y/o defectos osteocondrales.

En el presente documento los términos "coral" y "aragonito" se usan indistintamente.

Los armazones de base coralina de la presente invención también se pueden usar para regeneración, reparación y potenciación de la formación de hueso en un sujeto, para el tratamiento de una afección, enfermedad o trastorno óseos.

La presente invención se basa en la aplicación inesperada de los armazones de coral que son útiles para la regeneración, reparación y potenciación de la formación de cartílago y/o hueso y además, esos armazones de coral se puede preparar e insertar de forma específica y óptima dentro de cartílago y/o hueso en un sujeto con necesidad del mismo, para métodos de regeneración, reparación y potenciación de la formación de cartílago y/o hueso.

En particular, la presente invención se basa en la aplicación inesperada de que la regeneración, reparación y potenciación de la formación de cartílago y/o hueso es óptima cuando la formación de coral consiste básicamente en dos fases en la que una primera fase de dichas dos fases comprende solamente un coral y una segunda fase que comprende un coral y un polímero biocompatible, en el que la segunda fase comprende adicionalmente una serie de

huecos a lo largo de un eje longitudinal en la segunda fase.

En particular, la presente invención proporciona la ventaja inesperada, en términos de mayor condrogénesis, cuando los armazones, como se describe en el presente documento, incorporan ácido hialurónico en una fase insertada dentro del cartílago, y el aragonito puro subyacente que contiene canales perforados previamente o agujeros colocados longitudinalmente permiten mayor acceso a las células precursoras subyacentes a través del armazón para estimular la regeneración y reparación de hueso/cartílago, incluyendo el permitir una mayor vascularización del implante. Por lo tanto los armazones de la presente invención son, en algunas realizaciones, idealmente adecuados para su incorporación dentro de un sitio del defecto que se extiende a los tipos de tejido diferentes, es decir, hueso y cartílago.

Los armazones que comprenden ácido hialurónico, que se mostraron en el presente documento, estimulan de forma inesperada y única una mayor condrogénesis que los armazones que comprenden solo el aragonito, y los implantes únicos bifásicos de la presente invención toman la ventaja del aumento de la actividad condrogénica de la fase que incorpora el ácido hialurónico, en la medida en la que la fase que contiene ácido hialurónico se inserta de forma proximal en un sitio de defecto de cartílago. La naturaleza bifásica del armazón, como se describe de acuerdo con este aspecto, es únicamente adecuada por lo tanto para sitios que se extienden tanto en el tejido óseo como en el cartílago.

En algunas realizaciones, de acuerdo con este aspecto, la primera fase tiene una altura entre 1-3 mm, o en algunas organizaciones, 0,5-5 mm, o en algunas realizaciones, 1-7 mm. En algunas realizaciones, de acuerdo con este aspecto, el ácido hialurónico atribuye a través de la primera fase en un patrón de distribución relativamente homogénea. En algunas realizaciones, por encima del implante se puede formar adicionalmente una capa fina de ácido hialurónico, que adopta una capa exterior esponjosa con respecto al implante, en una región apical del implante.

En algunas realizaciones, el polímero biocompatible, tal como ácido hialurónico es hidrófilo, y cuando el líquido sinovial entra en contacto con el mismo en la capa apical por encima del armazón, o cuando la solución salina entra en contacto con el mismo durante el procedimiento de implante, el ácido hialurónico absorbe el fluido y se convierte en un hidrogel, a diferencia del estado deshidratado/desechado previo al implante. Esta reversión proporciona una protección mecánica en el sitio de implante, en algunas realizaciones.

En algunas realizaciones, la capa exterior, cuando se "reconstituye" como se describe después del implante, se puede eludir del armazón en el sitio circundante y de ese modo participar en la estimulación o potenciación de la reparación en el sitio, incluyendo, entre otros, servir como un agente quimioattractor para células implicadas en el proceso de reparación.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un armazón adecuado para reparación de tejido, dicho armazón consistiendo en dos fases en el que:

- una primera fase de dichas dos fases comprende coral sólido que comprende ácido hialurónico; y
- una segunda fase de dichas dos fases comprende coral sólido y dicha segunda fase comprende adicionalmente una serie de huecos a lo largo de un eje longitudinal en dicha segunda fase.

En algunas realizaciones, de acuerdo con este aspecto, la primera fase tiene una altura entre 1-3 mm, o en algunas realizaciones, 0,5-5 mm, o en algunas realizaciones, 1-7 mm. En algunas realizaciones, de acuerdo con este aspecto, el ácido hialurónico se distribuye básicamente de forma homogénea a través de la fase. En algunas realizaciones, una capa fina de ácido hialurónico se puede formar por encima del implante, que adopta una capa exterior esponjosa con respecto al implante, en una región apical del implante.

De acuerdo con este aspecto, la segunda fase contendrá coral sólido, en el que la fase se modifica adicionalmente para incorporar una serie de agujeros o huecos a lo largo de un eje longitudinal de la fase. En algunas realizaciones, tales agujeros longitudinales pueden variar de 10-60 con tales agujeros colocados a través de la fase a lo largo de un eje longitudinal del implante de acuerdo con este aspecto. En algunas realizaciones, los agujeros o huecos agrandados tendrán un diámetro que varían de aproximadamente 250-450 μm . En algunas realizaciones, los agujeros o huecos agrandados tendrán un diámetro que varían de aproximadamente 125-650 μm , o en algunas realizaciones, que varían de aproximadamente 175-550 μm .

De acuerdo con este aspecto, la serie de agujeros o huecos se pueden incorporar mediante manipulación física de la segunda fase, por ejemplo aragonito sólido o se puede aislar calcita, limpiar y de otro modo prepara como se describe en el presente documento, y se puede usar un taladro para crear la serie de agujeros/huecos como se describe en el presente documento. Se pueden conseguir otros medios, tales como disolución selectiva de los materiales de armazón, en los que la disolución selectiva a lo largo de un eje longitudinal se consigue con métodos conocidos en la técnica, incluyendo los que se describen y se usan a modo de ejemplo en el presente documento.

De acuerdo con este aspecto, la primera fase contendrá coral sólido, que no se ha modificado adicionalmente para

alterar la porosidad de la fase, o en algunas realizaciones, se puede alterar como se describe adicionalmente en lo sucesivo en el presente documento para alterar de forma específica el volumen del poro o diámetro medio del poro en la fase, de modo que las modificaciones de este tipo son básicamente uniformes a través de la fase.

5 La incorporación de un polímero biocompatible tal como ácido hialurónico en la primera fase del implante se puede conseguir mediante cualquier medio, incluyendo aplicación dirigida por presión, por ejemplo, mediante aplicación al vacío, fuerza centrífuga o presión mecánica. La fuerza gravitacional puede ser suficiente como para permitir una penetración apropiada y relativamente homogénea del ácido hialurónico hasta una profundidad deseada del implante, creando la primera fase como se describe en el presente documento. De acuerdo con este aspecto, la
10 inspección visual del implante, por ejemplo usando la tinción con Verde Rápido/Safranina O, demuestra una distribución uniforme del ácido hialurónico a través de la fase y hasta una profundidad deseada como una función del tiempo y condiciones de aplicación.

15 De acuerdo con este aspecto, cuando los armazones se aplican a un sitio de reparación de hueso y/o cartílago, o a un sitio de defecto en el que tanto el hueso como el cartílago están afectados y tienen necesidad de reparación y/o regeneración, el experto en la materia observará que la segunda fase del armazón se inserta dentro del sitio del defecto óseo mientras que la primera fase se inserta dentro del sitio del defecto de cartílago.

20 Los armazones de ese tipo se pueden administrar a un sujeto con un defecto óseo con necesidad de reparación, en el que el acceso al defecto óseo da como resultado la creación de un defecto en el cartílago que lo recubre, y los armazones de la presente invención permiten la curación de ambos tejidos afectados. Los armazones de ese tipo se pueden administrar a un sujeto con un defecto de cartílago con necesidad de reparación, en el que una inserción óptima del armazón para la estimulación de reparación de cartílago necesita el anclaje del armazón en el hueso subyacente, por ejemplo, creando un hueco mínimo en el hueso subyacente para la inserción del armazón, y una
25 vez insertado, el armazón facilita la reparación tanto del cartílago que lo reviste como del hueso subyacente.

Los armazones de ese tipo se pueden administrar a un sujeto con un defecto osteocondral, en el que tanto el tejido óseo y de cartílago tienen necesidad de reparación como parte de la patogénesis del trastorno. Los armazones de acuerdo con este aspecto son particularmente adecuados para las aplicaciones de ese tipo.

30 La presente invención también proporciona la aplicación inesperada de que la regeneración, preparación y potenciación de la formación de cartílago y/o hueso es óptima cuando dos armazones de coral constan de dos fases, fases que comprenden cuerpos, y que varían en términos del diámetro medio de los huecos dentro de cada fase, y/o que la regeneración, reparación y potenciación de la formación de cartílago y/o hueso eso que cuando los armazones de coral constan de dos fases, fases que varían en términos de sus respectivos volúmenes de poro (porosidad).

35 Se observará que el término "coral" hará referencia a un material de partida a partir del cual se puede aislar aragonito y/o calcita.

40 El coral para uso en la preparación de los armazones de la presente invención se puede procesar mediante cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Publicación Internacional PCT con N.º WO2010026565 A1. En algunas realizaciones, escolar se puede procesar de acuerdo con un método que se desvela en el presente documento.

45 También se desvela, pero no forma parte de la invención que se reivindica, un método para la purificación de un armazón de base coralina, dicho método comprendiendo las etapas de:

- poner en contacto aragonito sólido de un tamaño y forma deseados con una solución que comprende un agente oxidante; y
- lavar y secar dicho aragonito sólido

de modo que una o cada una de dichas etapas se realiza bajo una presión negativa aplicada.

55 La presión negativa aplicada varía entre aproximadamente 0,02 MPa y 1 Pa (de 0,2 a 0,00001 bares), o la presión negativa aplicada varía entre 0,04 MPa y 0,001 Pa (de 0,4 a 0,000001 bares).

El agente oxidante para uso en los métodos que se desvelan puede ser cualquier agente oxidante, que faciliten la retirada de residuos orgánicos de los armazones de base de coralina.

60 El agente oxidante puede incluir, entre otros, nitrato de potasio (KNO₃), hipoclorito y otros compuestos de hipohalita, yodo y otros halógenos, clorito, clorato, perclorato, sales de permanganato, nitrato de amonio y cerio (IV) nitrato, compuestos de cromo hexavalente, clorocromato de piridinio (PCC), y compuestos de cromato/dicromato, compuestos de peróxido, sulfóxidos, ácido persulfúrico, o ácido nítrico, acetona, peroxidisulfato de amonio, 1,4-benzoquinona, N-terc-butilbencenosulfonilimidoilo, cloruro, hidropéroxido de terc-butilo, hipoclorito de terc-butilo, ácido 3-cloroperoxibenzoico, ácido meta-cloroperbenzoico, hidropéroxido de cumeno, dimetilsulfóxido, peróxido de
65

5 hidrógeno, óxido de manganeso, ácido meta-cloroperbenzoico, N-óxido de N-metilmorfolina, metiltrioxorrenio (MTO), cloruro de oxalilo, cloruro de N-terc-butilbencenosulfinimidoilo, Oxone, oxígeno, ozono, ácido peracético, ácido peryódico, peroxi ácido, pivaldehído, permanganato de potasio, peroxidisulfato de potasio, peroximonosulfato de potasio, 2-propanona, clorito de sodio, percarbonato de sodio, peryodato de sodio, estireno, ácido tricloroisocianúrico (TCCA), 2,2,6,6-tetrametilpiperidiniloxi TEMPO, hidroperóxido de terc-butilo, hipoclorito de terc-butilo, peroxidisulfato de tetrabutilamonio, trimetilacetaldehído. En algunas realizaciones, el agente oxidante es hipoclorito sódico.

El método puede comprender la realización de dicha puesta en contacto en condiciones ligeramente ácidas.

10 El método puede comprender someter el aragonito sólido a una temperatura de al menos 275 °C bajo presión negativa aplicada.

El método puede comprender poner en contacto el aragonito con un agente oxidante bajo presión negativa aplicada, lavar y secar el aragonito presión negativa aplicada, o ambas etapas se realizan bajo presión negativa aplicada. La presión negativa aplicada varía entre 0,02 MPa y 1 Pa (de 0,2 a 0,00001 bares), o en algunas realizaciones, entre 15 aproximadamente 0,04 MPa y 0,001 Pa (entre 0,4 y 0,0000001 bares).

Los armazones y kits de la presente invención hacen uso de formas coralinas sólidas.

20 Las formas sólidas o armazones pueden ser de origen en aragonito o calcita.

La expresión "forma sólida" con respecto a la calcita se refiere a calcita aislada de coral, calcita que se trata para retirar residuos, proteínas y otra materia en partículas, sin embargo, los materiales de ese tipo no se transforman por vía hidrotérmica, ni se Trituran, y se vuelven a suspender. La calcita en "forma sólida" se refiere a calcita obtenida por 25 la preparación de una forma sólida de aragonito, forma que a continuación se convierte en calcita mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante exposición de la forma a temperatura elevada al vacío.

Para preparar armazones de calcita se puede usar cualquier método para la conversión de aragonito en calcita como se sabe en la técnica. El Ejemplo 5 que se presenta a continuación en el presente documento describe la conversión 30 de aragonito en calcita y demuestra una transformación completa satisfactoria para ello (Figura 6).

Los armazones de la presente invención pueden comprender, en algunas realizaciones, una serie de huecos, y las dos fases presentes en los armazones de la presente invención varían en términos del diámetro medio de los huecos presentes en cada fase. En algunas realizaciones, el armazón comprende una primera fase, que comprende huecos que tienen un diámetro medio que varía de aproximadamente 60-160 µm. En algunas realizaciones, la primera fase puede comprender huecos que tienen un diámetro medio que varía de aproximadamente 60-90 µm, o 35 en algunas realizaciones, de aproximadamente 80-130 µm, o en algunas realizaciones, de aproximadamente 120-160 µm.

En algunas realizaciones, el armazón puede comprender una segunda fase, que comprende huecos que tienen un diámetro medio que varía de aproximadamente 170-850 µm. En algunas realizaciones, la segunda fase puede comprender huecos que tienen un diámetro medio que varía de aproximadamente 170-400 µm, o en algunas realizaciones, de aproximadamente 250-500 µm, o en algunas realizaciones, de aproximadamente 450-700 µm o en algunas realizaciones, de aproximadamente 550-850 µm 40

En algunas realizaciones, el armazón tiene una forma cilíndrica y tiene un diámetro de aproximadamente 5-15 mm, y una altura de aproximadamente 5-25 mm. En algunas realizaciones, el armazón tiene un diámetro de aproximadamente 1-35 mm, y una altura de aproximadamente 1-45 mm, o aproximadamente 5-40 mm, y una altura de aproximadamente 5-60 mm, o aproximadamente 5-15 mm, y una altura de aproximadamente 5-45 mm. 45

El diámetro medio de los huecos dentro de las fases de los armazones de la presente invención se puede determinar mediante cualquier medio, incluyendo análisis de imágenes digitales, como se hace a modo de ejemplo adicionalmente en lo sucesivo en el presente documento. En una realización, un coral para uso en un armazón de la presente invención comprende un diámetro de hueco medio apropiado para siembra celular y/o desarrollo de 50 vasculatura.

Las formas sólidas de la presente invención consisten en dos fases, fases que contienen poros, debido a la naturaleza porosa de los materiales que forman los armazones. En algunas realizaciones, las fases varían en términos del volumen del poro (porosidad) de cada fase. 55

Se observara que de acuerdo con este aspecto, las expresiones "primera fase" y "segunda fase" no se aplican a un orden en particular con respecto a la inserción de la fase dentro de un sitio con defecto, por ejemplo, dentro de un defecto osteocondral, y cualquiera de la primera fase o la segunda fase se puede orientar para que sea proximal, por ejemplo, al cartílago dentro de un sitio de reparación, a diferencia de la realización anterior de un armazón como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en el que la primera fase se inserta proximal a un sitio de 60 reparación de cartílago. De acuerdo con este aspecto, el armazón se puede modificar adicionalmente para que 65

comprenda fases que comprenden poros que tienen el volumen de poro indicado, y cualquier fase puede comprender adicionalmente un polímero biocompatible tal como ácido hialurónico y una serie de huecos u orificios a lo largo de un eje longitudinal en dicha segunda fase, como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "volumen de poro" se refiere un volumen o espacios abiertos dentro de los armazones porosos de la presente invención. El volumen de poro se determina mediante cualquier medio conocido en la técnica. La porosidad se puede calcular mediante métodos convencionales, un ejemplo de los cuales se proporciona adicionalmente en lo sucesivo en el presente documento, véase por ejemplo, Karageorgiou V, Kaplan D. (2005) "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis" *Biomaterials.*; 26 (27):
10 5474-9¹.

Se observará que diferentes especies de coral varían en términos de su diámetro de poro medio y volumen de poro y la invención contempla el uso de cualquiera de los corales de ese tipo como un material de partida para la preparación de los armazones como se describe en el presente documento, en los que el armazón se caracteriza por que consiste en dos fases, en el que una primera fase contiene huecos, y un volumen de poro nativo para el coral a partir del que se preparan los armazones, y una segunda fase, cuyos huecos están agrandados, cuyo volumen de poro general aumenta, o una combinación de los mismos.

20 Se han descrito polimorfos de calcita de carbonato de calcio de piedra caliza natural {Fujita Y, Yamamuro T, Nakamura T, Kotani S, Ohtsuki C, Kokubo T. *J Biomed Mater Res.* Agosto de 1991; 25 (8): 991-1003}. También se ha descrito la transformación *in vitro* de calcita mediante calentamiento de aragonito aislado a partir de coral natural (Fricain JC, Bareille R, Ulysse F, Dupuy B, Amedee J. *J. Biomed Mater Res.* Oct de 1998;42 (1): 96-102).

25 El término "proximal" se refiere a algo que se sitúa cerca de un sitio en particular. Un armazón de la presente invención se puede mantener de manera forzosa en su posición dentro de un sitio de reparación de cartílago mediante una región elevada del armazón que está en contacto con tejido situado en o en una zona proximal con respecto a un sitio de reparación de cartílago.

30 Mediante la optimización de la colocación específica de un armazón, la estructura cristalina porosa de un armazón de coral de la presente invención, que se describe a continuación, es accesible a componentes beneficiosos situados dentro de un medio tisular. Por ejemplo, la estructura cristalina porosa del coral permite el crecimiento interno de vasos sanguíneos para crear un suministro de sangre para el cartílago que se infiltrará en el armazón durante la reparación del cartílago. Al penetrar en un hueco de médula ósea, las células madre mesenquimales situadas dentro de la médula ósea ahora tienen acceso a la superficie expuesta del armazón. En una realización, la región del armazón que penetra en un hueco de médula ósea atrae a las células madre mesenquimales de la médula ósea y estimula la formación de vasos sanguíneos en el sitio de la reparación de cartílago. La región del armazón que penetra en un hueco de médula ósea puede estimular la adhesión, proliferación o diferenciación o una combinación de los mismos, de las células madre mesenquimales atraídas al armazón.

40 Por lo tanto, para alguien con experiencia en la materia será evidente que la colocación específica del armazón dentro de un sitio de reparación de cartílago coloca el armazón de la presente invención de un modo tal que el armazón sea lo más eficaz para la reparación del cartílago.

