

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 775 977**

51 Int. Cl.:

A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.04.2009 PCT/IL2009/000395**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2009 WO09125402**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2009 E 09729344 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019 EP 2274023**

54 Título: **Implantes prostéticos similares al hueso**

30 Prioridad:

10.04.2008 US 71064
15.09.2008 US 136557

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.07.2020

73 Titular/es:

BONUS THERAPEUTICS LTD (100.0%)
38 Raul Walenberg
34990 Haifa, IL

72 Inventor/es:

MERETZKI, SHAI;
SROUJI, SAMER y
BARKAI, URIEL

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 775 977 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

Implantes prostéticos similares al hueso

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de las prótesis de hueso, cartílago y tejido duro, y más particularmente al uso de implantes basados en células para la preparación de implantes prostéticos para reemplazo y reparación ósea, reemplazo y reparación de cartílago, y para otras aplicaciones de tejido duro.

10

Antecedentes de la invención

La reparación de deficiencias descomunales, típicamente definidas como espacios de al menos aproximadamente 2,4 mm de tamaño, en los huesos diafisarios, craneomaxilofaciales y otros huesos del esqueleto es un problema considerable en la cirugía ortopédica.

15

En 1998, se realizaron alrededor de 300,000 procedimientos de injerto óseo solo en los Estados Unidos. Este número aumentó a aproximadamente 450.000 para el año 2000, cuando el número de procedimientos de injerto óseo realizados en todo el mundo superó los 2,2 millones (Lewandrowski y *otros*, 2000). De los 300.000 procedimientos realizados en 1998, el 90 % involucraba el uso de injertos autólogos (es decir, utilizando tejido de otra parte del cuerpo del paciente) o de aloinjertos (es decir, utilizando tejido de un donante humano vivo o de un cadáver). Por lo tanto, se requiere una fase de recolección de tejido del paciente o de un donante.

20

La extracción de tejido se realiza mediante un procedimiento quirúrgico que generalmente involucra la recolección de tejido de la cresta ilíaca, el fémur distal, la tibia proximal, el peroné u otros huesos pequeños. El tejido colectado se reestructura y se trasplanta en el sitio dañado.

25

Sin embargo, los procedimientos de recolección del injerto están asociados con una considerable morbilidad y un dolor considerable. La extracción de tejidos para injertos autólogos o de donantes vivos para un aloinjerto también puede provocar complicaciones como inflamación, infección o incluso la muerte. Los aloinjertos tomados de donantes vivos o de cadáveres también conllevan riesgos de transmisión de enfermedades y, aunque los injertos están sujetos a tratamientos de protección y esterilización como congelación de tejidos, liofilización, irradiación gamma, radiación de haz de electrones y óxido de etileno, este riesgo no se elimina por completo. Además, existen problemas sustanciales de suministro, ya que los tejidos óseos colectados son limitados.

30

35

El suministro limitado y las complicaciones de recolección heredadas han inspirado el desarrollo de variantes estratégicas para la reparación de defectos óseos significativos.

Se ha investigado el uso de sustitutos óseos tridimensionales (3-D), tales como extractos óseos, plataformas de polímeros o minerales como implantes y se han utilizado plataformas biocompatibles porosas para la reparación y regeneración de tejido óseo.

40

Los primeros intentos de reparación de tejidos se han centrado principalmente en el uso de espuma amorfa y biocompatible como tapones porosos para llenar grandes huecos en los huesos. La patente de los Estados Unidos Núm. 4,186,448 describió el uso de tapones de malla porosa compuestos de polímeros de polihidroxiácidos, como la polilactida, para curar huecos óseos. También se describieron varios procedimientos diferentes para hacer otras plataformas (es decir, las patentes de los Estados Unidos Núms. 5,133,755; 5,514,378; 5,522,895; 5,607,474; 5,677,355; 5,686,091; 5,716,413; 5,755,792; 5,769,899; 5,770,193; 6,333,029; 6,365,149 y 6,534,084).

45

50

Se ha demostrado que la médula ósea (BM) contiene una población de células que poseen potencial osteogénico. Como tal, una variante al enfoque osteoinductivo de la plataforma es trasplantar en pacientes células vivas que poseen esta capacidad.