45 La región del armazón que penetra a través del hueso y se inserta de forma estable dentro de la médula ósea también puede ser la región del armazón que colocada y limita al armazón dentro de un sitio de reparación del cartílago, o la región del armazón que penetra a través del hueso y se inserta de forma estable dentro de la médula ósea no es la región que colocar y limita al armazón dentro de un sitio de reparación del cartílago. La región se puede insertar una manera tal que ninguna otra parte del armazón entré en contacto con el tejido en el sitio. La región se puede insertar de un modo tal que las paredes laterales del armazón entren en contacto con el tejido en el
50 sitio de reparación del cartílago.

En algunas realizaciones, el armazón tiene una forma que aloja un sitio de reparación.

55 En algunas realizaciones, el armazón tiene la forma aproximada de un cilindro, cono, taco, barra de metal, tornillo, barra rectangular, placa, disco, pirámide, gránulo, bola o cubo.

60 Los armazones de la presente invención se pueden usar en conjunto con otros materiales conocidos y/o disponibles para estimular/potenciar la reparación del hueso y/o el cartílago. Los armazones de la presente invención se pueden usar para fijar armazones adicionales, por ejemplo para su uso en reparación de articulación completa o reparación del ligamento, u otra reparación de tejido conectivo.

65 Los armazones de la presente invención se pueden usar por ejemplo, como una barra de metal, en conjunto con otros armazones para preparación o regeneración ósea, etc. Se observará que los armazones de la presente invención pueden tener cualquier forma o tamaño adecuados para acomodar su aplicación de acuerdo con los métodos que se desvelan en el presente documento. Por ejemplo, para aplicaciones de los armazones de la presente invención dentro de huesos largos de un sujeto, las dimensiones del armazón se aumentarán a escala

5 hasta aproximadamente la del sitio en el que se implantará el armazón, y pueden ser de un orden de magnitud que aumenta en escala desde milímetros a centímetros, si fuera necesario. De forma análoga, las formas de los armazones de la invención pueden ser de cualquier forma en la que los armazones de la presente invención se puedan trabajar con máquina o procesar, y pueden tener cualquier configuración que sea apropiada para conseguir el crecimiento, reparación o regeneración deseados de hueso y/o cartílago.

De acuerdo con la invención el armazón comprende una serie de huecos a lo largo de un eje de coordenadas Cartesianas de dicho armazón y en algunas realizaciones, el eje es un eje largo de dicho armazón.

10 En algunas realizaciones, la invención proporciona un kit para la reparación, regeneración o potenciación de la formación de cartílago, hueso, o una combinación de los mismos que comprende el armazón de la presente invención, directrices para usar dicho armazón en la reparación, regeneración o potenciación de la formación de cartílago, hueso, o una combinación de los mismos y opcionalmente una herramienta o herramientas para una inserción óptima de dicho armazón, siembra de dicho armazón con células o una combinación de los mismos.

15 El coral se puede sembrar con una célula precursora. La célula precursora puede ser una célula madre mesenquimal. La célula puede ser una célula mesenquimal; condrocito; fibrocondrocito; osteocito; osteoblasto; osteoclasto; sinoviocito; célula de médula ósea; célula del estroma; célula madre; célula precursora, obtenida a partir de tejido adiposo; célula precursora de sangre periférica; célula madre aislada de tejido adulto; célula transformada genéticamente; o una combinación de las mismas. Una célula precursora puede hacer referencia a una combinación de condrocitos y otras células; una combinación de osteocitos y otras células; una combinación de sinoviocitos y otras células; una combinación de células de médula ósea y otras células; una combinación de células mesenquimales y otras células; una combinación de células del estroma y otras células; una combinación de células madre y otras células; una combinación de células madre embrionarias y otras células; una combinación de células precursoras aisladas de tejido adulto y otras células; una combinación de células precursoras de sangre periférica y otras células; una combinación de células madre aisladas de tejido adulto y otras células; y una combinación de células transformadas genéticamente y otras células. Las células precursoras para so se pueden preparar a partir de un tejido de órgano del mamífero receptor (es decir, autólogo), o un mamífero singénico. Se pueden usar células precursoras alogénicas y xenogénicas.

30 La primera fase o dicha segunda fase se puede insertar en una región que es proximal al hueso subcondral.

La fase que se inserta puede comprender al menos una modificación terminal, que aumenta la reparación de tejido.

35 Se puede considerar que un sitio de reparación de cartílago comprende un espacio en 3 dimensiones (3-D) en o proximal a un sitio de un cartílago y/o defecto o defecto potencial. Este espacio 3-D puede comprender al menos una pared o un suelo, o una combinación de los mismos, y en el presente documento se puede describir la colocación dentro de un sitio de ese tipo, con respecto a dicha pared o suelo, o la colocación puede ser relativa a la inserción dentro de un sitio de tejido proximal a dicha pared o suelo. La colocación puede incluir la inserción del armazón o una región del mismo, después de la pared y/o suelo del cartílago y/o tejido óseo o un sitio de defecto o lesión o defecto potencial o lesión en el cartílago y/o tejido óseo, de modo que se produce la inserción en el tejido óseo.

45 Un experto en la materia reconocerá que la forma de un sitio de preparación de cartílago y/o hueso y la forma de un armazón 3-D de la presente invención proporcionan muchas combinaciones diferentes para la colocación de forma estable de un armazón dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso. A un armazón de la presente invención se le puede dar forma antes de su uso para reparación de cartílago y/o hueso. A un armazón de la presente invención se le puede dar forma simultáneamente a su uso para reparación de cartílago y/o hueso. Al darle forma a un armazón simultáneamente con el uso del armazón, las dimensiones del armazón se pueden seleccionar de forma precisa para colocación específica del armazón dentro de un sitio de reparación. Se observará que se pueden colocar múltiples armazones de la presente invención dentro os espera forme colocar dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso.

55 La referencia a un "armazón", "implante" o "tapón", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier realización o realizaciones combinadas como se describe en el presente documento con respecto a los armazones que se va a considerar que están incluidos en el aspecto que se describe de la presente invención. Por ejemplo, se debe entender que la referencia a un "armazón", como se usa en el presente documento, hace referencia a cualquier realización de un armazón como se describe en el presente documento que se puede aplicar para la finalidad indicada o que contiene el atributo indicado, etc.

60 "Armazón" se refiere a una plataforma conformada usada para reparación de cartílago y/o hueso, en el que la plataforma conformada proporciona un sitio para regeneración de cartílago y/o hueso. En una realización, el armazón es una plataforma temporal. "Plataforma temporal" se refiere a una degradación natural de un coral de la presente invención que se produce a lo largo del tiempo durante la reparación de cartílago y/o hueso, en la que la degradación total o parcialmente natural del coral puede dar como resultado un cambio de forma en el armazón a lo largo del tiempo y/o un cambio en el tamaño del armazón a lo largo del tiempo.

En una realización, al coral se le da la forma del tejido que se va a hacer crecer. Por ejemplo, al coral se le puede dar la forma de una pieza de tejido cartilaginosa, tal como un menisco para una rodilla o codo; una articulación; una superficie articular de un hueso, la cavidad torácica, una cadera, una pelvis, una oreja, una nariz, un ligamento, los tubos bronquiales y los discos intervertebrales.

5 La presente invención proporciona, en algunas realizaciones, armazones de coral adecuados para su uso en la reparación de defectos de cartilago y/o tejido óseo asociados con traumatismos físicos, o defectos de cartilago y/o tejido óseo asociados con una enfermedad o trastorno en un sujeto.

10 En una realización de la presente invención, el término "coral" se refiere a un coral que se corta a partir de una sola pieza de coral. En una realización, el coral tiene cavidades o intersticios similares a poros.

Al armazón de coral se le puede dar forma antes de su uso en reparación de cartilago y/o hueso. Al armazón de coral se le puede dar forma simultáneamente con un método de reparación de cartilago y/o hueso, por ejemplo, al armazón de coral se le puede dar forma durante la cirugía cuando el sitio de reparación se puede observar de la mejor manera, optimizando de ese modo la forma del armazón usado.

Los armazones y kits de la presente invención hacen uso de un coral sólido. En una realización, el coral comprende cualquier especie, incluyendo, entre otras, Porites, Acropora, Millepora, o una combinación de las mismas.

20 En una realización, el coral es de la especie Porites. En una realización, el coral es *Porites Lutea*. En la mayoría de las especies, las proporciones de hueco con respecto a sólido generalmente están en el intervalo de 0,4 a 0,6, y la fase de huecos se interconecta completamente, formando una red altamente regular que interpenetra la fase sólida de carbonato de calcio. Esta arquitectura uniforme y de interconexión es particularmente útil como una estructura en los armazones y kits de la presente invención.

En una realización, el coral es de la especie Acropora. En una realización, el coral es *Acropora grandis*, que en una realización es muy común, de crecimiento rápido, y fácil de crecer en cultivo. Por lo tanto, las muestras de Acropora se pueden recoger fácilmente en zonas protegidas de los arrecifes de coral y la recogida de los arrecifes de coral se puede evitar mediante el uso de material de coral cultivado.

La densidad media del esqueleto de *Acropora grandis* es de 2,7 g/ml. Dado que el esqueleto de esta especie de coral es denso y fuerte, se puede trabajar fácilmente para una diversidad de configuraciones de productos o estructuras conformadas de diferentes tamaños, por ejemplo mediante trituración. Este material es particularmente adecuado para su uso en un dispositivo de implante, en particular para articulaciones que soportan peso tales como articulaciones de rodilla y cadera, en las que la resistencia es una propiedad esencial del dispositivo de implante. Por lo tanto, el coral Acropora útil como una estructura en los armazones y kits de la presente invención.

40 En otra realización, el coral es de la especie Millepora. En una realización, el coral es *Millepora dichotoma*. En una realización, el coral tiene un tamaño de poro de 150 µm y se puede clonar y cultivar, haciendo que Millepora sea útil como una estructura en los armazones y kits de la presente invención.

En otra realización, el coral es de una cualquiera o más de las siguientes especies: *Favites halicora*; *Goniastrea retiformis*; *Acanthastrea echinata*; *Acanthastrea hemprichi*; *Acanthastrea ishigakiensis*; *Acropora aspera*; *Acropora austera*; *Acropora sp. "digitado de color marrón"*; *Acropora carduus*; *Acropora cerealis*; *Acropora chesterfieldensis*; *Acropora clathrata*; *Acropora cophodactyla*; *Acropora sp. "de tipo danai"*; *Acropora divaricata*; *Acropora donei*; *Acropora echinata*; *Acropora efflorescens*; *Acropora gemmifera*; *Acropora globiceps*; *Acropora granulosa*; *Acropora véase hemprichi*; *Acropora kosurini*; *Acropora véase loisettae*; *Acropora longicyathus*; *Acropora loripes*; *Acropora véase lutkeni*; *Acropora paniculata*; *Acropora proximalis*; *Acropora rudis*; *Acropora selago*; *Acropora solitaryensis*; *Acropora véase spicifera de acuerdo con Veron*; *Acropora véase spicifera de acuerdo con Wallace*; *Acropora tenuis*; *Acropora valenciennesi*; *Acropora vaughani*; *Acropora vermiculata*; *Astreopora gracilis*; *Astreopora myriotalma*; *Astreopora randalli*; *Astreopora suggesta*; *Australomussa rowleyensis*; *Coscinaraea collumna*; *Coscinaraea crassa*; *Cynarina lacrymalis*; *Distichopora violacea*; *Echinophyllia echinata*; *Echinophyllia véase echinoporoides*; *Echinopora gemmacea*; *Echinopora hirsutissima*; *Euphyllia ancora*; *Euphyllia divisa*; *Euphyllia yaeyamensis*; *Favia rotundata*; *Favia truncatus*; *Favites acuticollis*; *Favites pentagona*; *Fungia granulosa*; *Fungia klunzingeri*; *Fungia mollucensis*; *Galaxea acrhelia*; *Goniastrea edwardsi*; *Goniastrea minuta*; *Hydnophora pilosa*; *Leptoseria explanata*; *Leptoseria incrustans*; *Leptoseria mycetoseroides*; *Leptoseria scabra*; *Leptoseria yabei*; *Lithophyllon undulatum*; *Lobophyllia hemprichii*; *Merulina scabricula*; *Millepora dichotoma*; *Millepora exaesa*; *Millipora intricata*; *Millepora murrayensis*; *Millipora platyphylla*; *Monastrea curta*; *Monastrea colemani*; *Montipora calculata*; *Montipora capitata*; *Montipora foveolata*; *Montipora meandrina*; *Montipora tuberculosa*; *Montipora véase vietnamensis*; *Oulophyllia laevis*; *Oxypora crassispinosa*; *Oxypora lacera*; *Pavona bipartita*; *Pavona venosa*; *Pectinia alcornis*; *Pectinia paeonea*; *Platygyra acuta*; *Platygyra pini*; *Platygyra sp "verde"*; *Platygyra verweyi*; *Podabacia véase lanakensis*; *Porites annae*; *Porites cylindrica*; *Porites evermanni*; *Porites monticulosa*; *Psammocora digitata*; *Psammocora explanulata*; *Psammocora haimeana*; *Psammocora superficialis*; *Sandalolitha dentata*; *Seriatopora caliendrum*; *Stylocoeniella armata*; *Stylocoeniella guentheri*; *Stylaster sp.*; *Tubipora musica*; *Turbinaria stellulata*; o cualquier coral conocido en la técnica, o una combinación de los mismos.

- En otra realización, un coral de los armazones y kits de la presente invención puede ser Madreporaria, Helioporida del orden Coenothecalia, Tubipora del orden Stolonifera, Millepora del orden Milleporina, u otros conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, un coral de los armazones y kits de la presente invención puede comprender coral escleractinio, incluyendo en algunas realizaciones, Goniopora y otros. En algunas realizaciones, un coral de los armazones y kits de la presente invención puede comprender Alveopora. En algunas realizaciones, un coral de los armazones y kits de la presente invención puede comprender corales bambú, incluyendo en algunas realizaciones, coral de la familia Isididae, géneros Keratoisis, Isidella y otros.
- Como se ha descrito anteriormente, una capacidad de la región del armazón para colocar y confinar el armazón de la presente invención depende de la geometría de la región y de la geometría en el sitio de reparación de cartílago y/o hueso en la que se implantará el armazón. En una realización, la geometría de la región comprende un borde pronunciado. En una realización, la geometría de la región comprende un borde redondeado. En una realización, la geometría de la región comprende un borde dentado.
- Una profundidad y ángulo óptimos dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso comprenden la profundidad y ángulo más beneficiosos para la reparación de cartílago y/o hueso. La profundidad y ángulo óptimos más beneficiosos comprenden una posición de modo que un armazón de la presente invención sea accesible a una combinación de células madre mesenquimales, un medio tisular, vasos sanguíneos, nutrientes, un compuesto efector, o un compuesto terapéutico, o una combinación de los mismos.
- El término "profundidad" se refiere a una medición de un armazón de la presente invención que se extiende desde un punto de reposo de línea imaginaria en la superficie abierta de un sitio de reparación con respecto a un lugar por debajo del suelo del tejido en un sitio de reparación de cartílago y/o hueso.
- Alguien con experiencia en la materia reconocerá que la profundidad de otras regiones del armazón puede estar por debajo de cualquier superficie tisular. Por ejemplo, basándose en un sitio de reparación de cartílago con forma similar a un agujero cilíndrico, una línea imaginaria dibujada para que repose a través de la abertura del agujero representa la parte superior del agujero. La colocación del armazón puede dar como resultado que la totalidad del armazón quede por debajo de la parte superior del agujero y por lo tanto a una profundidad inferior de la línea imaginaria a través de la apertura. La colocación del armazón puede dar como resultado que una parte del armazón quiere por encima de la parte superior del agujero y por lo tanto no totalmente dentro de un sitio de reparación de cartílago. El beneficio de la colocación de un armazón a una profundidad puede depender del contacto resultante que el armazón hace con el tejido circundante, ya sea dentro del sitio de reparación de cartílago o proximal al sitio de reparación de cartílago.
- De forma análoga, con respecto al implante de los armazones de la presente invención dentro del hueso, el sitio de implante también se puede concebir como un agujero, con una línea imaginaria pujada para que repose a través de la abertura del agujero, representando la parte superior del agujero. Por consiguiente, la colocación del armazón da como resultado que la totalidad del armazón que está por debajo de la parte superior del agujero o la colocación del armazón pueda dar como resultado que una parte del armazón quede por encima de la parte superior del agujero y por lo tanto no totalmente dentro del sitio de reparación del hueso. El beneficio de la colocación de un armazón a una profundidad puede depender del contacto resultante que el armazón hace con el tejido circundante, ya sea dentro del sitio de reparación de hueso o proximal al sitio de reparación del hueso.
- El término "ángulo" se refiere a una medición del arco formado por una línea imaginaria a lo largo del eje largo del armazón y una línea vertical imaginaria perpendicular a la línea que reposa en la abertura de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso que se ha descrito anteriormente, con el arco avanzando en una dirección en el sentido de las agujas del reloj alrededor de esta línea vertical imaginaria. Por lo tanto, un armazón de la presente invención se puede colocar y limitar a una profundidad y un ángulo óptimos de modo que el armazón sea paralelo a la línea perpendicular, and y por lo tanto el ángulo podría ser de 0 grados. Un armazón de la presente invención se puede colocar perpendicular a la línea vertical imaginaria, y por lo tanto el ángulo podría ser de 90 grados. El armazón se puede colocar y limitar a un ángulo que es igual o inferior a 10 grados. El armazón se puede colocar y limitar a un ángulo que es igual o inferior a 35 grados. El armazón se puede colocar y limitar a un ángulo que es igual o inferior a 55 grados. El armazón se puede colocar y limitar a un ángulo que es igual o inferior a 75 grados. El armazón se puede colocar y limitar a un ángulo que es igual o inferior a 95 grados. El armazón se puede colocar y limitar a un ángulo que es igual o inferior a 115 grados. El armazón se puede colocar y limitar a un ángulo que es igual o inferior a 125 grados. El armazón se puede colocar y limitar a un ángulo inferior a 145 grados. El armazón se puede colocar y limitar a un ángulo que es igual o inferior a 165 grados. El armazón se puede colocar y limitar a un ángulo inferior a 180 grados.
- Múltiples armazones se pueden insertar para ocupar de forma máxima un sitio del defecto, de modo que cada material de armazón se puede insertar a un ángulo y/o forma y/o profundidad y/o porosidad diferentes para alojar la inserción apropiada en la región deseada dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso. Se debe observar que la referencia a ángulos de colocación que se ha mencionado anteriormente se puede realizar con respecto a uno o más armazones insertados en un sitio de defecto de cartílago y/o hueso en particular.

El contacto entre sus superficies expuestas de un armazón y tejido en o proximal a un sitio de reparación de cartílago y/o hueso proporciona una superficie bioactiva que puede inducir o potenciar la reparación de cartílago y/o hueso. Por ejemplo, la superficie expuesta de un armazón puede proporcionar una superficie bioactiva que atrae a las células madre mesenquimales. La superficie expuesta puede proporcionar un sitio para unión, crecimiento, proliferación, o diferenciación de células madre mesenquimales, o una combinación de los mismos, todos procesos que inducen o potencian la reparación del cartílago. Además, la superficie expuesta de un armazón puede atraer a los vasos sanguíneos. Además, el tejido o en o proximal a un sitio de reparación de cartílago y/o hueso puede ser una fuente de nutrientes rica, compuestos efectores, compuesto terapéuticos, o una combinación de los mismos, que pueden ser beneficiosos para la reparación de cartílago y/o hueso de modo que el contacto entre una superficie expuesta de un armazón y un tejido de ese tipo induce o potencia la reparación de cartílago y/o hueso.