Las células BM autólogas y alogénicas ingenuas manipuladas con citoquinas, han curado con éxito los huesos difractados o reabsorbidos en modelos experimentales (Wertz y *otros*, 1996; Lane y *otros*, 1999; Nilsson y *otros*, 1999; Kawaguchi y *otros*, 2004) y pacientes humanos (Horwitz y *otros*, 1999; Horwitz y *otros* 2001, 2004).

55

Estas técnicas se desarrollaron aún más mediante el uso de células mesenquimales enriquecidas para el trasplante, y se demostró que tienen éxito en modelos animales y pacientes humanos (Pereira y *otros*, 1995; Shang y *otros*, 2001; Horwitz y *otros*, 2002). En consecuencia, las patentes de los Estados Unidos Núms. 5,716,616 y 6,200,606 describe las terapias experimentales para tratar los síndromes de pérdida ósea que se basan en la implantación de células estromales frescas aisladas de individuos autólogos o singénicos en receptores (es decir, la patente de los Estados Unidos Núm. 5,716,616). Aunque este enfoque es prometedor en teoría, es difícil en la práctica obtener las cantidades suficientes de BM con el número requerido de células osteoprogenitoras.

60

65

Se han desarrollado procedimientos de inducción de tejidos (TI), en los que la regeneración de tejidos se produce a través del crecimiento de las células circundantes en plataformas tridimensionales. Las limitaciones del procedimiento de TI incluyen el requisito de material de plataforma que posea capacidad de TI y las propiedades mecánicas similares a las de los tejidos óseos autólogos.

Otro enfoque para la generación de tejido óseo se conoce como "trasplante de células complejo", que combina la tecnología de plataforma con técnicas de cultivo celular. En su forma más simple, el aspirado de BM autólogas se pasa a través de un sustrato implantable biocompatible colocado intraperitonealmente para proporcionar un injerto óseo compuesto (Nade y otros, 1983 y las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5,824,084; 6,049,026).

Alternativamente, las células progenitoras del linaje osteogénico se siembran en plataformas biocompatibles (biodegradables o no biodegradables) en presencia o ausencia de factores promotores del crecimiento (las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6,541,024; 6,544,290; 6,852,330). El trasplante a los pacientes afectados se realiza después de una fase de expansión *ex-vivo* de las células en la plataforma dada. Usando este enfoque, tanto las células osteogénicas primarias como las células estromales mesenquimales (MSC) estratificadas sobre plataformas de cerámica pudieron regenerar el tejido óseo (Kadiyala y otros, 1997; Bruder y otros, 1998a, b; Cinotti y otros, 2004).

Sin embargo, los resultados experimentales revelaron una serie de desventajas de esos trasplantes de células complejos. En primer lugar, el trasplante de médula ósea (TMO) en pacientes humanos se asocia con una disminución general de la densidad mineral esquelética (Valimaki y otros, 1999). En segundo lugar, se demostró que después del BMT, aunque las células mononucleares periféricas (MNC) en los receptores son de origen donante, las células de estroma BM y MSC son básicamente del origen del receptor (Koc y otros, 1999; Sotavento y otros, 2002). Finalmente, durante el primer año de seguimiento de los pacientes trasplantados de médula ósea, fue evidente una disminución gradual en la reparación ósea y se observó una pérdida significativa de las MSC del donante (Lee y otros, 2002).

El hueso vivo es un órgano en constante evolución y, en el curso normal del mantenimiento óseo, se está empleando un procedimiento de remodelación constante. En esos procedimientos, el hueso viejo está siendo reemplazado por hueso nuevo y el órgano responde a los requisitos cambiantes de su entorno para la fuerza y la elasticidad. Por lo tanto, la progresión normal de la remodelación requiere que los procedimientos de carga mecánica de la resorción ósea y los procedimientos de formación ósea estén estrechamente coordinados.