El ángulo de colocación de un armazón puede ser tal que el armazón esté en contacto con una región de una pared dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso. Un armazón de la presente invención se puede colocar y limitar de modo que exista un contacto máximo entre el armazón y tejidos en o proximales a un sitio de reparación de cartílago y/o hueso. Un armazón de la presente invención se puede colocar y limitar de modo que una región del armazón penetre en un hueco de hueso subcondral y/o médula ósea y exista un contacto máximo entre el armazón y tejidos en o proximales a un sitio de reparación de cartílago y/o hueso. El contacto entre la superficie expuesta del el armazón y el tejido en o proximal a un sitio de reparación de cartílago y/o hueso proporciona un área de superficie máxima del armazón a la interacción con una población de células madre mesenquimales, vasos sanguíneos, compuestos efectores, u otros componentes de un medio tisular, o una combinación de los mismos.

La colocación y limitación de un armazón de la presente invención a una profundidad y ángulo óptimos dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso proporciona la penetración de una parte de la superficie expuesta del armazón, a través de un tejido óseo.

Al optimizar la colocación específica de un armazón, la estructura cristalina porosa de los armazones de la presente invención, que se ha descrito anteriormente, es accesible a componentes beneficiosos situados dentro de un medio tisular. Por ejemplo, la estructura cristalina porosa del armazón permite el crecimiento interno de vasos sanguíneos para crear un suministro de sangre para el cartílago y/o hueso que se infiltraron en el armazón durante la reparación de cartílago y/o hueso. El armazón puede atraer a células madre mesenquimales y estimular la formación de vasos sanguíneos en el sitio de reparación del cartílago.

Por lo tanto, para alguien con experiencia en la materia será evidente que la colocación específica del armazón dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso coloca el armazón de la presente invención de un modo tal que el armazón sea lo más eficaz para la reparación de cartílago y/o hueso.

"Armazón" se refiere a una plataforma conformada usada para reparación de cartílago y/o hueso, en el que la plataforma conformada proporciona un sitio para formación y/o regeneración de cartílago y/o hueso. El armazón es una plataforma temporal. "Plataforma temporal" se refiere a una degradación total o parcialmente natural de un coral de la presente invención que se produce a lo largo del tiempo durante la reparación de cartílago, en el que la declaración natural del coral puede dar como resultado un cambio de forma en el armazón a lo largo del tiempo y/o un cambio en el tamaño del armazón a lo largo del tiempo.

En una realización del mismo, al coral se le da la forma del tejido que se va a hacer crecer. Por ejemplo, al coral se le puede dar la forma de una pieza de tejido cartilaginoso u óseo, tal como un menisco para una rodilla o codo; una articulación; una superficie articular de un hueso, la cavidad torácica, una cadera, una pelvis, una oreja, una nariz, los tubos bronquiales, los discos intervertebrales, un ligamento, una vértebra, la tibia, el fémur, el hombro y la mandíbula.

Los armazones de coral se pueden usar en reparación de defectos de cartílago y/o tejido óseo asociados con traumatismos físicos, o defectos de cartílago y/o tejido óseo asociados con una enfermedad o trastorno en un sujeto.

En el contexto de la presente invención, el término "coral" se refiere un coral que se corta a partir de una sola pieza de coral. En una realización, el coral tiene cavidades o intersticios similares a poros.

Al armazón de coral se le puede dar forma antes de su uso en reparación de cartílago y/o hueso. Al armazón de coral se le puede dar forma simultáneamente con un método de reparación de cartílago y/o hueso, por ejemplo, al armazón de coral se le puede dar forma durante la cirugía cuando el sitio de reparación se puede observar de la mejor manera, optimizando de ese modo la forma del armazón usado.

El tamaño de un armazón puede ser cualquier tamaño que pudiera ser útil para los fines de la presente invención, como podría saber alguien con experiencia en la materia. El armazón o una parte del mismo pueden tener un tamaño aproximado de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso. El armazón o una parte del mismo pueden tener el tamaño aproximado de un defecto de cartílago y/o hueso de modo que el armazón se puede colocar dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso. El armazón puede tener un tamaño mayor que el de un defecto de cartílago y/o hueso. Por ejemplo, el armazón de la presente invención puede tener un tamaño mayor que el defecto

de un cartílago y/o hueso, de modo que el armazón se puede extender a un sitio de disponibilidad de células mesenquimales. El armazón puede tener un tamaño más pequeño que el defecto de un cartílago y/o hueso.

5 En algunas realizaciones, el tamaño del armazón estará en una escala milimétrica, por ejemplo, teniendo al menos un eje largo de aproximadamente 2-200 mm, o en algunas realizaciones, aproximadamente 1-18 mm, o en algunas realizaciones, aproximadamente 0,5 mm - 3 mm, o en algunas realizaciones, aproximadamente 6-12 mm, o en algunas realizaciones, aproximadamente 10-15 mm, o en algunas realizaciones, semanalmente 12-40 mm, o en algunas realizaciones, aproximadamente 30-100 mm, o en algunas realizaciones, aproximadamente 50-150 mm, o en algunas realizaciones, aproximadamente 100-200 mm.

10 En algunas realizaciones el tamaño del armazón estará en la escala centimétrica, por ejemplo teniendo al menos un eje largo de aproximadamente 0,5-30 cm.

15 El armazón puede tener aproximadamente el mismo tamaño que un hueco tisular en un sitio de reparación de tejido. Este hueco tisular se puede deber a un defecto de cartílago y/o hueso, degeneración de cartílago y/o hueso o se puede haber creado artificialmente durante métodos de reparación de cartílago y/o hueso o cualquier combinación de los mismos. El hueco tisular puede comprender una ausencia de cartílago y/o tejido óseo. El armazón o una parte del mismo puede tener el tamaño de un defecto de cartílago y/o hueso de modo que el armazón se puede colocar dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso para aumentar la formación de cartílago y/o hueso en el sitio de preparación de cartílago y/o hueso. El armazón puede tener un tamaño mayor que el tamaño de un defecto de cartílago y/o hueso de modo que el armazón puede alcanzar un sitio de disponibilidad de células madre mesenquimales.

25 Un ajuste apretado es deseable con respecto al ajuste del implante dentro del sitio de reparación de tejido. Puede ser deseable estrechar un extremo de los armazones de la presente invención para facilitar la inserción dentro de un espacio apretado para ajuste apretado óptimo del implante. La Figura 11 por ejemplo, muestra un esquema de un armazón realizado de la presente invención, de modo que el extremo de inserción en el hueso, en la segunda fase de armazón se estrecha (11-40) para alojar un ajuste apretado más fácil.

30 En el contexto de la presente invención, "aproximadamente" se refiere a una cualidad en la que se satisface el medio para una necesidad específica, por ejemplo, el tamaño puede ser en gran medida pero no totalmente el que se especifica pero satisface la necesidad específica de reparación de cartílago y/o hueso en un sitio de reparación de cartílago y/o hueso. "Aproximadamente" puede hacer referencia a que está cerca o es aproximado a, pero no exactamente. Está presente un pequeño margen de error. Este margen de error podría no superar más o menos el mismo valor entero. Por ejemplo, aproximadamente 0,1 μm podría hacer referencia a no inferior a 0 pero no superior a 0,2.

40 El término "hueco" se refiere a un espacio no ocupado. En la presente invención, por ejemplo, un hueco puede ser un espacio en un armazón no ocupado de forma natural. Un hueco puede ser un espacio no ocupado en un sitio de reparación. Un hueco puede ser un espacio no ocupado dentro de un armazón de la presente invención. Un hueco puede ser un volumen de un poro o una región de poro.

45 El coral se puede lavar, lixiviar, congelar, secar, esterilizar o una combinación de los mismos. El coral se puede procesar como se hace a modo de ejemplo adicionalmente en lo sucesivo en el presente documento. El coral, una vez procesado en los armazones de la presente invención se puede sembrar con una población deseada de células o poblaciones de células, antes de su implante dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso.

50 También se desvela, pero no forma parte de la invención reivindicada, un método para la preparación de un armazón de múltiples fases para la reparación de cartílago, dicho método comprendiendo las etapas de:

- poner en contacto solo una parte de una forma sólida de aragonito o calcita con un agente quelante de calcio y un ácido para producir una forma sólida que comprende huecos agrandados en al menos una parte de dicha forma sólida; y
- lavar y secar dicho forma sólida bajo presión negativa aplicada.

55 El agente quelante de calcio puede ser EDTA. El agente quelante puede comprender: ácido etilendiamin-N,N,N',N'-tetraacético (EDTA), ácido O, O'-bis(2-aminofeniletenglicol)etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA), N,N-bis(2-hidroxietyl) glicina (Bicine), ácido trans-1,2-diaminociclohexano-etilendiamin-N,N,N',N'-tetraacético (CyDTA), ácido 1,3-diamino-2-hidroxiopropano-etilendiamin-N,N,N',N'-tetraacético (DPTA-OH), ácido dietilentriamin-N,N,N',N',N"-pentaacético (DPTA), diclorhidrato del ácido etilendiamin-N,N'-dipropiónico (EDDP), hemihidrato del ácido etilendiamin-N,N'-bis(metilenfosfónico) (EDDPO), ácido N-(2-hidroxietyl)etilendiamin-N,N',N'-triacético (EDTA-OH), ácido etilendiamin-N,N,N',N'-tetraquis (metilenfosfónico) (EDTPO), ácido O,O'-bis(2-aminoetyl) etilenglicol tetraacético (EGTA), ácido N,N'-bis(2-hidroxiethyl)etilendiamina-N,N'-diacético (HBED), ácido 1,6-hexametilendiamin-N,N,N',N'-tetraacético (HDTA), ácido N-(2-hidroxietyl)iminodiacético (HIDA), ácido iminodiacético (IDA), ácido 1,2-diaminopropano-N,N,N',N'-tetraacético (metil-EDTA), ácido nitrilotriacético (NTA), ácido nitrilotripropiónico (NTP), sal trisódica del nitrilotris(ácido metilenfosfónico) (NTPO), N,N,N',N'-tetraquis(2-piridilmetil)etilendiamina (TPEN), y ácido

trietilentetramin-N,N,N',N',N"-hexaacético (TTHA), rhod-2, DMSA, FLUO 3, FURA 2, INDO 1, QUIN 2, u otros agentes quelantes conocidos en la técnica, o una combinación de los mismos.

5 El ácido puede ser ácido fórmico. El ácido puede ser un ácido débil, tal como ácido pícrico, ácido acético, u otros conocidos por el experto en la materia. El ácido puede ser un ácido fuerte tal como ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, u otros, conocidos por el experto en la materia. El ácido puede ser un haluro de hidrógeno, oxoácido de halógeno, tal como: ácido hipoclorítico, ácido clórico, ácido perclórico, ácido peryódico, un ácido fluorosulfúrico, un ácido nítrico, un ácido fosfórico, un ácido fluoroantimónico, un ácido fluorobórico, un ácido hexafluorofosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido tartárico o un ácido crómico.

10 Sin desear quedar ligado por la teoría, los métodos que se desvelan en el presente documento hacen uso de agente quelante de calcio, que actúa como un descalcificador lento del material coralino. El agente quelante, por ejemplo, EDTA, se une al calcio ionizado presente en la capa externa del cristal mineral, reduciendo lentamente el tamaño del cristal. La adición de un agente quelante solo puede ser suficiente para llegar a los armazones de la presente invención.

15 En consecuencia, el material coralino se puede poner en contacto adicionalmente con un ácido, por ejemplo, ácido fórmico. Sin desear quedar ligado por la teoría, la adición del ácido da como resultado una disolución más rápida del material coralino, en comparación con muestras puestas en contacto con un agente quelante solo.

20 La aplicación combinada de agente quelante y ácido da como resultado una disolución controlada, proporcionando un tamaño de poro y volumen homogéneos.

25 La elección del agente quelante, o el ácido, la concentración de cada uno, o una combinación de los mismos proporcionará un control adicional de los huecos agrandados dentro de los armazones de base coralina de la presente invención producidos de ese modo. Se observará que el experto en la materia seleccionará un ácido débil o fuerte, a concentración elevada o baja, y favorecerá a ciertos agentes quelantes para que lleguen a un volumen de poro deseado o diámetro medio para los huecos agrandados en los armazones como se describe en el presente documento. Por ejemplo, y en algunas realizaciones, la concentración del agente quelante variará de aproximadamente un 0,1 % - a aproximadamente un 20 % durante un periodo de tiempo de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 24 horas, y la concentración del ácido variara de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 10 %, durante un periodo de tiempo de aproximadamente 0,1 minutos a aproximadamente 24 horas.

35 La puesta en contacto se puede realizar durante un período de tiempo y en condiciones, que varían como consecuencia de la geometría final deseada del armazón.

40 En el contexto de la presente invención, el término "parte" se refiere a una parte limitada de un conjunto. El término "parte" con respecto a la superficie expuesta como consecuencia de los métodos que se desvelan puede hacer referencia a una parte limitada de una superficie expuesta completa. Por ejemplo, una parte de una superficie expuesta comprende menos de un 100 % de la superficie expuesta. Una parte de una superficie expuesta puede comprender menos de un 90 % de la superficie expuesta. Una parte de una superficie expuesta puede comprender menos de un 80 % de la superficie expuesta. Una parte de una superficie expuesta puede comprender menos de un 70 % de la superficie expuesta. Una parte de una superficie expuesta puede comprender menos de un 60 % de la superficie expuesta. Una parte de una superficie expuesta puede comprender menos de un 50 % de la superficie expuesta. Una parte de una superficie expuesta puede comprender menos de un 40 % de la superficie expuesta. Una parte de una superficie expuesta puede comprender menos de un 30 % de la superficie expuesta. Una parte de una superficie expuesta puede comprender menos de un 20 % de la superficie expuesta. Una parte de una superficie expuesta puede comprender menos de un 10 % de la superficie expuesta. Una parte de una superficie expuesta puede comprender menos de un 1 % de la superficie expuesta.

En el contexto de la presente invención, el término "superficie" se refiere a un límite exterior o superior de un objeto.

55 En el contexto de la presente invención, el término "expuesto" se refiere a que está abierto al entorno circundante de modo que se puede producir contacto entre un armazón de la presente invención y el medio de inmersión.

60 La forma sólida producida con dicho método comprende al menos dos fases, fases que se diferencian en su volumen de poro, o fases que comprenden huecos que se diferencian en términos del diámetro medio de dichos huecos, o una combinación de los mismos. El método como se describe en el presente documento es un medio mediante el cual se pueden preparar los armazones como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

65 Los métodos desvelados dan como resultado armazones producidos que comprenden fases, que se diferencian en términos del diámetro medio de los huecos contenidos en los mismos, o se diferencian en términos del volumen de poro dentro de fases creadas en el armazón de ese modo, o se diferencian en términos de una combinación de los mismos, cuyo diámetro medio y/o volumen de poro son más pequeños o más grandes que los intervalos que se describen en el presente documento.

En una realización, un armazón de la presente invención comprende un sólido a través de un armazón. Un experto en la materia reconocerá que los armazones sólidos de la presente invención además comprenden cavidades y/o intersticios similares a poros.

5 En una realización, un armazón de la presente invención comprende un hueco a lo largo de un eje de coordenadas Cartesianas de un armazón. El hueco puede estar a lo largo de un eje largo de un armazón de la presente invención. El término "hueco" se refiere a una cavidad dentro de un armazón de la presente invención. El hueco puede comprender al menos una sola abertura en el armazón de modo que la cavidad se expone al entorno externo. El hueco puede proporcionar un haría superficial expuesta para un armazón de la presente invención.

10 En algunas realizaciones, los armazones de la presente invención comprenderán múltiples huecos, que pueden estar en cualquier orientación, o en algunas realizaciones, los armazones de la presente invención comprenderán una red de huecos dentro de armazones. En un sitio de reparación se implantan múltiples armazones, en el que los huecos de los armazones se alinean para formar una red de huecos a través de los armazones implantados.

15 El experto en la materia observará que los métodos para creación selectiva de huecos o espacios (términos que se pueden usar indistintamente) dentro de los armazones de la presente invención se pueden preparar mediante cualquier medio conocido por el experto en la materia, por ejemplo, de acuerdo con los métodos como se describe en el presente documento, por ejemplo, mediante sustitución de la parte que se hunde por inmersión de la parte del armazón con aplicación de goteo de la solución de inmersión para crear de forma selectiva huecos dentro de los armazones de la presente solicitud.

20 El área la superficie expuesta de un armazón de la presente invención proporciona una ubicación para células madre mesenquimales, condrocitos, osteoblastos, etc., unión, crecimiento, proliferación o diferenciación, o una combinación y una ubicación para formación de vasos sanguíneos. Por lo tanto, el área de superficie de un armazón de la presente invención proporciona por último una ubicación beneficiosa para la regeneración de cartílago y/o tejido óseo. En una realización de la presente invención, un armazón comprende un hueco, en el que la presencia del hueco aumenta el área de la superficie expuesta de un armazón en comparación con un armazón análogo sin un hueco.

30 En una realización de la presente invención, el armazón comprende un revestimiento polimérico.

35 La expresión "revestimiento polimérico" se refiere, en algunas realizaciones, a la presencia de una capa de material polimérico en asociación con al menos una parte del material de armazón. En algunas realizaciones, un revestimiento de ese tipo puede estar presentes sobre la totalidad del armazón, y en algunas realizaciones, un revestimiento de ese tipo puede penetrar dentro de los huecos y/o poros y/o espacios del armazón. En algunas realizaciones, un revestimiento de este tipo está presente de forma selectiva en una región en particular del armazón, de modo que crea una fase separada sobre el armazón, y en algunas realizaciones, un polímero de ese tipo es una capa de polímero gruesa o fase asociada con una parte de un armazón, creando de ese modo una fase de polímeros separada en asociación con los armazones como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, se incluyen polímeros biocompatibles.

40 El revestimiento polimérico puede reforzar el armazón y el revestimiento polimérico puede dar como resultado una mayor atracción y unión celular a los armazones, que a su vez, entre otros, da como resultado un aumento de la reparación en términos de cantidad, calidad, y tiempos de reparación. El revestimiento polimérico puede aumentar la proliferación y/o diferenciación de células en cartílago y/o hueso que a su vez, entre otros, da como resultado un aumento de la reparación en términos de cantidad, calidad y tiempos de reparación.

45 Un revestimiento polimérico puede ser permeable. El revestimiento polimérico permeable puede comprender una membrana porosa especial. El término "permeable" puede hacer referencia aquí tiene poros y aberturas. El revestimiento polimérico permeable puede tener poros y aberturas que permiten la entrada de nutrientes, un compuesto terapéutico, una población celular, un agente quelante, o una combinación de los mismos. El revestimiento polimérico permeable puede tener poros o aberturas que permiten la salida/liberación de nutrientes, un compuesto terapéutico, una población celular, un agente quelante, o una combinación de los mismos.

50 Un revestimiento polimérico puede ser discontinuo. Una región o una pluralidad de sub-regiones del coral pueden comprender una ausencia de revestimiento polimérico, que permite el contacto directo entre el coral y el entorno.

55 En algunas realizaciones, el armazón incorpora un polímero biocompatible en el mismo, que se asocia con el componente de aragonito o calcita, mediante cualquier asociación física o química. El polímero puede ser una parte de un hidrogel, que se incorpora en los armazones de la presente invención. A partir de ese momento los armazones que contienen hidrogel se pueden liofilizar o desecar, y a partir de ese momento se pueden reconstituir.

60 En los armazones de la presente invención que contienen dos fases separadas, los polímeros biocompatibles Se incorporan en la primera fase solo o en la segunda fase solo.

65

- Los armazones que contienen polímeros de ese tipo pueden ser particularmente adecuados para reparación, regeneración o potenciación de la formación de cartílago del mismo. Por ejemplo, en el tratamiento de defectos osteocondrales, el armazón de base coralina tiene una dimensión adecuada para su incorporación dentro del hueso afectado, y comprende adicionalmente una frase que contiene polímero, fase que, cuando se inserta dentro del sitio del defecto afectado, es proximal al cartílago afectado. En otro aspecto, el armazón comprende un polímero, polímero que ha permeado dentro de los huecos y poros del armazón, armazón que se inserta dentro de un sitio de reparación de cartílago y polímero que facilita el crecimiento, regeneración o curación del cartílago del sitio con defecto.
- Los armazones que contienen polímeros de ese tipo pueden ser particularmente adecuados para reparación, regeneración o potenciación de formación de hueso del mismo. De acuerdo con este aspecto, por ejemplo, en el tratamiento de ruptura o fragmentación, enfermedad o defecto de hueso, el armazón de base coralina puede ser de una dimensión adecuada para su incorporación dentro del hueso afectado, y comprende adicionalmente un polímero, polímero que ha permeado dentro de los huecos y poros del armazón, armazón que se inserta dentro del hueso y polímero que facilita el crecimiento, regeneración o curación de hueso del sitio con defecto.
- Un revestimiento polimérico puede comprender un polímero natural que comprende, colágeno, elastina, seda, ácido hialurónico, hialuronato de sodio, ácido hialurónico reticulado, quitosano, quitosano reticulado, alginato, alginato de calcio, alginato de calcio reticulado y cualquier combinación de los mismos.
- El polímero puede comprender polímeros naturales modificados sintéticamente, y puede incluir derivados de celulosa tales como alquil celulosas, hidroxialquil celulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa y nitrocelulosas. Los ejemplos de derivados de celulosa adecuados incluyen metil celulosa, etil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, hidroxibutil metil celulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato butirato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, carboximetil celulosa, triacetato de celulosa y sal sódica de sulfato de celulosa.
- Un polímero puede comprender un polímero biodegradable sintético. Un polímero biodegradable sintético comprende alfa-hidroxi ácidos que incluyen ácido poli-láctico, ácido poliglicólico, enantiómeros de los mismos, copolímeros de los mismos, poliortoésteres, y combinaciones de los mismos.
- Un polímero comprende un poli(cianoacrilato), poli(alquil-cianoacrilato), poli(cetal), poli(caprolactona), poli(acetal), poli(α -hidroxi-éster), poli(α -hidroxi-éster), poli(hidroxil-alcanoato), poli(propilen-fumarato), poli(imino-carbonato), poli(éster), poli(éter), poli(carbonatos), poli(amida), poli(siloxano), poli(silano), poli(sulfuro), poli(imidas), poli(urea), poli(amida-enamina), poli(ácido orgánico), poli(electrolitos), poli(p-dioxanona), poli(olefina), poloxámero, polímeros inorgánicos u organometálicos, elastómero, o cualquiera de sus derivados, o un copolímero obtenido mediante una combinación de los mismos.
- Un polímero comprende poli(D,L-lactida-co-glicólido) (PLGA). Como alternativa, el polímero comprende poli(D,L-lactida) (PLA). En otra realización, el polímero comprende poli(D,L-glicólido) (PGA). En una realización, el polímero comprende un glicosaminoglicano.
- El polímero puede comprender polímeros degradables sintéticos, que pueden incluir, pero no se limitan a polihidroxi ácidos, tales como poli(lactida)s, poli(glicólido)s y copolímeros de los mismos; poli(tereftalato de etileno); poli(ácido hidroxibutírico); poli(ácido hidroxivalérico); poli[lactida-co-(ϵ -caprolactona)]; poli[glicólido-co(ϵ -caprolactona)]; poli(carbonato)s, poli(pseudo aminoácidos); poli(aminoácidos); poli(hidroxialcanoato)s; poli(anhídridos); poli(orto éster)es; y mezclas y copolímeros de los mismos.
- Un polímero puede comprender proteínas tales como zeína, zeína modificada, caseína, gelatina, gluten, albúmina de suero, colágeno, actina, α -fetoproteína, globulina, macroglobulina, cohesina, laminina, fibronectina, fibrinógeno, osteocalcina, osteopontina, osteoprotegerina, u otras, como será observado por alguien con experiencia en la materia. Como alternativa, un polímero puede comprender azúcares cíclicos, ciclodextrinas, derivados sintéticos de ciclodextrinas, glicolípidos, glicosaminoglicanos, oligosacáridos, polisacáridos tales como alginato, carragenano (χ , λ , μ , κ), quitosano, celulosas, sulfato de condroitina, curdlano, dextranos, elsinano, furcelarano, galactomanano, gelano, glucógeno, goma arábiga, hemicelulosa, inulina, goma de karaya, levano, pectina, polulano, pululano, profirano, escleroglucano, almidón, goma de tragacanto, goma Welan, xantano, xilano, xiloglucano, ácido hialurónico, quitina, o un poli(3-hidroxialcanoato)s, tal como poli(β -hidroxibutirato), poli(3-hidroxiocetanoato) o poli(3-hidroxiácidos grasos), o cualquier combinación de los mismos.
- El polímero puede comprender un polímero bioerosionable tal como poli(lactida-co-glicólido)s, poli(anhídrido)s, y poli(ortoéster)es, que tienen grupos carboxílicos expuestos en la superficie externa a medida que la superficie lisa del polímero se erosiona, que también se puede usar. El polímero puede contener enlaces lábiles, tales como polianhídridos y poliésteres.
- Un polímero puede comprender derivados químicos del mismo (sustituciones, adiciones y eliminación de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquileo, hidroxilaciones, oxidaciones y otras modificaciones hechas de forma

rutinaria por las personas con experiencia en la materia), mezclas de, por ejemplo proteínas o carbohidratos solos o en combinación con polímeros sintéticos.

5 El polímero puede ser biodegradable. El término "biodegradable" o formas gramaticales del mismo, se refiere a un material, que se degrada en el entorno biológico del sujeto en el que se encuentra. El material biodegradable puede sufrir degradación, durante la cual, se liberan productos ácidos, o en otra realización, productos básicos. La biodegradación implica la degradación de un material en sus subunidades componentes, a través de, por ejemplo, digestión, mediante un proceso bioquímico. La biodegradación puede involucrar la escisión de enlaces (ya sea covalente o de otro tipo), por ejemplo, en una estructura principal de polímero de la presente invención. La biodegradación puede implicar la escisión de un enlace (ya sea covalente o de otro tipo) interna para una cadena lateral o una que conecta una cadena lateral a, por ejemplo, una estructura principal de polímero.

15 Un coral puede estar asociado de manera covalente con el revestimiento polimérico mediante el uso de un agente de reticulación. La expresión "agente de reticulación" se refiere a un agente que facilita la formación de un enlace covalente entre 2 átomos. El agente de reticulación puede ser un agente de reticulación de longitud cero.

20 El agente de reticulación puede ser (1 etil 3- (3dimetil aminopropil) carbodiimida (EDAC), N-Sulfohidroxi succinamida (Sulfo NHS), 5-yodopirimidinas, N-carbalcoxidihidroquinolinas, pirroloquinonaquinonas, o una combinación de las mismas.

25 En una realización, el agente de reticulación es un agente de reticulación homobifuncional, tal como, por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimida (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo o ditiobis(propionato de succinimidilo), imidoéster homobifuncional (por ejemplo, adipimidato de dimetilo o pimelimidato de dimetilo), agente de reticulación reacciona con sulfhidrilo (por ejemplo, 1,4-di-[3'-(2'-piridilditio)propionamido]butano), derivado de difluorobenceno (por ejemplo 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno), aldehído (por ejemplo, formaldehído, glutaraldehído), bis-epóxido (por ejemplo, 1,4-butanodiol diglicidil éter), hidrazida (por ejemplo, dihidrazida del ácido adipico), derivado de bis-diazonio (por ejemplo, o-tolidina), bis-alquilhaluro, o una combinación de los mismos.

30 El agente de reticulación puede ser un agente de reticulación heterobifuncional, tal como, por ejemplo, un agente de reticulación que reacciona con amina y que reacciona con sulfhidrilo (por ejemplo, 3-(2-piridilditio) propionato de N-succinimidilo, un agente de reticulación que reacciona con carbonilo y que reacciona con sulfhidrilo (por ejemplo, hidrazida del ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico), o una combinación de los mismos.

35 El agente de reticulación puede ser un agente de reticulación trifuncional, tal como, por ejemplo, éster de 4-azido-2-nitrofenilbiocitin-4-nitrofenilo, 1,3'-ditiopropionato de sulfosuccinimidil-2-[6-biotinamido]-2-(p-azidobenzamido) hexanoamido]etilo (sulfo-SBED), o una combinación de los mismos.

40 Como alternativa, y la gente de reticulación es una enzima. El agente de reticulación puede comprender una transglutaminasa, una peroxidasa, una xantina oxidasa, una polimerasa, o una ligasa, o una combinación de las mismas.

45 La elección de la concentración del agente de reticulación usado para la actividad variará, como una función del volumen, el agente y el polímero elegidos, en una aplicación determinada, como observará con experiencia en la materia.

50 La asociación de un coral con un revestimiento polimérico puede comprender una asociación física y/o mecánica. Por ejemplo, una asociación física y/o mecánica puede comprender la absorción de cualquier medio, secado al aire, usando un agente de reticulación, aplicación de calor, aplicación de vacío, aplicación de métodos de liofilización, congelación, aplicación de fuerzas mecánicas o cualquier combinación de los mismos, para estimular la asociación física entre un coral y un revestimiento polimérico como se describe en el presente documento.

55 Para un experto en la materia será evidente que las propiedades físicas y/o químicas de un revestimiento polimérico y componentes del mismo pueden influir en los métodos de uso de la presente invención y kits de la misma, para inducir o mejorar la reparación de cartílago y/o hueso.

60 El revestimiento polimérico puede tener un grosor entre 2,0 μm y 0,1 μm . El revestimiento polimérico puede tener un grosor de aproximadamente 1,0 μm . El revestimiento polimérico de la presente invención puede tener un grosor entre 10 μm y 50 μm . El revestimiento polimérico puede tener un grosor de aproximadamente 10-25, o aproximadamente 15-30, o aproximadamente 25-50 μm .

65 El revestimiento polimérico tener un revestimiento fino, que está asociado con los armazones de la presente invención que tiene un grosor como se ha indicado anteriormente en el presente documento.

El revestimiento polimérico puede estar presente a través de los armazones de la presente invención, de modo que, en algunas realizaciones, los poros y huecos dentro de los armazones de la invención se pueden rellenar con polímeros como se describe en el presente documento, y los revestimientos poliméricos de ese tipo pueden tener un

grosor de aproximadamente 60-900 µm.

5 El revestimiento polimérico puede estar presente en un extremo o una parte del revestimiento que forma una fase polimerizar adicional sobre los armazones de la invención. De acuerdo con este aspecto, y en algunas realizaciones, el revestimiento polimérico tendrá un grosor entre aproximadamente 0,1-10 mm.

10 En un sitio de reparación se pueden implantar múltiples armazones que comprenden revestimientos poliméricos, en los que el grosor de revestimiento de un primer armazón puede variar en comparación con un grosor de revestimiento de un segundo armazón, implantado en el sitio de reparación. Las variaciones en el grosor del resto pueden reflejar el intervalo que se describe en el presente documento.

15 El grosor del revestimiento polimérico influyen las características físicas de un armazón de la presente invención. Por ejemplo, el grosor de un revestimiento polimérico puede influir en la elasticidad, resistencia a la atracción, capacidad de adhesión, o poder de retención, o cualquier combinación de los mismos de un armazón de la presente invención. Un revestimiento polimérico puede aumentar la elasticidad de un armazón de la presente invención. Un revestimiento polimérico puede aumentar la resistencia a la tracción de un armazón de la presente invención. La capacidad de adhesión de un revestimiento polimérico se puede relacionar con la adhesión de las células madre mesenquimales, vasos sanguíneos, tejido en un sitio de reparación de cartílago, tejido de cartílago, o tejido óseo, o una combinación de los mismos. Un revestimiento polimérico puede disminuir la capacidad de adhesión de un armazón de la presente invención. Un revestimiento polimérico puede aumentar la capacidad de adhesión de un armazón de la presente invención. Un experto en la materia reconocerá que un revestimiento polimérico puede aumentar capacidad de adhesión para un artículo a la vez que disminuye capacidad de adhesión Para otro artículo. Por ejemplo, el revestimiento polimérico aumenta la capacidad de adhesión a una célula madre mesenquimal y disminuye la capacidad de adhesión de un agente infeccioso. El poder de retención de un revestimiento polimérico se puede relacionar con la retención de una población celular. La población celular retenida dentro de un revestimiento polimérico puede ser una población de células madre mesenquimales, población de condrocitos, población de osteoblastos, etc. El poder de retención de un revestimiento polimérico se puede relacionar con la retención de compuestos efectores.

20 30 El grosor del revestimiento polimérico puede influir en la proliferación y/o diferenciación de células madre mesenquimales aplicadas a los armazones de la presente invención, o puede influir en la activación o migración de células asociadas con la formación o reparación de cartílago y/o hueso para los armazones de la presente invención, o una combinación de los mismos.

35 Las células usadas con los armazones o kits de la presente invención, se pueden modificar por ingeniería para que expresen un producto deseado.

40 En una realización, un revestimiento polimérico de la presente invención comprende un compuesto efector. El compuesto efector se puede aplicar directamente a un revestimiento polimérico del armazón de la presente invención. En una realización, el compuesto efector comprende un componente de un kit de la presente invención para su uso para incorporación en un armazón de la presente invención como se describe en el presente documento. El compuesto efector se puede aplicar directamente a un revestimiento polimérico de la presente invención, sin que se dispersen ningún disolvente.

45 El revestimiento polimérico puede comprender un compuesto efector que comprende una citoquina, una proteína morfogenética ósea (BMP), factores de crecimiento, un agente quelante, una población celular, un compuesto terapéutico, o un antibiótico, o cualquier combinación de los mismos.

50 Los compuestos efectores para su uso en un armazón y/o un kit de la presente invención pueden comprender, entre otros, una citoquina, una proteína morfogenética ósea (BMP), factor de crecimiento, un agente quelante, una población celular, un compuesto terapéutico, un compuesto anti-inflamatorio, un compuesto pro-angiogénico o un antibiótico, o cualquier combinación de los mismos.

55 En el contexto de la invención, la expresión "una población celular" se refiere a una población celular transfectada, una población celular transducida, una población celular transformada, o una población celular aislada de un sujeto, o una combinación de las mismas. Las células transfectadas, transducidas o transformadas, se pueden incorporar en un revestimiento polimérico, o un armazón de la presente invención, o una combinación de los mismos.

60 Las células transfectadas, transducidas o transformadas, se pueden incorporar en un revestimiento polimérico, o un armazón de la presente invención.

65 Una población celular puede comprender células madre mesenquimales. Las células madre mesenquimales se pueden transformar. Una población celular puede comprender células beneficiosas para la formación y/o reparación de cartílago y/o hueso, tal como condroblastos o condrocitos; fibrocondrocito; osteocito; osteoblasto; osteoclasto; sinoviocito; célula de médula ósea; célula del estroma; célula madre; células madre embrionarias; célula precursora, obtenida a partir de tejido adiposo; célula precursora de sangre periférica; célula madre aislada de tejido adulto;

célula transformada genéticamente; o una combinación de los mismos. Una célula precursora puede hacer referencia a una combinación de condrocitos y otras células; una combinación de osteocitos y otras células; una combinación de sinoviocitos y otras células; una combinación de células de médula ósea y otras células; una combinación de células mesenquimales y otras células; una combinación de células del estroma y otras células; una combinación de células madre y otras células; una combinación de células madre embrionarias y otras células; una combinación de células precursoras aisladas de tejido adulto y otras células; una combinación de células precursoras de sangre periférica y otras células; una combinación de células madre aisladas de tejido adulto y otras células; y una combinación de células transformadas genéticamente y otras células. Las células precursoras se pueden preparar a partir de un tejido de órgano del mamífero receptor (es decir, autólogas), o un mamífero singénico. Se pueden usar células precursoras alogénicas y xenogénicas.

En el contexto de la presente invención, la expresión "un compuesto terapéutico" se refiere a un péptido, una proteína o un ácido nucleico, o una combinación de los mismos. El compuesto terapéutico puede ser un compuesto antibacterianos, antiviral, antifúngico o antiparasitario. El compuesto terapéutico puede tener una actividad citotóxica o anti-cáncer. El compuesto terapéutico puede ser una enzima, un receptor, una proteína de canal, una hormona, una citoquina o un factor de crecimiento. El compuesto terapéutico puede ser inmunostimulador. El compuesto terapéutico puede inhibir respuestas inflamatorias o inmunológicas. El compuesto terapéutico puede comprender un factor proangiogénico.

En el contexto de la invención, la expresión "un compuesto terapéutico", se refiere a una molécula, que cuando se proporciona a un sujeto con necesidad, proporciona un efecto beneficioso. En algunos casos, la molécula es terapéutica porque funciona para sustituir una ausencia o presencia disminuida de una molécula de ese tipo en un sujeto. La molécula puede ser un ácido nucleico que codifica la expresión de una proteína que está ausente, tal como en casos de un mutante nulo o endógeno que se está compensando mediante la expresión de la proteína extraña. La proteína endógena se puede mutar y produce una proteína no funcional, compensada mediante la expresión de una proteína funcional heteróloga. La expresión de una proteína heteróloga puede ser aditiva a niveles endógenos bajos, dando como resultado un aumento de la expresión acumulativa de una proteína dada. La molécula puede estimular una cascada de señalización que proporciona expresión, o secreción, u otros de un elemento fundamental para funcionamiento celular o del hospedador.

El compuesto terapéutico puede ser insulina más naturales no naturales, amilasas, proteasas, lipasas, quinasas, fosfatasa, glicosil transferasas, tripsinógeno, quimotripsinógeno, carboxipeptidasas, hormonas, ribonucleasas, desoxirribonucleasas, triacilglicerol lipasa, fosfolipasa A2, elastasas, amilasas, factores de coagulación sanguínea, UDP glucuronil transferasas, ornitina transcarbamilasas, enzimas de citocromo p450, adenosina desaminasas, factores tímicos de suero, factores humorales tímicos, timopoyetinas, hormonas de crecimiento, somatomedinas, factores coestimuladores, anticuerpos, factores estimulantes de colonias, eritropoyetina, factores de crecimiento epidérmico, factores eritropoyéticos hepáticos (hepatopoyetina), factores de crecimiento de células hepáticas, interleuquinas, interferones, factores de crecimiento negativo, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento transformantes de la familia α , factores de crecimiento transformantes de la familia β , gastrinas, secretinas, colecistoquininas, somatostatinas, serotoninas, sustancia P, factores de transcripción o combinaciones de los mismos.

El compuesto efector puede comprender, un anti-helmíntico, una antihistamina, un compuesto inmunomodulador, un anticoagulante, un tensioactivo, un anticuerpo, un inhibidor de receptores beta-adrenérgicos, un bloqueador de los canales de calcio, un inhibidor de ace, un factor de crecimiento, una hormona, un ADN, un ARNsi, o un vector o cualquier combinación de los mismos.

En el contexto de la invención, la expresión "compuesto efector" se refiere a cualquier agente o compuesto, que tiene una finalidad o aplicación específica que es útil en el tratamiento, prevención, inhibición, supresión, retraso o reducción de la incidencia de infección, una enfermedad, un trastorno, o una afección, cuando se aplica al armazón o kits de la presente invención. Un compuesto efector puede producir un efecto deseado que es exclusivo para la capacidad para formación de imágenes del compuesto. El compuesto efector puede ser útil para la formación de imágenes de un sitio en el que el compuesto está presente, sin embargo, una capacidad de ese tipo de secundaria para la finalidad o elección de uso del compuesto.