En términos celulares, esto depende del funcionamiento secuencial de los osteoclastos (células de resorción ósea) y los osteoblastos (células formadoras de hueso). Además, se requieren células endoteliales y precursores de células endoteliales (angioblastos) para formar los nuevos vasos sanguíneos en el tejido óseo desarrollado. Sin embargo, los diversos tipos de células que participan en la formación ósea son de diferentes linajes. Ahora se sabe que los osteoblastos derivan de las células madre mesenquimales, mientras que los osteoclastos (que se originan directamente de las células madre hematopoyéticas (HSC)) y las células endoteliales son descendientes de una célula común que forma colonias de blastos (Choi y otros, 1998; Hamaguchi y otros, 1999). Como tal, las metodologías para la producción *ex-vivo* del material similar al hueso que se basa en los osteoblastos, como el componente celular exclusivo sufren de una falla heredada.

Sería muy ventajoso tener un material para usar en la reparación de lesiones óseas que carezca de al menos algunas de las limitaciones de la técnica anterior.

Los dispositivos de fijación externos para mantener los huesos fracturados estabilizados y alineados, y asegurar que los huesos permanezcan en una posición óptima durante el procedimiento de curación, son conocidos y comúnmente utilizados. Tales dispositivos comprenden típicamente una pluralidad de pasadores colocados proximales y distales a la fractura, fijados en un conjunto mecánico externo circundante.

Los dispositivos de fijación externos también se utilizan para ortopedia reconstructiva, tales como el tratamiento de pérdidas y defectos óseos. En tales casos, el dispositivo puede permanecer en su lugar hasta que se produzca la curación y luego retirarse, sin dejar ningún material extraño dentro del hueso, o puede permanecer total o parcialmente dentro del hueso.

Los dispositivos de fijación externos son más útiles en modelos experimentales de reparación ósea que se han desarrollado para una variedad de propósitos, incluida la investigación de factores que influyen en la reparación de fracturas y el desarrollo de procedimientos mejorados para controlar las fracturas en seres humanos y animales. Dichos modelos utilizan huesos largos de grandes animales de experimentación, cuyo peso es más de 40 gr, tales como perros, ovejas, conejos y ratas. El término *hueso largo* se refiere a huesos en los que la longitud es mayor que el ancho, como un fémur, una tibia, un húmero y un radio.

La solicitud de Estados Unidos Núm. 20030149437 de los mismos inventores que la presente solicitud divulga un procedimiento para reparar un hueso largo que tiene un defecto. El procedimiento comprende fijar mecánicamente el hueso largo o partes del mismo y llenar el defecto con una plataforma biodegradable impregnada con factores de crecimiento y/o con células para provocar una regeneración del hueso.

El documento WO 2008/008229 divulga una plataforma 3D y la combinación de dos o más células sembradas en él en un biorreactor para ingeniería de tejidos.

Sumario de la invención

5

La presente invención proporciona una solución ideal para la regeneración *ex-vivo* del hueso y el cartílago remodelado, y otras aplicaciones de tejido duro. La técnica antecedente describe sustitutos óseos hechos de células de linaje osteogénico cultivadas en una plataforma tridimensional. En contraste con esta técnica, la presente invención manipula cultivos multicelulares y de cocultivo formados por al menos tres tipos de células que crecen en plataformas tridimensionales para optimizar los procedimientos de regeneración y remodelación ósea, a través de un sistema de flujo y más preferiblemente para crecer células a alta densidad.

10

15

A menos que se defina de cualquier otra forma, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente memoria tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente el experto en la técnica a la cual pertenece la invención. En caso de conflicto, prevalecerá la especificación de la patente, incluidas las definiciones.

20

25

Como se usa en la presente memoria, la expresión "cultivos tridimensionales" se refiere a cultivos en los que las células están dispuestas a condiciones que son compatibles con el crecimiento celular al tiempo que permiten que las células crezcan en más de una capa. Es bien sabido que el entorno *in situ* de las células en el organismo vivo (o en un tejido) está en una arquitectura tridimensional. Las células están rodeadas por otras células. Se mantienen en una red compleja de fibras de nanoescala de matriz extracelular que permite el establecimiento de varios microambientes locales. Sus ligandos extracelulares median no solo la unión a la membrana basal sino también el acceso a una variedad de vasos vasculares y linfáticos. El oxígeno, las hormonas y los nutrientes se transportan a las células y los productos de desecho se eliminan. Las condiciones en el cultivo tridimensional de la invención están diseñadas para imitar un entorno tal como se ejemplifica adicionalmente a continuación. Por lo tanto, la plataforma tridimensional de la presente invención es diferente y se prefiere a cualquier tipo de entornos de células artificiales bidimensionales.