En el contexto de la presente invención, se debe entender que la expresión "compuesto efector" incluye los términos "fármaco" y "agente", también, cuando se hace referencia en el presente documento, y representa una molécula cuya incorporación dentro del armazón y/o kits de la presente invención, o cuyo uso de la misma, se desea. El agente se podía incorporar directamente dentro de un armazón, y/o kit de la presente invención. El agente Se puede incorporar dentro de un armazón y/o kit de la presente invención, ya sea por interacción física con un revestimiento polimérico, un coral, o partículas de coral y/o un kit de la presente invención, o asociación a los mismos.

Los compuestos para uso en un armazón y/o un kit de la presente invención pueden comprender, entre otros, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un péptido, un oligonucleótido, un ligando para una diana biológica, un inmunocnjugado, un grupo funcional quimiomimético, un glucolípido, un agente de marcado, una enzima, un quelato de ion metálico, un cofactor enzimático, un compuesto citotóxico, un compuesto bactericida, un compuesto

bacteriostático, un compuesto fungicida, un compuesto fungistático, un agente quimioterapéutico, un factor de crecimiento, una hormona, una citoquina, una toxina, un profármaco, un antimetabolito, un inhibidor de microtúbulos, Un material radiactivo, o un resto de direccionamiento, o cualquier combinación de los mismos.

5 En una realización, los armazones y/o kits de la presente invención comprender un oligonucleótido, un ácido nucleico, o un vector. En algunas realizaciones, el término "oligonucleótido" es intercambiable con el término "ácido nucleico", y puede hacer referencia a una molécula, que puede incluir, pero no se limita a, secuencias procariotas, ARNm eucariota, ADNc de ARNm eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN eucariota (por ejemplo, de mamífero), e incluso secuencias de ADN sintético. El término también se refiere a secuencias que incluyen
10 cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN.

Los armazones y/o kits de la presente invención puede comprender ácidos nucleicos, o los armazones y/o kits de la presente invención pueden proporcionar la administración de los mismos, como parte de un vector particular. Los segmentos de polinucleótidos que codifican secuencias de interés se pueden ligar en sistemas de vectores de expresión disponibles en el mercado adecuados para transducir/transformar células de mamíferos y para dirigir la
15 expresión de productos recombinantes dentro de las células transducidas. Se observará que los sistemas de vectores de ese tipo disponibles en el mercado se pueden modificar fácilmente mediante técnicas recombinantes usadas comúnmente con el fin de reemplazar, duplicar o mutar secuencias promotoras o potenciadoras existentes y/o para introducir cualquier secuencia de polinucleótidos adicional tal como por ejemplo, secuencias que codifican marcadores o secuencias de selección adicionales codifican polipéptidos indicadores.

El almacén de la presente invención puede incorporar células madre o progenitoras o precursoras. Las células de ese tipo se pueden obtener directamente de un donante mamífero, por ejemplo, las propias células de un paciente, de un cultivo de células de un donante, o de líneas de cultivo celular establecidas. El mamífero puede ser un ratón,
25 rata, conejo, cobaya, hámster, vaca, cerdo, caballo, cabra, oveja, perro, gato, mono, simio o un ser humano. Las células de la misma especie y/o del mismo perfil inmunológico se pueden obtener mediante biopsia, ya sea del paciente o de un familiar cercano. Usando técnicas y condiciones de cultivo celular convencionales, las células se hacen crecer a continuación en cultivo hasta que sean confluentes y se usan cuando sea necesario. Las células se pueden cultivar hasta que se haya obtenido un número suficiente de células para una aplicación particular.

30 En una realización, el almacén de la presente invención incorpora cualquier célula que pueda participar en la formación o reparación de cartílago y/o hueso. Las células de ese tipo pueden representar autoinjertos, en los que las células se cultivan *ex vivo* para sembrar las células en los armazones de la invención, y los armazones sembrados de ese tipo están listos para su implante en el sujeto.

35 Las células de ese tipo pueden representar aloinjertos o xenoinjertos, que se pueden incorporar dentro de los armazones de la presente invención e implantar dentro de un sitio de reparación.

Un coral puede comprender una población celular de cultivo *in vitro* del coral durante un periodo de tiempo suficiente como para sembrar las células en el coral. La población celular puede ser una población de células madre mesenquimales, condrocito; fibrocondrocito; osteocito; osteoblasto; osteoclasto; sinoviocito; célula de médula ósea; célula del estroma; célula madre; células madre embrionarias; célula precursora, obtenida a partir de tejido adiposo; célula precursora de sangre periférica; célula madre aislada de tejido adulto; célula transformada genéticamente; o una combinación de los mismos. Las células madre mesenquimales; condrocito; fibrocondrocito; osteocito; osteoblasto; osteoclasto; sinoviocito; célula de médula ósea; célula del estroma; célula madre; células madre embrionarias; célula precursora, obtenida a partir de tejido adiposo; célula precursora de sangre periférica; célula madre aislada de tejido adulto; célula transformada genéticamente; o una combinación de las mismas sembradas *in vitro* se pueden transformar. La población celular puede comprender una población celular beneficiosa para reparación de cartílago. El cultivo puede comprender un agente quelante. El agente quelante en un cultivo puede comprender un agente quelante de calcio.

También se desvela, pero no forma parte de la invención que se reivindica, un método que induce o aumenta la formación y/o reparación de cartílago y/o hueso, en el que el método comprende la implantación en un sujeto, de un almacén de la presente invención dentro de un sitio de formación y/o reparación de cartílago y/o hueso, en el que una región del almacén penetra a través de un hueso, dando como resultado que la región se inserte dentro de un hueco de la médula ósea, proximal al sitio de la formación y/o reparación de cartílago y/o hueso.

La expresión "reparación de cartílago" se refiere a restaurar un defecto de cartílago a un estado más saludable. La restauración del cartílago puede dar como resultado la regeneración del tejido del cartílago. La restauración del cartílago puede dar como resultado la regeneración de un defecto del cartílago articular de grosor total o parcial. La restauración del cartílago puede dar como resultado la regeneración completa o parcial del tejido del cartílago en un sitio de reparación de cartílago. La reparación del cartílago puede dar como resultado la restauración/reparación del tejido óseo faltante o defectuoso, en el que reparación de un defecto de cartílago necesita la retirada de tejido óseo en un sitio de reparación de cartílago. La restauración del cartílago puede dar como resultado la regeneración del defecto osteocondral. La reparación del cartílago puede comprender la restauración de defectos del cartílago de las articulaciones (por ejemplo, articulaciones de rodilla, codo, cadera, hombro), de orejas, de una nariz, o de una

tráquea.

5 La expresión "reparación de hueso" se refiere a restaurar un defecto de hueso a un estado más saludable. La restauración de hueso da como resultado la regeneración del tejido óseo. La restauración del hueso da como resultado el relleno de cualquier fractura o hueco dentro de un tejido óseo. La restauración de hueso da como resultado una regeneración completa o parcial del tejido óseo en un sitio de reparación de hueso. La reparación ósea puede da como resultado la restauración/reparación de tejido óseo faltante o defectuoso. La reparación ósea comprende la restauración de defectos de hueso de cualquier hueso, si fuera necesario.

10 La expresión "reparación de hueso" se refiere al tratamiento de un sujeto con osteoporosis, enfermedad de Paget, displasias fibrosas u osteodistrofias. El sujeto puede tener una enfermedad de hueso y/o cartílago. El sujeto puede tener otros trastornos de remodelación ósea que incluyen osteomalacia, raquitismo, artritis reumatoide, acondroplasia, osteocondritis, hiperparatiroidismo, osteogénesis imperfecta, hipofosfatasa congénita, lesiones fribromatosas, mieloma múltiple, pérdida ósea anómala, enfermedad osteolítica ósea, enfermedad periodontal, o una combinación de las mismas. Los trastornos de remodelación ósea incluyen enfermedades óseas metabólicas que se caracterizan por alteraciones en la matriz orgánica, mineralización del hueso, remodelación ósea, factores endocrinos, nutricionales y otros que regulan la homeostasis esquelética y mineral, o una combinación de los mismos. Los trastornos de este tipo pueden ser hereditarios o adquiridos y, en una realización, son sistémicos y afectan a todo el sistema esquelético.

20 Los armazones y kits de la invención también se pueden usar para mejorar la formación de hueso y/o cartílago en condiciones en las que un déficit de hueso y/o cartílago está causado por factores distintos a los trastornos de remodelación ósea. Dichos déficits óseos incluyen fracturas, traumatismos óseos, afecciones asociadas con cirugía de huesos postraumática, cirugía articular postprotésica, cirugía de hueso post plástica, quimioterapia de huesos, cirugía post dental y radioterapia de hueso. Las fracturas incluyen todo tipo de fracturas microscópicas y macroscópicas. Algunos ejemplos de fracturas incluyen fractura por avulsión, fractura conminuta, fractura transversa, fractura oblicua, fractura en espiral, fractura segmentaria, fractura desplazada, fractura impactada, fractura en caña verde, fractura en rodete, fractura por fatiga, fractura intraarticular (fractura epifisaria), fractura cerrada (fractura simple), fractura abierta (fractura compuesta) y fractura oculta. Las fracturas pueden ser fracturas sin unión.

30 Los armazones y kits de la invención también se pueden usar para aumentar la reparación de fracturas de huesos largos; generar hueso en defectos segmentarios; proporcionar un injerto de hueso sustituto de fracturas; facilitar la reconstrucción de tumores o fusión de la columna vertebral; proporcionar un tratamiento local (por inyección) para hueso débil u osteoporótico, tal como en la osteoporosis de cadera, vértebras, o muñeca, o una combinación de los mismos. Los armazones y kits de la invención también se pueden usar para acelerar la reparación de huesos largos fracturados; tratamiento de la unión retardada o no unida de fracturas de hueso largo o pseudoartrosis de fusiones de columna vertebral; inducir la formación de hueso nuevo en la necrosis avascular de la cadera o rodilla, o una combinación de los mismos.

40 Un método puede comprender la inducción o potenciación de la reparación de cartílago y/o hueso en el que la implantación de un armazón de la presente invención dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso influye y mejora la reparación de cartílago y/o hueso.

45 Un método puede inducir o potenciar la reparación de cartílago y/o hueso, en el que el armazón atrae a una población de células al armazón, influyendo o mejorando de ese modo la reparación de cartílago y/o hueso.

50 La arquitectura en 3-D y la composición química de un armazón de la presente invención son de gran importancia para la colocación y limitación de forma específica de un armazón dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso; para reconocimiento, adhesión, proliferación y diferenciación celular de poblaciones celulares que inducen o potencian la reparación de cartílago y/o hueso o una combinación de los mismos.

55 En una realización, un armazón de la presente invención comprende una población celular sembrada antes de su implante en un sujeto. Un método puede inducir o potenciar la reparación de cartílago y/o hueso, en el que la implantación en un sujeto un armazón de la presente invención estimula la adhesión, proliferación o diferenciación, o una combinación de las mismas de células madre mesenquimales transformadas. Un método puede inducir o potenciar la reparación de cartílago y/o hueso, en el que la implantación en un sujeto un armazón de la presente invención estimula la formación de vasos sanguíneos.

60 Un armazón puede comprender al menos una región que coloca y limita de forma específica el coral armazón a una profundidad y ángulo óptimos dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso, de modo que el implante del armazón en un sujeto induce o potencia la reparación de cartílago y/o hueso. Un armazón puede comprender al menos una región que colocada y limita de forma específica el coral a una profundidad y ángulo óptimos dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso, de modo que el implante del armazón maximiza el área de contacto entre un armazón de la presente invención sitio de reparación de cartílago y/o hueso.

65 Un armazón se puede usar para adsorber o unirse, y suministrar, otras sustancias terapéuticamente activas que

ayudan en el proceso de reparación o regeneración de cartílago y/o hueso, o que tienen otra actividad terapéutica deseada. Las sustancias de ese tipo incluyen, a modo de ejemplo, antibióticos sintéticos o semisintéticos conocidos que se pueden introducir en las cavidades del poro del producto o estructura conformados, o un factor de crecimiento tal como factor de crecimiento transformante o una de las proteínas morfogenéticas óseas que se pueden usar para ayudar o estimular el crecimiento del hueso.

Los armazones pueden comprender adicionalmente, o se pueden implantar con, otros compuestos tales como, por ejemplo, antioxidantes, factores de crecimiento, citoquinas, antibióticos, anti-inflamatorios, inmunosupresores, conservantes, medicación para el dolor, otros agentes terapéuticos, y agentes excipientes. En una realización, los ejemplos de factores de crecimiento que se pueden administrar además del inhibidor de la HMG-CoA reductasa incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor alfa de crecimiento transformante (TGF- α), factor beta de crecimiento transformante (TGF- β), factor de crecimiento de células endoteliales humanas (ECGF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), proteína morfogenética ósea (BMP), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de tipo insulínico (IGF), proteína morfogenética obtenida a partir de cartílago (CDMP), factor de crecimiento obtenido a partir de plaquetas (PDGF), o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de antibióticos incluyen agentes antimicrobianos y antibacterianos.

También se desvela, pero no forma parte de la invención que se reivindica, un método que comprende la implantación de un armazón de la presente invención en un sujeto afectado con un defecto o trastorno o enfermedad de cartílago y/o hueso.

El término "implante" se refiere a la inserción y fijación de un armazón de la presente invención en un sitio vivo en un sujeto, el sitio comprendiendo un sitio de reparación de cartílago y/o hueso. Un método puede implantar un armazón de modo que una región del armazón ahora tiene acceso a células madre mesenquimales, nutrientes, vasos sanguíneos, o compuestos efectores, o cualquier combinación de los mismos. Un método de ese tipo puede comprender la implantación en un sujeto de un armazón de la presente invención, en el que el método da como resultado la retirada de una región de cartílago y/o hueso y/u otro tejido de modo que una región del armazón penetra a través del cartílago y/o hueso y/u otro tejido, y ocasionalmente alcanza un hueco de la médula ósea.

Un experto médico en la materia reconocerá que los métodos de ese tipo, que conllevan la implantación de un armazón dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso, pueden requerir la preparación de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso. Estas preparaciones se pueden producir antes del implante de un armazón o de forma simultánea con el implante. Por ejemplo, inicialmente el cartílago y/o tejido óseo y/u otros tejidos proximales a un sitio de reparación de cartílago y/o hueso se pueden perforar a través de los mismos para crear un canal de dimensiones apropiadas para un armazón usaron los métodos de la presente invención. A continuación el armazón se implanta dentro del sitio de modo que una región del armazón penetra los tejidos de cartílago y/o y óseo perforados. Como alternativa, el armazón se puede unir a una herramienta de la presente invención capaz de penetrar a través de cartílago y/o hueso u otros tejidos, o una combinación de los mismos. En este caso, a medida que la herramienta penetra a través del cartílago y/o tejido óseo, el armazón unido se implanta de forma simultánea.

Después del implante del armazón dentro de un sitio de reparación, o varios armazones dentro del sitio de reparación, el armazón se puede procesar para optimizar la incorporación y la reparación óptima del cartílago y/o del hueso. Un procesamiento de ese tipo puede comprender cortar, erosionar o de otro modo alisar la superficie del armazón o armazones, para una reparación óptima.

Los métodos de ese tipo pueden comprender el implante de un armazón en un sujeto humano.

Los métodos de ese tipo pueden implicar la colocación de un armazón sobre una superficie en el sitio de reparación de cartílago y/o hueso. Los métodos de este tipo pueden implicar componentes de un medio tisular en un sitio de reparación de coral que emigra a una superficie expuesta de un coral y por lo tanto el contacto entre el coral de la presente invención se podría realizar con el entorno.

Los métodos de ese tipo pueden implicar la implantación de un armazón de modo que las superficies expuestas elevadas del armazón entran en contacto de forma forzosa con el tejido en o adyacente a un sitio de reparación de cartílago y/o hueso. De este modo, la superficie expuesta de coral que ahora es proximal a un sitio de reparación de cartílago y/o hueso es proximal a un entorno que comprende tejido de cartílago, tejido óseo, tejido de médula ósea, células madre mesenquimales, nutrientes, vasos sanguíneos u otros compuestos efectores, o una combinación de los mismos, que pueden ser beneficiosos para la reparación de cartílago y/o hueso.

En el contexto de la presente invención, las expresiones "eje largo del armazón" y "eje longitudinal del armazón" se usan indistintamente y hacen referencia a una línea que se extiende paralela a la línea longitudinal del armazón. El término "longitudinal" se requiera la dirección de la longitud de un armazón. Puede suceder que una forma geométrica original se haya cortado para producir una sección horizontal del armazón original. En los casos de este tipo el concepto longitudinal se debería visualizar como la dirección original de la longitud a lo largo de un armazón.

Para un experto en la materia será evidente que las propiedades físicas y/o químicas de un armazón de la presente invención y componentes del mismo pueden influir en los métodos de uso y kits del mismo, para inducir o potenciar la reparación de cartílago y/o hueso.

5 Los métodos de ese tipo para inducir o potenciar la reparación de cartílago y/o hueso pueden usar la geometría en 3-D de un armazón de la presente invención para proporcionar una colocación y limitación de forma específica del armazón dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso.

10 El término "proximal" se refiere a algo que se va a situar cerca de un sitio en particular. Un armazón de la presente invención se puede mantener de manera forzada en su posición dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso mediante una elevación de la región del armazón que está en contacto con el tejido situado en o proximal a un sitio de reparación de cartílago y/o hueso.

15 Un experto en la materia reconocerá que la forma de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso y la forma de un armazón en 3-D de la presente invención proporcionan muchas combinaciones diferentes para colocar de manera estable un armazón dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso. A un armazón de la presente invención se le puede dar forma antes de su uso para reparación de cartílago y/o hueso. A un armazón de la presente invención se le puede dar forma simultáneamente a su uso en métodos de la presente invención para reparación de cartílago y/o hueso. Al dar forma a un armazón simultáneamente con el uso del armazón, las dimensiones del armazón se pueden seleccionar de forma precisa para una colocación específica del armazón dentro de un sitio de reparación.

20 Los métodos de ese tipo comprenden la implantación de un armazón en un sujeto mamífero no humano y no mamífero. Los métodos de ese tipo pueden comprender la implantación de un armazón en un caballo, un caballo de carreras, una vaca, un novillo, un cerdo, un conejo, una cabra, una oveja, un animal de granja, una mascota, un perro, un gato, un mono, un simio, un pájaro y un ave.

30 Los métodos de ese tipo se pueden usar para inducir o mejorar la reparación de un defecto o trastorno o enfermedad de un cartílago y/o hueso. El defecto del cartílago puede resultar de un traumatismo, un desgarro, una lesión deportiva, un defecto del cartílago articular de grosor completo, un defecto de articulación, o una lesión por estrés repetitivo (por ejemplo, fractura osteocondral, daño secundario debido a una lesión del ligamento cruzado). El trastorno del cartílago puede comprender una enfermedad del cartílago. Los métodos de ese tipo pueden inducir o mejorar la reparación del cartílago en osteoartritis, artritis reumatoide, necrosis aséptica, osteocondritis disecante, lesiones del cartílago articular, condromalacia rotuliana, condrosarcoma, por condrosarcoma - cabeza y cuello, costocondritis, encondroma, hallux rigidus, desgarro del labrum de la cadera, osteocondritis disecante, menisco desgarrado, poliquondritis recidivante, artritis canina, defecto del cuarto arco branquial u oreja de coliflor. Los métodos de ese tipo pueden inducir o potenciar la reparación de cartílago en trastornos cartilaginosos degenerativos que comprenden trastornos caracterizados, al menos en parte, por degeneración o trastorno metabólico de tejidos conectivos del cuerpo, que incluyen no solo las articulaciones o estructuras relacionadas, incluidos los músculos, bolsa (membrana sinovial), tendones y tejido fibroso, pero también la placa de crecimiento, el sistema meniscal y los discos intervertebrales.

45 Un defecto o trastorno o enfermedad de cartílago y/o hueso reparado mediante el uso de un armazón y/o al menos una herramienta de la presente invención, puede comprender una articulación de un sujeto (por ejemplo, una articulación de rodilla, codo, tobillo, hombro o cadera), una manguito de los rotadores, una oreja, una nariz, una tráquea, una pelvis, una columna vertebral, una costilla, una mandíbula, un cráneo o cualquier otro sitio de defecto o trastorno o enfermedad de cartílago y/o hueso que se encuentre dentro del sujeto.

50 La forma 3-D y la composición química de un armazón de la presente invención, serán determinadas por médicos con experiencia, basándose en factores tales como la naturaleza exacta de la afección que se está tratando, la gravedad de la afección, la edad y la condición física general del sujeto, peso corporal y respuesta del sujeto individual, etc.

55 La colocación específica de un armazón de la presente invención será determinada por expertos clínicos, basándose en factores tales como la naturaleza exacta de la afección que se está tratando, la gravedad de la afección, la edad y el estado físico general del sujeto, el peso corporal y la respuesta del sujeto individual, etc.

60 Los métodos de ese tipo se pueden evaluar examinando el sitio de la reparación del tejido de cartílago y/u óseo, en el que la evaluación se realiza mediante histología, histoquímica, palpación, biopsia, endoscopia, artroscopia, o técnicas de formación de imágenes que comprenden fotografías de rayos X, densitometría de rayos X computarizada, densitometría de fluorescencia computarizada, CT, MRI u otro método conocido en la técnica, o cualquier combinación de los mismos.

65 También se desvela, pero no forma parte de la invención que se reivindica, un instrumento para ayudar en la reparación de cartílago y/o hueso que comprende una herramienta para guiar un armazón de la presente invención a un ángulo óptimo en un sitio de reparación de cartílago y/o hueso, una herramienta para guiar un armazón de la

presente invención a un ángulo óptimo en un sitio de reparación de cartílago y/o hueso, una herramienta para suministrar un armazón de la presente invención a un sitio de reparación de cartílago y/o hueso, una herramienta para insertar un armazón de la presente invención en un sitio de reparación de cartílago y/o hueso de modo que el armazón penetra a través de un cartílago y/o hueso, y se inserta dentro de un hueco de médula ósea, proximal a dicho sitio de reparación de cartílago y/o hueso, una herramienta para liberar un armazón de la presente invención en un sitio de reparación de cartílago y/o hueso, o una herramienta capaz de proporcionar una combinación de los mismos, de modo que la herramienta se puede separar del armazón después de la colocación del armazón dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso.

10 El instrumento puede comprender al menos una sola herramienta.

Los métodos pueden usar este instrumento, en los que la implantación de un armazón de la presente invención comprende de forma específica la colocación y limitación del coral a una profundidad y ángulo óptimos dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso.

15 Las herramientas de este tipo pueden comprender una herramienta para la inserción de un armazón en un sitio de reparación, herramienta que se diseña de forma específica para que mantenga el armazón y coloque a este de forma óptima dentro del sitio. Múltiples herramientas para armazones de diferentes tamaños y formas se pueden incorporar dentro de kits de la invención, para alojar el implante de armazones variables dentro de un sitio o sitios de reparación de cartílago y/o hueso. Los kits de la presente invención comprenden una herramienta para procesar el armazón después de la inserción dentro del sitio de reparación, para afectar a una superficie óptima para reparación de cartílago y/o hueso óptima. En algunas realizaciones, los kits de la presente invención pueden comprender adicionalmente una herramienta para crear un hueco entre el sitio de reparación y una fuente de células madre mesenquimales. En algunas realizaciones, los kits puede comprender una pieza, que se inserta dentro de una herramienta común para realizar un hueco de ese tipo, por ejemplo, en los kits se incluye una broca de un tamaño y profundidad para perforar de forma fácil y adecuada a través del hueso cercano para que el armazón se pueda insertar en un sitio de reparación de cartílago y/o hueso, en el que al menos una parte del armazón, o armazón contiguo se inserta dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso y alcanza la médula ósea subyacente, para servir como fuente para la migración de células madre mesenquimales para realizar la reparación de cartílago y/o hueso.

20 Un experto en la materia reconocerá que el camino creado al perforar a través del tejido para alcanzar un hueco de médula ósea es tal que permite que un armazón de la presente invención alcance el hueco de la médula ósea y se pueda implantar de manera estable en este sitio. El armazón se debe asegurar suficientemente dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso de modo que no se desplace a medida que se articula una articulación. Un experto clínico con experiencia en la materia también reconocerá que el alcance de un camino perforado es tal que un armazón se mantiene firmemente, pero el camino no es tan amplio como para incurrir en un aumento del daño al tejido circundante

25 La preparación de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso también puede implicar la eliminación de cartílago o tejido óseo dañados, o una combinación de los mismos. Por lo tanto, una herramienta puede perforar un camino de modo que se retira el tejido dañado en el sitio de reparación o proximal a un sitio de reparación.

30 Una herramienta puede preparar el camino que seguirá un armazón, puede guiar el armazón que se está implantando, y puede implantar el armazón de forma simultánea. Al preparar de forma simultánea el sitio y la implantación del armazón, el tiempo de la cirugía invasiva o mínimamente invasiva a la que se somete un sujeto se puede reducir.

35 Una región del armazón se puede separar de la herramienta después de la colocación del armazón dentro del sitio de reparación de cartílago. La región se puede separar de la herramienta, en la que la separación de la herramienta del armazón comprende la separación activada por luz UV, separación activada por LÁSER, separación dependiente de la torsión o separación activada químicamente o una combinación de las mismas. La separación de la herramienta del armazón deja atrás al armazón específicamente colocado dentro de un sitio de reparación. El mecanismo de separación tampoco debería causar un traumatismo adicional a un sitio de reparación.

40 La separación de la herramienta del armazón puede dar como resultado que el armazón se coloque y se limite de forma específica a una profundidad y ángulo óptimos dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso. La separación de la herramienta del armazón da como resultado que el armazón se implante en un sujeto dentro de un sitio de reparación de cartílago y/o hueso, en el que una región del armazón penetra a través del cartílago y/o hueso, da como resultado que la región se inserte dentro de una médula ósea hueco, proximal al sitio de reparación de cartílago y/o hueso.

45 Un experto en la materia reconocerá que la elección de un kit por un experto clínico podría depender de factores tales como la naturaleza exacta de la afección que se está tratando, la gravedad de la afección, la didáctica condición física general del sujeto, peso corporal, el espesor del sujeto individual.

5 Por lo tanto, en una realización, el armazón comprendido en un kit de la presente invención comprende diferentes tamaños, formas o composiciones químicas, o una combinación de los mismos. En una realización, la presente invención proporciona un kit para la reparación de cartílago y/o hueso que comprende un armazón de la presente invención, al menos una herramienta como se describe en el presente documento, y directrices para usar el armazón para la reparación de cartílago.

10 Para las personas con experiencia en la materia será evidente que en los armazones, kits, procesos y métodos de la presente invención se pueden realizar diversas modificaciones y variaciones sin apartarse del espíritu o alcance de la invención.

15 En el contexto de la presente invención, el término "comprender" o formas gramaticales del mismo, se refiere a la inclusión de los componentes indicados de la presente invención, así como a la inclusión de otros agentes activos, y vehículos, excipientes, emolientes, estabilizantes, farmacéuticamente aceptables, etc., que son como se sabe en la industria farmacéutica.

20 En el contexto de la presente invención, la expresión "una preparación combinada" define especialmente un "kit de partes" en el sentido de que los componentes de combinación como se ha definido anteriormente se pueden usar independientemente o en diferentes combinaciones, es decir, de forma simultánea, de forma concurrente, por separado o de forma secuencial.

Ejemplos

Ejemplo 1

25 **Aplicaciones de Armazón de Base Coralina de la presente Invención**

El armazón de base coralina de la presente invención se puede insertar en cartílago, hueso o una combinación de los mismos, en un sujeto con necesidad del mismo.

30 La colocación de ese tipo incluirá la perforación en el área para exponer el sitio en el que se desea el implante, y un ajuste estrecho del armazón dentro del defecto/sitio.

35 Para implante para la reparación, regeneración de cartílago, etc., los armazones se implantan en el sitio del cartílago deseado, y dentro del hueso localizado de forma proximal, de modo que, de esta forma, el armazón de coral se injerta a través de dos tipos de tejido, cartílago y hueso. La Figura 1 representa de forma esquemática la orientación de un boceto de un armazón de la presente invención dentro de un sitio de reparación de cartílago/hueso.

40 Los armazones se pueden preparar como se describe en el presente documento, como observará el experto en la materia.

Los armazones se conciben para su uso en aplicaciones veterinarias, así como en el tratamiento de sujetos humanos. Se debe observar que se pueden realizar estudios en animales para determinar las configuraciones y los parámetros y procedimientos del implante óptimos.

45 Por ejemplo, los estudios en animales pueden incluir el implante de un armazón como se describe en el presente documento dentro de un sujeto animal y los armazones se examinan y se observan durante un periodo de tiempo prolongado, después de la cirugía. La rodilla sin tratar de cada animal se usa como un control para comparaciones después de las cirugías de ese tipo. A intervalos de tiempo apropiados, los animales se sacrifican y se realiza la histología. Los periodos de tiempo apropiados para examinar el sitio de reparación de cartílago son 2,5, 4, 9, 12, 26,
50 52 semanas después de la cirugía. En este momento, las superficies articulares se fotografían y el tejido se retira del sitio de reparación y se prepara para observaciones histológicas. De forma específica, un bloque que consiste en la zona injertada y el tejido circundante se retira usando una sierra fina. El material se procesa adicionalmente para histología de rutina, que incluye descalcificación lenta.

55 **Ejemplo 2**

Restauración de un Defecto Osteocondral

60 La restauración de un defecto osteocondral se realizó en cabras maduras usando implantes redondeados que tenían un diámetro de 6 mm y una longitud de 8 mm. Un núcleo de 5,5 x 8 mm de cartílago y tejido óseo se perforó en el cóndilo femoral medial de cada cabra (Figura 2A) y el implante se ajustó por presión en el sitio de reparación de cartílago y hueso (Figuras 2B y 2C).

65 Algunos animales recogidos a las 2,5 semanas después de la cirugía presentaban signos de que el implante estaba bien incorporado en el tejido nativo y el tejido de cartílago se desarrolló proximal al implante, además se pueden observar signos de vascularización (Figura 2C).

Un grupo de animales se sacrificaron y el tejido se recogió del sitio del implante 9 semanas después de la cirugía. La evaluación histológica con tinción con H y E y Tricromo de Masson del tejido (Figuras 3A y 3B, respectivamente) mostró que la zona del implante estaba sustituida con cartílago recién formado hueso tejido y el cartílago era liso y estaba casi completamente regenerado. La tinción con Safranina O y sondeo para expresión de Colágeno de tipo II desveló la existencia de una banda de cartílago de color rojo homogénea cubría el hueso normal (Figura 4A), y deposición de colágeno de tipo II a lo largo de la banda de cartílago (Figura 4B). El cartílago regenerado era prácticamente indistinguible del cartílago normal adyacente. La superficie de reparación era lisa sin evidencias de fibrilación. Además, había evidencia de cierre completo del defecto al nivel del cartílago articular y evidencia de transformación de células mesenquimales en condrocitos y osteoblastos con formación y remodelación (con osteoclastos) de hueso subcondral nuevo. La Figura 5 A y la Figura 5B muestran una tinción con H y E de secciones similares que muestran cartílago regenerado.

Ejemplo 3

15 Preparación de un Armazón de Aragonito Sólido de Múltiples Fases

Para crear un armazón de múltiples fases variable en términos del volumen de poro (porosidad) de cada fase, y/o variable en términos del diámetro de los huecos presentes en cada fase, se colocaron tapones de 5,2 mm de diámetro y 7,5 mm de longitud dentro de un soporte de silicona de modo que solamente se expuso la parte superior de 1 mm del tapón, y el soporte con el tapón se puso en una posición invertida, y se sumergió en la mezcla de reacción, de modo que solamente la parte superior de 1 mm del tapón estará en contacto directo con la mezcla.

En primer lugar el tapón se sumergió en una solución de sal disódica al 5 % durante dos horas a temperatura ambiente, seguido de la adición de una solución de ácido fórmico al 99 % para producir una concentración final de un 0,5 %, en la que los tapones se sumergieron de nuevo en la solución durante un periodo adicional de 20 minutos. La mezcla se descartó hoy los tapones se lavaron en agua destilada durante una noche, en condiciones de presión de aproximadamente 0,02 MPa a 1 Pa (0,2-0,00001 bares) mediante la aplicación de un vacío después de la colocación del tapón en un recipiente cerrado herméticamente y aplicando el vacío a la cámara. Los tapones se secaron a vacío durante una noche a temperatura ambiente.

La Figura 6A representa un soporte que expone una parte de un tapón para inmersión como se describe en el presente documento.

La Tabla 1 representa los resultados de la inmersión de 15 tapones aislados de diferentes regiones de la misma pieza de coral (*Porites Lutea*) procesados como se describe en este ejemplo. Una sierra de diamante se usó para retirar trozos de pases individuales y dos trozos se procesaron para análisis de microscopía de luz y se usó un microscopio bifocal óptico para formar imágenes del armazón; y las imágenes se capturaron y los diámetros del hueco se evaluaron para tamaño mediante metodología convencional.

Se identificaron 30 huecos en tres implantes diferentes, dentro de la región del tapón sumergido dentro de la mezcla de reacción, se identificaron 41 huecos en cuatro implantes diferentes dentro de la región situada proximalmente a la región de inmersión y se identificaron 46 huecos en cuatro implantes diferentes dentro de la región situada distalmente a la región de inmersión y se determinó el diámetro de cada hueco. El resultado de estas determinaciones se presenta en la Tabla 1 que sigue a continuación en el presente documento:

Tabla 1:

	Región del implante sumergida	Región proximal	Región distal
Media	700	200	110
Desv. Estd.	50,2	69,8	39,9

Las Figuras 6B y 6C representan imágenes de microscopía de luz del corte de la parte superior (panel B) desde el tapón (panel C) y visualizadas a mayor aumento en el que se puede discernir el tamaño de los huecos.

En términos de volumen de poro (porosidad), la parte sumergida presentaba aproximadamente un 85-90 % del tapón que era porosa, la región proximal a ésta (que tiene una longitud de aproximadamente 0,5-1 mm a lo largo de un eje longitudinal, situada proximalmente a la región sumergida) presentando aproximadamente un 65-75 % de porosidad, mientras que la región distal presentaba aproximadamente un 45-50 % de porosidad.

La porosidad se obtuvo, como se describe (Karageorgiou V, Kaplan D. (2005) "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis" Biomaterials.; 26 (27): 5474-91).

El nivel de porosidad se puede controlar con parámetros tales como el tipo y concentración del agente quelante usado, el tipo y concentración del ácido usado, la temperatura a la que se realiza el método y el tiempo de reacción, mientras que el tamaño de toda la fase porosa agrandada se puede controlar mediante la longitud del tapón que se coloca en contacto directo con la mezcla de reacción.

5 El control de la porosidad y del tamaño de las diferentes fases permitirá el diseño de implantes para diferentes fines que presentan diferentes resistencias, características físicas y estructurales que tienen el potencial de imitar diferentes estructuras de huesos y cartílagos nativos. Este control proporcionará un ajuste mayor del implante en la posición deseada exacta del implante tal como se requiere a partir de cada defecto específico de cartílago/hueso o solo de hueso.

Ejemplo 4

Los Armazones de Aragonito Impregnados con Ácido Hialurónico son más Condrogénicos que los Armazones a Base de Aragonito

15 Para evaluar el potencial condrogénico de la fase condral de un implante, los armazones a base de aragonito se compararon con aragonito impregnado con armazones de ácido hialurónico. Se realizaron ensayos *in vitro* usando las células madre mesenquimales de murino (MSC) de referencia ATCC/CRL-12424 y se evaluó su diferenciación hacia un linaje condrogénico. Se sembraron 5000 MSC en 1 mg de partículas pequeñas (con un tamaño de ~ 1 mm) de aragonito de base coralina (sp. *Porites Lutea*) con o sin ácido hialurónico (NaHA al 1 %). Un tercer grupo sin ningún implante sirvió de control. Los métodos de preparación del armazón se describieron en el presente documento. El ácido hialurónico (HA) usado fue un gel inyectable de hialuronato de sodio al 1 % comercializado como Arthrease, fabricado por Bio-Technology General (Israel) LTD.

20 Cada partícula se cultivó individualmente y se sembró por separado. Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado, sin la adición de ningún agente condrogénico inductor. El medio se reemplazó cada 2-3 días durante un periodo de 21 días. Se tuvo cuidado durante el reemplazo de los medios para no perturbar las partículas en los cultivos. El ensayo se realizó en tres triplicados.

25 Después de una, dos y tres semanas de cultivo, se sometió a ensayo la diferenciación de las MSC mediante la tinción del cultivo con tinción de Safranina O/Verde Rápido [Kahveci Z, Minbay FZ, Cavusoglu L (2000) Safranin O staining using a microwave oven. Biotech Histochem. 75 (6): 264-8] de las células fijadas con una solución de un glutaraldehído al 4 %. Las imágenes digitales de las células teñidas se procesaron.

30 La Figura 7 muestra la tinción con Verde Rápido del citoplasma de todas las células en un color verde brillante, mientras que la tinción con Safranina O de los glicosaminoglicanos (GAG) secretada por condrocitos en la matriz extracelular de las células es evidente por un color rosa característico.

35 Las imágenes se analizaron usando el software ImageJ. La intensidad del color se usó para calcular la condrogénesis. Cada imagen se analizó para el área de las células teñidas con Safranina O (8A) y su densidad integrada (8B) de color rosa se calculó haciendo el recuento del número de píxeles de color rosa en un área específica de la imagen, excluyendo el área de las partículas del cálculo.

40 Durante todo el estudio el aragonito impregnado con ácido hialurónico mostró una mayor condrogénesis en comparación con el aragonito solo en términos tanto del área teñida (cantidad de células) como la intensidad de color (cantidad de GAG en la ECM).

45 El ensayo de control incluía el ensayo de células cultivadas de forma idéntica, en ausencia de cualquier armazón, que mostró que era característicamente menos significativo hacia la tinción de GAG.

50 La morfología de las células se visualizó usando Microscopía Electrónica de Barrido de emisión (JEOL, JSM-7400F). Las MSC sembradas sobre el aragonito con ácido hialurónico presentaban una morfología redonda y desarrollaron una matriz extracelular densa, que es habitual para condrocitos maduros (Figuras 9C-D). Por el contrario, las MSC, cultivadas sobre aragonito sin HA, mostraban una morfología similar a fibroblastos, aplanados (Figuras 9A-B).

55 Por lo tanto el complejo de aragonito-HA permitió de este modo una adherencia, proliferación y diferenciación de las MSC hacia un fenotipo condrogénico.