30

Se apreciará que las condiciones del cultivo tridimensional son tales que permiten la expansión de las células adherentes.

35

Como se usa en la presente memoria, los términos "que se expande" y "expansión" se refieren al mantenimiento sustancialmente sin diferenciación de las células y, en última instancia, al crecimiento celular, es decir, el aumento de una población celular (por ejemplo, al menos 2 veces) sin diferenciación que acompañe a dicho aumento.

40

Como se usa en la presente memoria, los términos "que mantiene" y "mantenimiento" se refieren a una renovación celular sustancialmente sin diferenciación, es decir, una población celular sustancialmente estacionaria sin diferenciación que acompañe a dicho estado estacionario.

45

Como se usa en la presente memoria el término "tratar" incluye abrogar, inhibir sustancialmente, retardar o revertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente el cuadro clínico o los síntomas de una afección o prevenir sustancialmente la aparición del cuadro clínico o los síntomas de una afección.

50

Como se usa en la presente memoria, los términos "que comprende", "que incluye", "que tiene" y variantes gramaticales de los mismos deben tomarse como especificación de las características, números enteros, pasos o componentes establecidos, pero no excluyen la adición de una o más características adicionales, números enteros, pasos, componentes o grupos de los mismos. Estos términos abarcan los términos "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

55

La expresión "que consiste esencialmente en" o variantes gramaticales de la misma cuando se usa en la presente memoria debe tomarse como que especifica las características, números enteros, pasos o componentes indicados, pero no excluye la adición de una o más características, números enteros, pasos, componentes o grupos adicionales de los mismos pero solo si las características adicionales, enteros, pasos, componentes o grupos de los mismos no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, dispositivo o procedimiento reivindicado.

60

Como se usa en la presente memoria, los artículos indefinidos "un/una" y "unos/unas" significan "al menos uno" o "uno o más" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

65

Según la invención, se proporciona un implante protésico que comprende una plataforma tridimensional biocompatible y al menos tres tipos de células seleccionados del grupo que consiste en osteoblastos, osteoclastos, condrocitos y células endoteliales, así como células madre mesenquimales. Opcionalmente, los osteoblastos se derivan de células madre mesenquimales. También opcionalmente, los al menos tres tipos de células se obtienen de una fuente seleccionada del grupo que consiste en una fuente autóloga, una fuente singénica y una fuente alogénica. Preferiblemente, la fuente comprende una o más células de médula ósea, placenta, tejido adiposo, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, sangre periférica movilizada, células madre embrionarias y similares.