60 En el presente documento se demostró que el potencial condrogénico del aragonito impregnado con ácido hialurónico proporcionaba una condrogénesis superior, apoyando de ese modo no alcance de la invención dirigida al implante abi-fásico en el que la fase condral está formada por aragonito con orificios/huecos que se impregnan con un polímero biocompatible tal como ácido hialurónico, y una fase ósea que está formada por aragonito o calcita solo.

65

Ejemplo 5**Los Armazones a Base de Aragonito y Calcita son Condrogénicos *In Vivo***

5 El implante se puede realizar en cualquier lugar adecuado, por ejemplo, para la reparación de la articulación de la rodilla, el implante puede estar dentro del Cóndilo Femoral Medial (MFC), Cóndilo Femoral Lateral (LFC), Rótula, Surco Troclear (TG) y la Tibia.

10 Se pueden usar sistemas de modelos con ovejas, cabras o caballos para someter a ensayo ciertos armazones realizados de la presente invención. En la ubicación del implante elegida, por ejemplo, en el área de carga del MFC, se realiza un defecto usando un punzón. Las dimensiones del defecto se miden, por ejemplo, 5-10 mm y 6-12 mm de diámetro y profundidad respectivamente.

15 El diámetro del implante será apropiado para el diámetro del defecto osteocondral que se está sometiendo a ensayo. Por ejemplo, un diámetro elegido de un implante puede ser de 6 mm, incluso mejor de 5,8 mm de diámetro del defecto con el fin de asegurar una buena fijación al defecto en una forma de ajuste a presión. Se puede elegir una segunda ubicación en un lugar sin soporte de peso, para comparación, por ejemplo dentro del TG.

20 Para tratar lesiones de cartílago grandes, se pueden introducir varios implantes, con formas geométricas y propiedades iguales o diferentes, para rellenar el defecto. El implante se puede realizar por vía artroscópica o mediante una incisión abierta (artrotomía).

Se puede realizar formación de imágenes por rayos X, CT o MRI para verificar la posición de los implantes.

Ejemplo 6**Preparación de un Armazón de Aragonito Bi-Fásico que Comprende Ácido Hialurónico en la Fase Condral y Canales de Vascularización en la Fase Ósea, para Envasado y Distribución**

30 Preparación del armazón de núcleo de aragonito: se recoge coral del hidrocoral *Porites lutea* que tiene un tamaño de poro medio de 100-150 μm , se evalúa visualmente para su aspecto, densidad, porosidad y se somete a análisis de FTIR. También se puede determinar la cuantificación de aminoácidos. A continuación el coral se sumerge en hipoclorito sódico al 5 % para retirar el tejido orgánico externo.

35 Sin desea quedar ligado a la teoría, un medio mediante el cual con este método se produce un armazón superior es un resultado de la profundidad de penetración dentro del coral, mientras que los procesos de inmersión o aplicación de presión positiva durante la purificación permite que las burbujas de aire permanezcan atrapadas dentro de la red de poros del armazón, dando como resultado una escasa accesibilidad de los disolventes a compartimentos internos del coral. Además el proceso de purificación facilita la retirada de los agentes oxidantes usados de una manera más minuciosa, un resultado claramente deseable para armazones que se implantarán posteriormente en seres vivos.

40 Para retirar la capa de coral más externa, se usa una sierra, por ejemplo, una sierra de disco de diamante, y los tapones de las dimensiones deseadas se cortan a partir de un bloque de coral más grande. A continuación se perfora una serie de agujeros a través de parte de los tapones, que comprende la segunda fase, fase que se pretende implantar dentro de un sitio con necesidad de reparación o regeneración de hueso, o anclaje dentro de un hueso, para reemplazo opcional con tejido óseo, obtenido hasta una profundidad deseada y con un patrón/número deseado, etc. Véase por ejemplo, la figura 10.

45 La materia orgánica se retira del coral como sigue a continuación: en primer lugar los tapones se exponen a un fluido que contiene un agente oxidante bajo presión negativa, por ejemplo, una solución de hipoclorito sódico al 5 % durante 30 minutos, 3 intercambios a intervalos de temperatura TA a 50 °C, y presión subatmosférica usando presión de vacío que varía de 0,02 MPa a 1 Pa (0,2-0,00001 bares). A continuación los tapones se exponen a una solución de peróxido de hidrógeno al 10 % durante 15 minutos a intervalos de temperatura TA a 50 °C, y presión subatmosférica usando presión de vacío que varía de 0,02 MPa a 1 Pa (0,2-0,00001 bares).

50 El coral se esteriliza mediante exposición a radiación gamma a una potencia de al menos 22,5 kGy y a continuación se pueden almacenar de forma aséptica, en material de envasado.

55 Al tapón se le aplica una solución de hialuronato de sodio al 1 % (solución de ácido hialurónico al 1 % en solución salina tamponada con fosfato, que se ha descrito anteriormente en el presente documento). Una parte apical del tapón se limita con un anillo, por ejemplo un anillo de silicona, que se extiende una región por encima del extremo del tapón creando un depósito en el extremo del tapón. A continuación la solución de ácido hialurónico se aplica a la primera fase, es decir la fase que se inserta/implanta dentro del cartílago, por ejemplo, 70 ml de la solución se aplican sobre un tapón de 6 mm de diámetro para producir una fase homogénea de 2 mm de coral que impregna el

ácido hialurónico para tratar el defecto condral, que se inmoviliza en un anillo de silicona que se extiende al extremo del tapón y 4 mm por encima del extremo. La aplicación de la solución de ácido hialurónico avanza durante 45-60 minutos, y el anillo a continuación se retira, el tapón se inserta en un envase estéril y se cierra prácticamente. A continuación en envase cerrado herméticamente se somete a evaporación en condiciones de vacío para secar la solución de NaHA al 1 % para formar un revestimiento de HA seco de la fase condral del tapón (por ejemplo, mediante liofilización/desecado). De ese modo se obtiene un paquete estéril que contiene el producto seco.

La Figura 11 representa de forma esquemática un almacén realizado de la invención, en el que se prepara una primera fase **11-10** que comprende ácido hialurónico como se describe en el presente documento. Esta primera fase se muestra por encima de una segunda fase **11-20** que consiste solamente en aragonito, fase que se ha modificado físicamente para comprender una serie de canales de vascularización **11-30**. Al extremo de la segunda fase se le pueden dar golpecitos **11-40** para permitir un ajuste estrecho del almacén en cuestión.

En el contexto de la presente invención, "aproximadamente" puede hacer referencia a una cualidad en la que se satisface el medio para satisfacer una necesidad específica, por ejemplo, el tamaño puede ser en gran medida pero no completamente el que se especifica pero satisface la necesidad específica de reparación de cartílago en un sitio de reparación de cartílago. "Aproximadamente" puede hacer referencia a que es cercano o aproximado, pero no exactamente. Está presente un pequeño margen de error. Este margen de error podría no superar más o menos el mismo valor entero. Por ejemplo, aproximadamente 0,1 micrómetros podría significar no inferior a 0 pero no superior a 0,2. El término "aproximadamente" con respecto a un valor de referencia puede incluir una desviación de la cantidad no superior a un 5 %, no superior a un 10 % o no superior a un 20 % ya sea por encima o por debajo del valor indicado.

REIVINDICACIONES

1. Un almacén de reparación tisular, dicho almacén consistiendo en dos fases en el que:
 - 5 • una primera fase de dichas dos fases comprende coral sólido, que comprende un polímero biocompatible; y
 - una segunda fase de dichas dos fases comprende coral sólido y dicha segunda fase comprende adicionalmente una serie de huecos a lo largo de un eje longitudinal en dicha segunda fase, que es adecuada para aumentar la vascularización o facilitar el reclutamiento de células precursoras, o una combinación de los mismos.
- 10 2. El almacén de la reivindicación 1, en el que la primera fase de dicho almacén comprende un polímero biocompatible que comprende un glicosaminoglicano, quitosano, quitosano reticulado, alginato, alginato de calcio, alginato de calcio reticulado, colágeno, elastina, seda y cualquier combinación de los mismos.
- 15 3. El almacén de la reivindicación 2, en el que dicho glicosaminoglicano es ácido hialurónico, opcionalmente hialuronato de sodio o ácido hialurónico reticulado.
4. El almacén de la reivindicación 1, en la que el almacén mencionado comprende adicionalmente un compuesto anti-inflamatorio, un compuesto anti-infeccioso, un factor de crecimiento, un agente quelante, un antibiótico, una población celular, un factor pro-angiogénico o una combinación de los mismos.
- 20 5. El almacén de la reivindicación 4, en el que dicho factor de crecimiento es factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor beta de crecimiento transformante (TGF-β), factor de crecimiento de células endoteliales humanas (ECGF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), proteína morfogenética ósea (BMP), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de tipo insulínico (IGF), proteína morfogenética obtenida a partir de cartílago (CDMP), factor de crecimiento obtenido a partir de plaquetas (PDGF), o una combinación de los mismos.
- 25 6. El almacén de la reivindicación 1, en el que dicho almacén se siembra con una población celular, población que comprende células madre mesenquimales, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, condroblastos, condrocitos, fibroblastos, o una combinación de los mismos.
- 30 7. El almacén de la reivindicación 1, en el que dicho polímero biocompatible se incorpora dentro de al menos una parte de dicho almacén.
- 35 8. El almacén de la reivindicación 1, en el que dicho almacén tiene la forma aproximada de un cilindro, cono, taco, tornillo, barra rectangular, placa, disco, pirámide, gránulo, bola o cubo.
9. El almacén de la reivindicación 1, en la que el almacén adopta una forma aproximada a la de un menisco para una rodilla o codo; una articulación; una superficie articular de un hueso, una parte de una cavidad torácica, una cadera, una pelvis, una oreja, una nariz, un ligamento, un tubo bronquial o un disco intervertebral.
- 40 10. El almacén de la reivindicación 1, en la que dicho almacén tiene una forma cilíndrica y tiene un diámetro de aproximadamente 5-40 mm, y una altura de aproximadamente 5-25 mm.
- 45 11. El almacén de la reivindicación 1, en el que dicha primera o dicha segunda fase comprende adicionalmente un revestimiento polimérico.
12. El almacén de la reivindicación 11, en el que dicho revestimiento polimérico, forma una capa de polímero asociada con una parte de dicho almacén.
- 50 13. El almacén de la reivindicación 12, en el que dicho revestimiento polimérico está presente en un extremo de dicho almacén y dicho revestimiento tiene un grosor entre aproximadamente 0,1-10 mm.
- 55 14. Almacén de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho almacén es adecuado para aplicación a tejido óseo y de cartílago en una aplicación en un método para inducir o mejorar la reparación, regeneración o potenciación de la formación de cartílago, hueso o una combinación de los mismos.
- 60 15. Almacén de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho almacén es adecuado para aplicación a tejido óseo y de cartílago, de modo que dicha primera fase se puede implantar dentro o de forma proximal al tejido de cartílago y dicha segunda fase se puede implantar dentro o de forma proximal a tejido óseo.
- 65 16. Un kit para reparar cartílago y hueso que comprende el almacén de la reivindicación 1; directrices para usar dicho almacén en reparación de tejido; y opcionalmente una herramienta para inserción óptima de dicho almacén, opcionalmente en el que dicho kit comprende una serie de almacenes de diferentes tamaños, formas o una combinación de los mismos.