- 5 Preferiblemente, la plataforma tridimensional comprende un preformado y esponjoso o poroso y puede, por ejemplo, comprender un material orgánico, cerámico o metálico, o comprende partículas de hueso seco, congelado o desmaterializado o comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en poliésteres alifáticos, poli (aminoácidos), copoli (éter-éster), polialquilenos oxalatos, poliamidas, policarbonatos derivados de tirosina, poli (iminocarbonatos), polioctoésteres, polioxésteres, poliamidoésteres, polioxésteres que contienen grupos amina, poli (anhídridos), polifosfencenos, vidrio bioactivo, derivados de fosfato de calcio, derivados de sulfato de calcio, hidroxiapatita de calcio, matrices de silicato, hidroxiapatita, ácido hialurónico, fosfato de calcio beta-3, fibras de colágeno reticuladas, materiales a base de resina y combinaciones de los mismos.
- 10 Más preferiblemente, la plataforma tridimensional comprende un sólido o gel como polímero biodegradable.
- Opcional y más preferiblemente, el polímero biodegradable es un polímero natural seleccionado del grupo que consiste en alginato, quitosana, derivados de hialuronano y colágeno, y combinaciones de los mismos.
- 15 También opcionalmente y lo más preferiblemente, el polímero biodegradable se selecciona del grupo que consiste en policaprolactona, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, ácido poliláctico-coglicólico, ácido poli tartónico o copolímeros de los mismos y combinaciones de los mismos.
- 20 Opcionalmente, la plataforma tridimensional comprende un material biodegradable. En variante y opcionalmente, la plataforma tridimensional comprende un material no biodegradable.
- Opcionalmente, la plataforma tridimensional tiene un tamaño de poro en el intervalo de aproximadamente 50 micrómetros a aproximadamente 1000 micrómetros.
- 25 También opcionalmente, la plataforma tridimensional presenta una capa de revestimiento que comprende un material seleccionado del grupo que consiste en poli-D-lisina, poli-L-lisina, colágeno, fibronectina, matriz extracelular (ECM) e hidrogel, o una combinación de los mismos.
- 30 El implante anterior se puede usar opcionalmente para reparar al menos una porción de una lesión ósea, en cuyo caso el implante está opcionalmente preformado para su inserción en la lesión ósea.
- Según la presente invención, también se proporciona un procedimiento de producción de un implante protésico, que comprende aislar, expandir y cultivar conjuntamente al menos tres tipos de células seleccionadas del grupo que consiste en células madre mesenquimatosas, osteoblastos, osteoclastos, condrocitos y células endoteliales en una plataforma tridimensional.
- 35 Las células están dispuestas de manera tridimensional en la plataforma para mejorar el crecimiento y/o la viabilidad. Las células se hacen crecer preferiblemente a alta densidad. Las células se cultivan opcionalmente a una densidad de al menos 10^6 células/ml, preferiblemente cultivadas a una densidad de al menos 5×10^6 células/ml y más preferiblemente cultivadas a una densidad de al menos 10^7 células/ml.
- También opcionalmente, la plataforma tridimensional proporciona un entorno que soporta el crecimiento de cultivo de células a alta densidad mediante el uso de un flujo de medios mejorado.
- 45 La expansión se realiza en un sistema de flujo que permite el crecimiento de cultivos de alta densidad, tal como un biorreactor.
- Más preferiblemente, el biorreactor comprende una matriz de crecimiento. Opcionalmente, la matriz de crecimiento está en forma de hoja. Preferiblemente, la hoja comprende fibra no tejida. Alternativamente, la hoja comprende polímeros espumados de poro abierto. Más preferiblemente, el grosor de la hoja es de aproximadamente 50 a aproximadamente 1000 micrómetros. Lo más preferiblemente, la hoja comprende poros que tienen un diámetro de aproximadamente 10 micrómetros a aproximadamente 100 micrómetros. Opcional y más preferiblemente, la hoja comprende fibras que tienen un diámetro de aproximadamente 0,5 micrómetros a aproximadamente 200 micrómetros. Opcionalmente, el diámetro es de aproximadamente 10 micrómetros a aproximadamente 20 micrómetros.
- 55 Opcionalmente, la plataforma tridimensional está pre-conformada para implante en una lesión ósea.
- Opcionalmente, el procedimiento de aislamiento de células mesenquimales comprende la preparación de muestras de médula ósea, tejido adiposo, sangre periférica movilizada, placenta o vena del cordón umbilical, obteniendo una suspensión celular, centrifugando la suspensión; y colectando células estromales mesenquimales precipitadas y células mesenquimatosas.
- 60 Opcionalmente, el procedimiento de aislamiento de células endoteliales y hematopoyéticas comprende la preparación de muestras de médula ósea; tejido adiposo; sangre periférica; sangre periférica movilizada, sangre del cordón umbilical, vena del cordón umbilical o placenta, obteniendo una suspensión celular, centrifugando la suspensión; y recolectando células precipitadas.
- 65

Opcionalmente, la etapa de cocultivo comprende someter las células a un estímulo osteogénico.

5 Opcionalmente, el estímulo osteogénico comprende poner en contacto las células con una molécula seleccionada del grupo que consiste en dexametasona, β -glicerofosfato de sodio, 1,25 dihidroxicolecalciferol calcitriol y ácido L-ascórbico-2-fosfato (10-500 nM). Preferiblemente, el estímulo osteogénico comprende la exposición a fuerzas de corte.