Figura 1

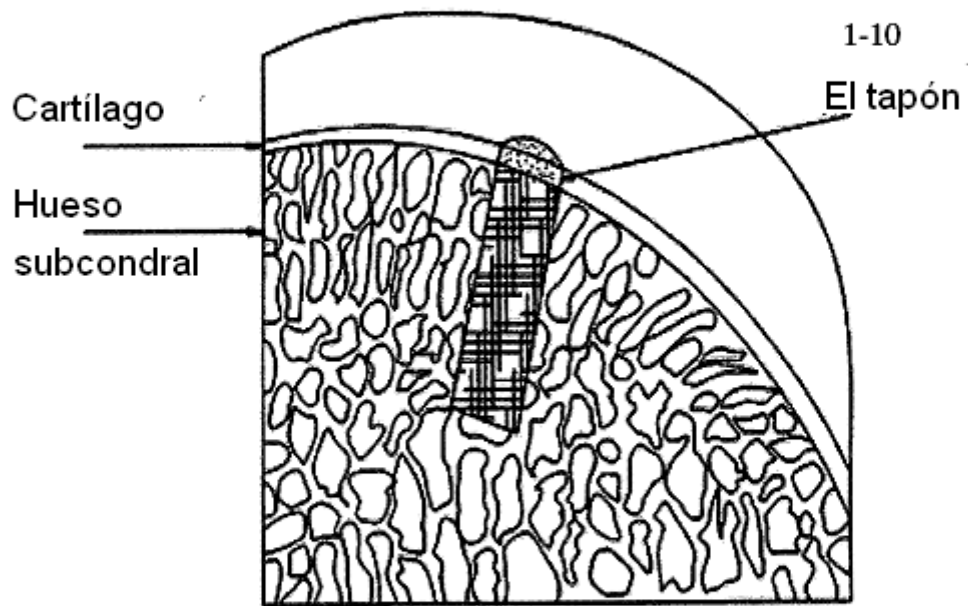


Figura 2A

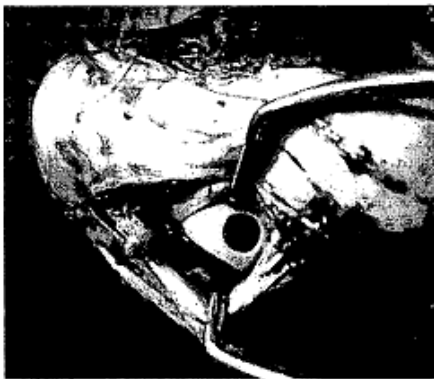


Figura 2B



Figura 2C



Figura 2D

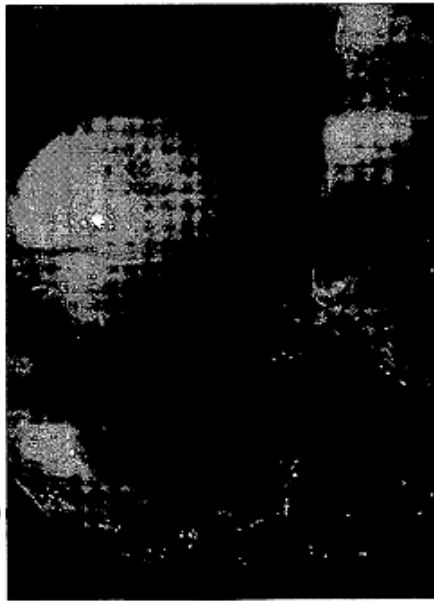


Figura 3B

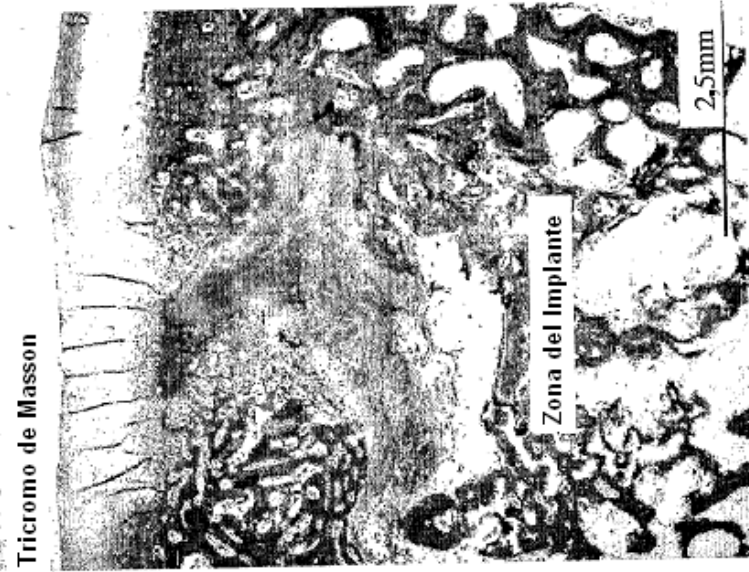


Figura 3A

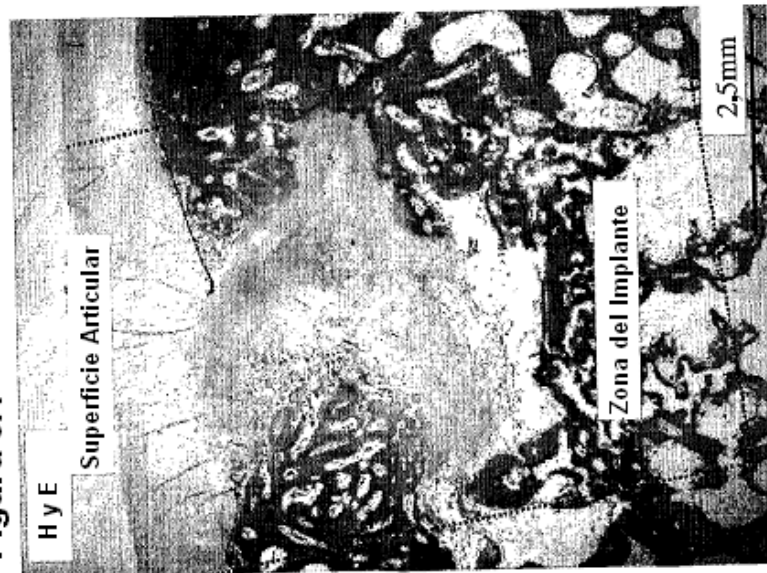


Figura 4B

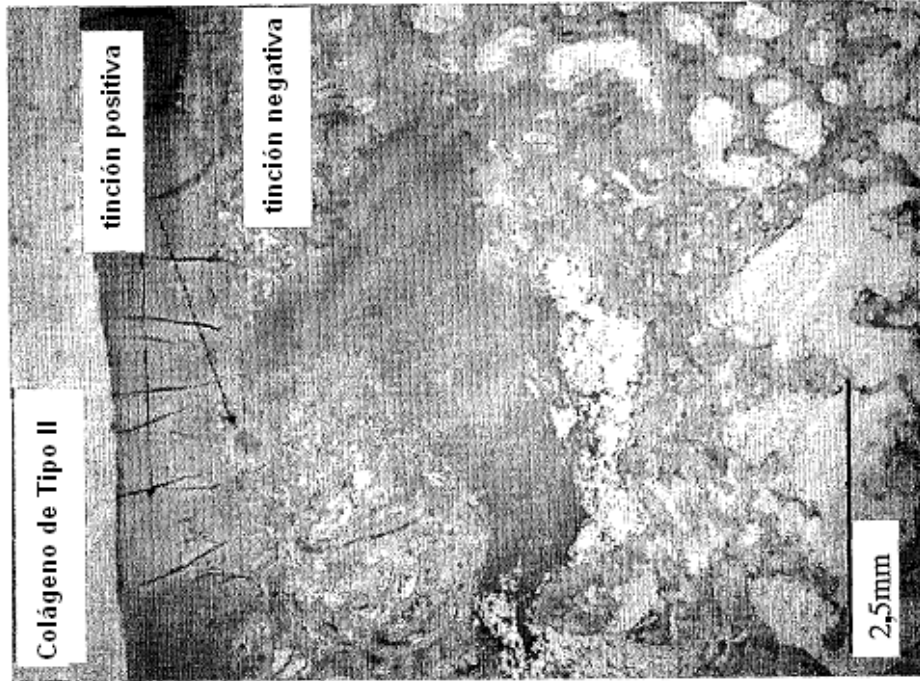


Figura 4A

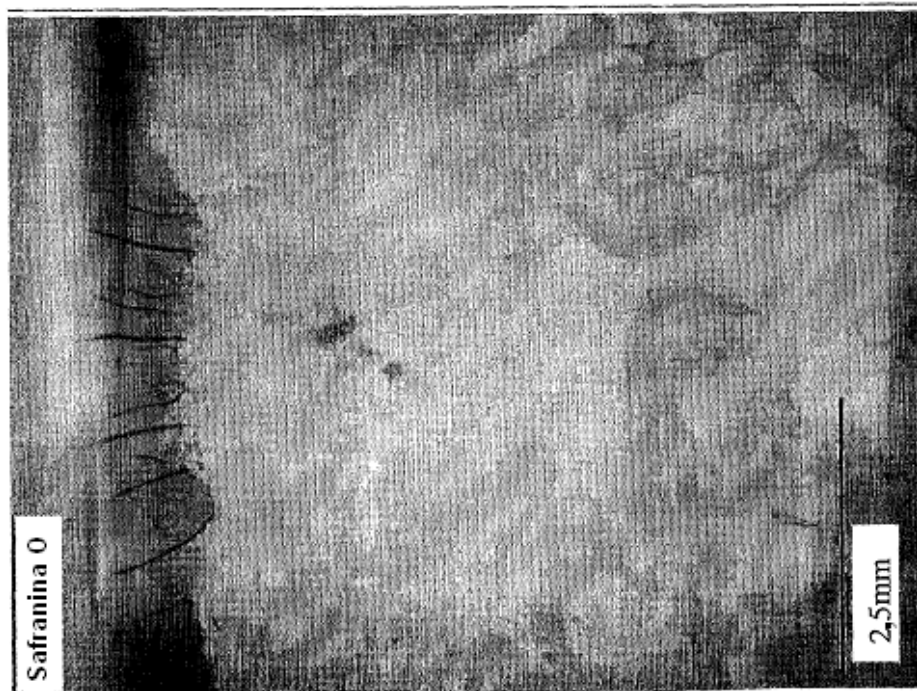


Figura 5B

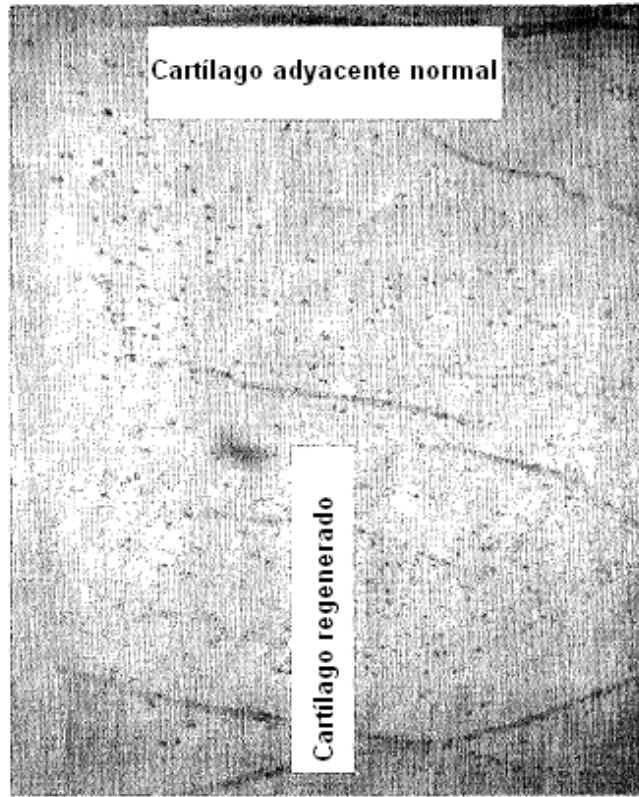


Figura 5A

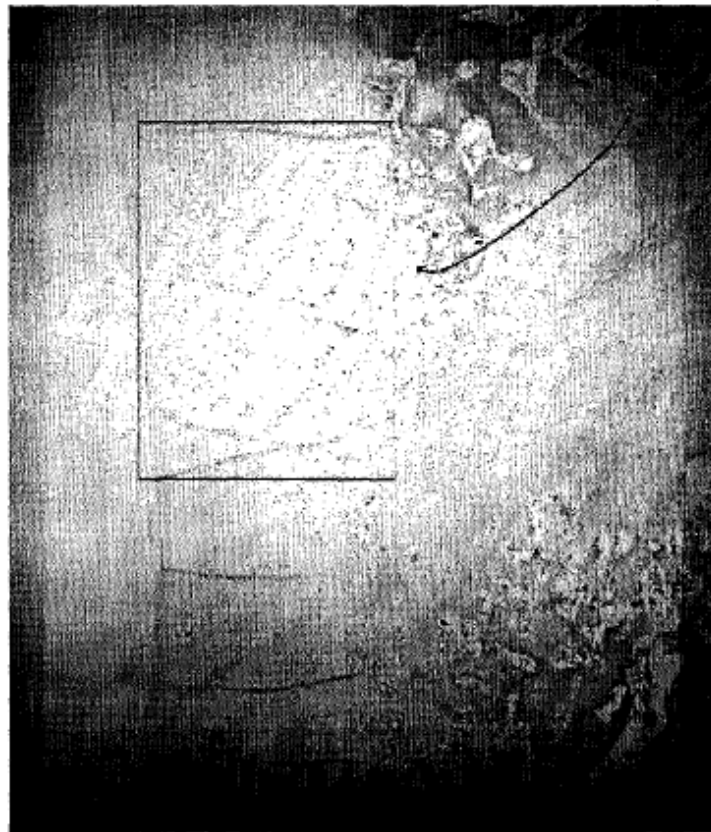


Figura 6A

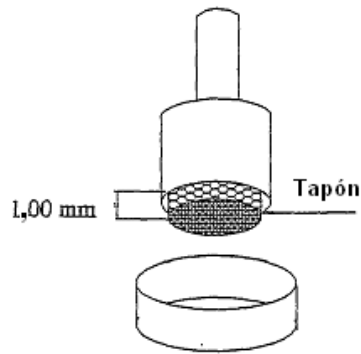


Figura 6B

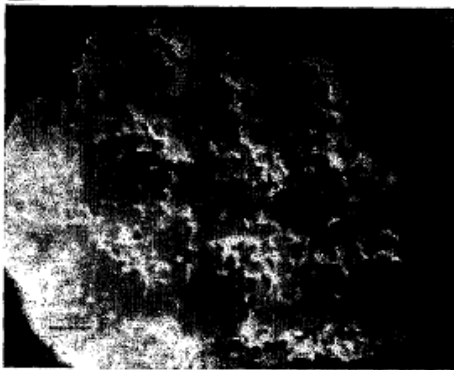


Figura 6C

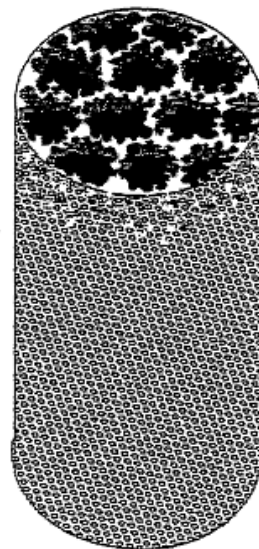


Figura 6D

- 0,5 mm Fase superior: ~ 85-90 % de porosidad
- 0,5 mm Fase intermedia 1: ~70-80 % de porosidad
- 0,5 mm Fase intermedia 2: ~60-70 % de porosidad
- 6 mm Fase inferior: ~45-55 % de porosidad

1 semana

2 semanas

3 semanas

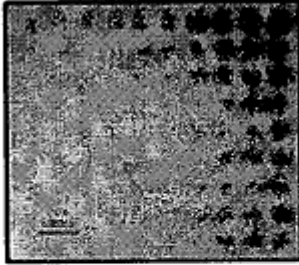


Figura 7A

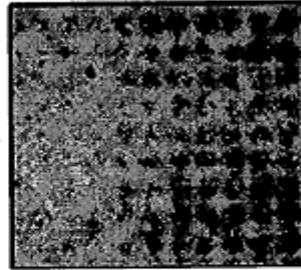


Figura 7B

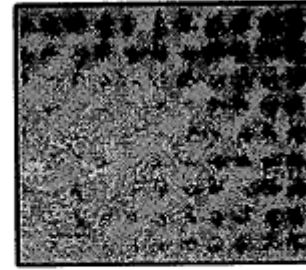


Figura 7C

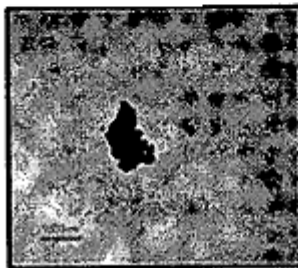


Figura 7D

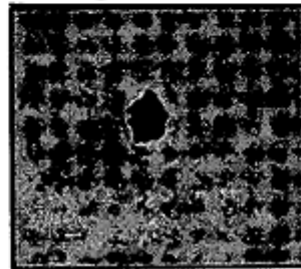


Figura 7E

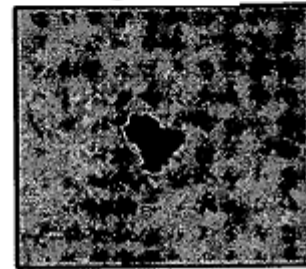


Figura 7F

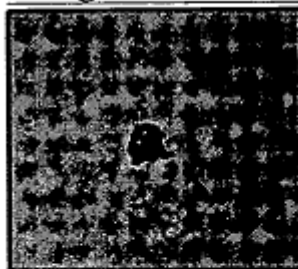


Figura 7G

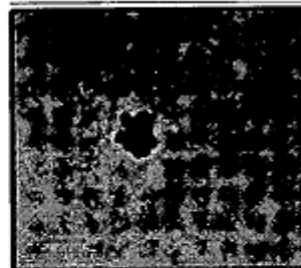


Figura 7H

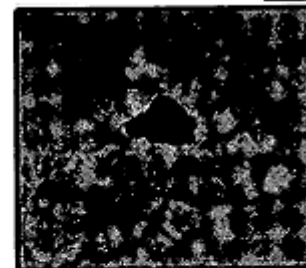


Figura 7I

Figura 8A

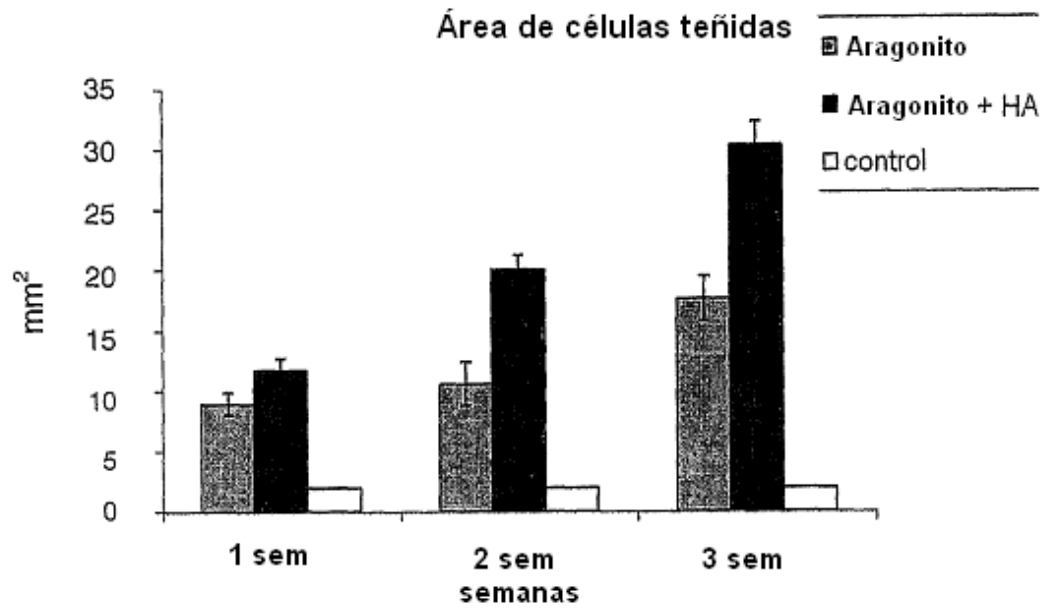
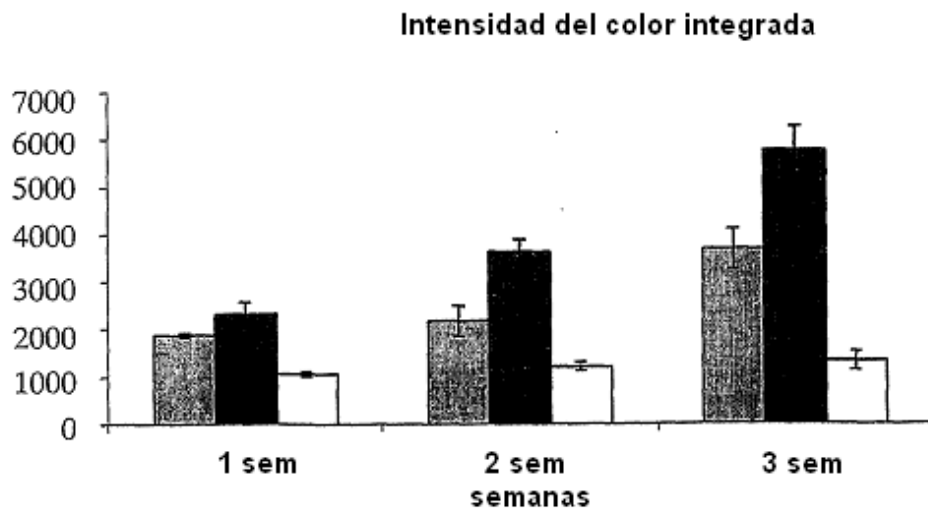


Figura 8B



SEM: MSC en Coral

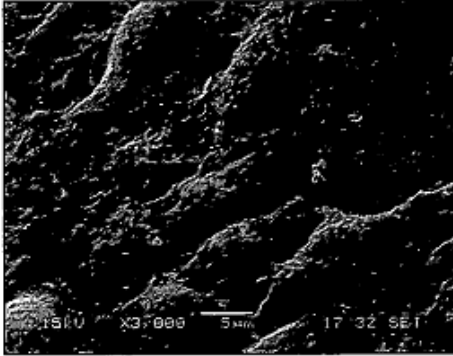


Figura 9A

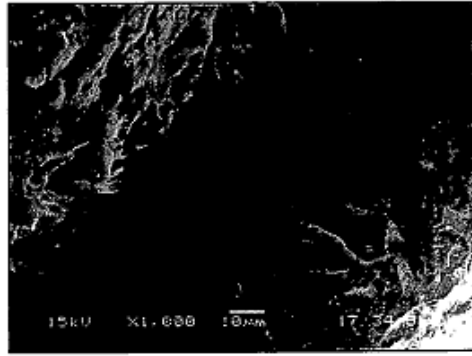


Figura 9B

SEM: MSC en Coral + Ácido Hialurónico

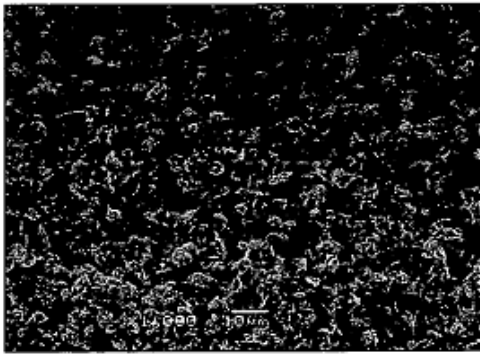


Figura 9C

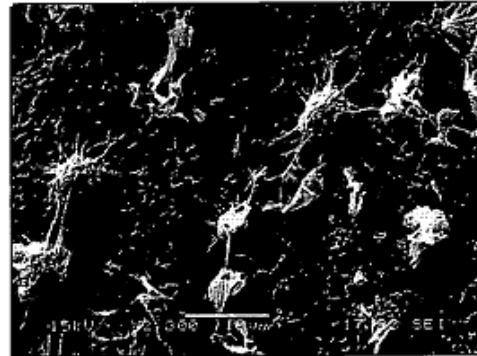


Figura 9D

Figura 10

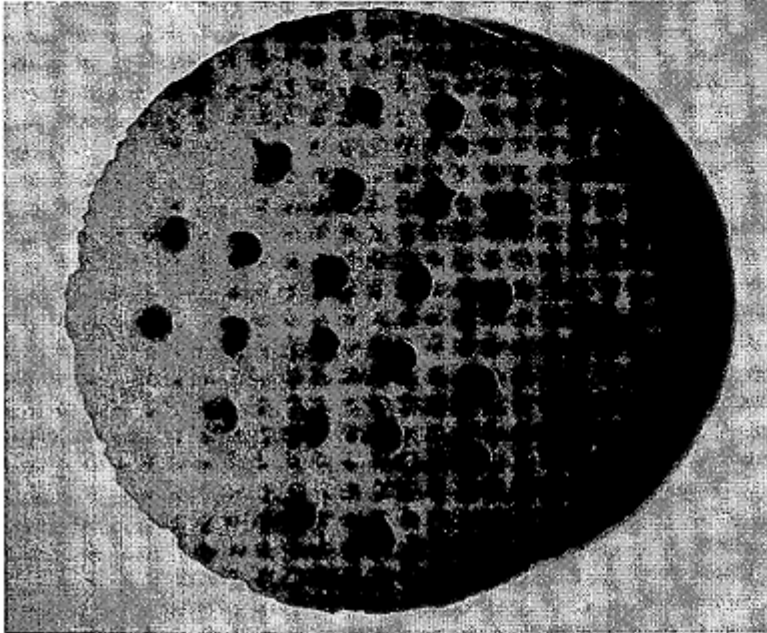


Figura 11A

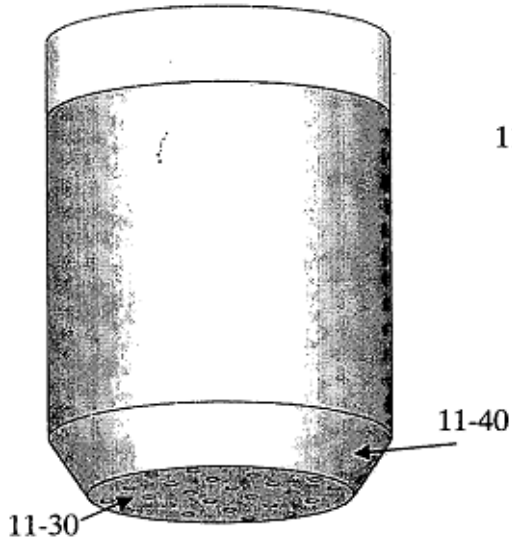


Figura 11B

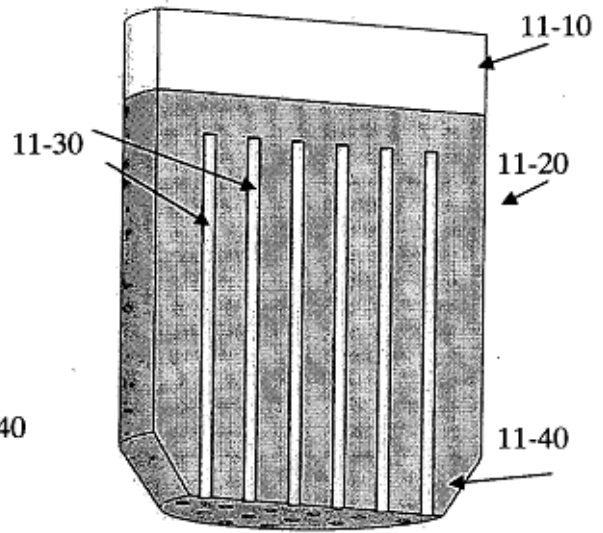


Figura 11C