10 Opcionalmente, una concentración de dexametasona está en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 nM.

Opcionalmente, una concentración del β -glicerofosfato de sodio está en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 mM.

15 Opcionalmente, una concentración del 1,25 dihidroxicolecalciferol calcitriol está en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 nM.

Opcionalmente, la etapa de cocultivo se lleva a cabo en un medio que comprende al menos uno de un factor de crecimiento y una citocina.

20 Preferentemente, el factor de crecimiento o citocina se selecciona del grupo que consiste en factor de crecimiento transformante beta (TGF beta), factor de crecimiento similar a la insulina 1 y 2 (IGF-1 y 2), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), proteína osteogénica 1 (OP-1), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), FGF-2, FGF-9, FGF-10, PTH (hormona paratiroidea), PRP (plasma rico en plaquetas), EGF (factor de crecimiento epidérmico), VEGF (endotelial vascular factor de crecimiento) y un miembro de la familia de Proteína Morfogénica Ósea (BMP). Más preferiblemente, la proteína morfogénica ósea se selecciona del grupo que consiste en BMP-2, BMP-4 y BMP-7.

De acuerdo con otras realizaciones, se proporciona un implante construido de acuerdo con cualquier procedimiento descrito en la presente memoria.

30 **Breve descripción de las figuras**

Algunas realizaciones de la invención se describen en la presente memoria, a modo de ejemplo solamente, con referencia a las figuras adjuntas. La descripción, junto con las figuras, pone de manifiesto cómo las realizaciones de la invención se pueden practicar para los expertos en la materia. Se enfatiza que los detalles mostrados en las figuras son a modo de ejemplo y para propósitos de discusión ilustrativa de realizaciones de la invención.

En las figuras:

40 La Figura 1 ilustra un sistema de biorreactor para el crecimiento de células de acuerdo con los principios de la presente invención;

La Figura 2 muestra los resultados de la siembra de MSC derivadas de BM en el plato en cocultivo con progenitores hematopoyéticos cultivados en un sistema de flujo dinámico tridimensional; y demuestra la interacción tridimensional del cocultivo de las células;

45 Las Figuras 3 y 4 muestran el microscopio electrónico de barrido (SEM) y las micrografías confocales de plataformas sintéticas tridimensionales sembradas con MSC, cultivados en un sistema de flujo dinámico; y demuestra la densidad celular a lo largo y entre las fibras;

La Figura 5 muestra una imagen de microscopía óptica de cultivos de MSC, 7 días después de inducir la diferenciación a osteoblastos;

50 La Figura 6 muestra la diferenciación de MSC a osteoblastos, y el análisis del espectro EDS de elementos en concentración molar en cultivos de MSC después de 3 semanas;

La Figura 7 muestra una vista microscópica de un cocultivo que contiene dos tipos de células (células osteoprogenitoras y células endoteliales) después de 7 y 14 días en cultivo;

La Figura 8 muestra la tinción con rojo de alizarina en cocultivos que contienen dos tipos de células (células osteoprogenitoras y células endoteliales); demuestra la interacción tridimensional de esas células

55 La Figura 9 muestra que la inmunotinción positiva para osteocalcina fue mayor en cocultivos de osteoprogenitores y células endoteliales después de 14 días en cultivo;

La Figura 10 muestra una vista general de la construcción de microesferas cargada con el osteoprogenitor y las células endoteliales antes y después de la siembra; el cocultivo de células osteoprogenitoras (CFDA, verde) y células endoteliales (Hoecht, azul) cultivadas en construcción de microesferas; demostrando la co-ubicación de las células endoteliales y los osteoprogenitores sembrados en la plataforma de microesferas;

60 La Figura 11 muestra la capacidad de las células estromales mesenquimales para diferentes *in vitro* en condrocitos;

La Figura 12 muestra el modelo experimental *in vivo* de defectos de tamaño crítico y la capacidad de crear un defecto óseo no curativo;

65 Las figuras 13 y 14 muestran los resultados preclínicos basados en el uso de defectos de tamaño crítico *in vivo* que demuestran la capacidad del cultivo multicelular tridimensional para cicatrizar un defecto óseo no cicatrizante;

La Figura 15 muestra los resultados preclínicos que demuestran el hueso artificial biodegradable trasplantado dentro de este modelo *in vivo* para ser aceptado por el receptor y permitir el desarrollo del órgano completo, incluidos los vasos sanguíneos;

La Figura 16 demuestra las construcciones de plataforma celular de MSC marcadas con GFP cultivadas en plataformas 3D;

La figura 17 es una vista frontal de un sistema de fijación externo según la presente invención.

La figura 18A ilustra una colocación y fijación temporal de una extremidad de un ratón;

Las Figuras 18B -21 ilustran esquemáticamente un procedimiento de creación de la CSD en un fémur de un animal pequeño; y

Las figuras 22A y 22B ilustran otras realizaciones del sistema de fijación externo según la presente invención.

Descripción de las realizaciones

La presente invención se define por las reivindicaciones y proporciona un implante protésico que comprende una plataforma tridimensional biocompatible y, a partir de ahí, tres tipos de células seleccionados del grupo que consiste en osteoblastos, osteoclastos, condrocitos y células endoteliales, así como células madre mesenquimales en un cultivo tridimensional.

El uso de al menos tres tipos de células está en marcado contraste con la técnica anterior que depende de la expansión de un solo tipo de células progenitoras, a saber, los pre-osteoblastos, como se divulga en la patente de los Estados Unidos Núm. 6,811,776.

La presente invención también proporciona, en al menos algunas realizaciones, un procedimiento para producir el implante protésico descrito anteriormente, el procedimiento comprende los pasos de aislamiento, expansión y cocultivo de al menos tres tipos de células en una plataforma tridimensional.

Las plataformas tridimensionales están prefabricadas al tamaño y forma requeridos. Los al menos tres tipos de células en proporciones predeterminadas se cultivan y expanden primero por separado. A continuación, se cultivan y se expanden de manera conjunta *ex vivo* en condiciones estériles en la plataforma tridimensional, utilizando un medio de cultivo convencional, como DMEM, RPMI, con suplementos de suero humano (de fuentes autólogas o alogénicas) o suero animal, o en medios sin suero que permitan la unión y el crecimiento de células adherentes. El medio de cultivo que apoyó la fase inicial de crecimiento y expansión de estas células puede reemplazarse opcionalmente por otra fórmula de cultivo celular que respalde la diferenciación de estas células y la formación de hueso.

El HSC se puede sembrar en el sistema de cultivo tridimensional fundador, que es la plataforma 3D que contiene el MSC y los osteoblastos con o sin células endoteliales y/o progenitores endoteliales, en una proporción fija. En variante, las HSC se siembran simultáneamente o sustancialmente simultáneamente con las MSC y los osteoblastos, con o sin células endoteliales. Una relación preferente de no HSC a HSC es entre 5:1 a 5000:1, respectivamente. Más preferentemente, la relación es entre 20:1 a 300:1. Según la evidencia experimental realizada por uno o más de los inventores, se demostró que estas proporciones eran preferidas (datos no mostrados). Para la mera expansión de las células y las células madre, se emplean medios sin suero o que contienen suero. Durante la fase de expansión, los medios que contienen suero están preferiblemente libres de moléculas bioactivas suplementadas de los siguientes grupos: hormonas, factores de crecimiento, quimiocinas y citocinas.

Para promover la diferenciación descendente de las células expandidas en células formadoras de hueso necesarias para crear las prótesis con aspecto de hueso, los cocultivos desarrollados como se describió anteriormente pueden estar expuestos a estímulos osteogénicos. Estos pueden incluir la mera presencia de fuerzas de corte generadas en el sistema de biorreactor de flujo continuo y/o un medio de diferenciación de cultivo que contiene, por ejemplo, una o más de las siguientes moléculas: dexametasona, calcitriol (derivado de la vitamina D), β - de sodio glicerofosfato y ácido L-ascórbico-2-fosfato.

Opcionalmente, el medio de crecimiento puede complementarse con factores de crecimiento y citocinas, tales como, por ejemplo, uno o más de: factor de crecimiento transformante beta (TGF beta), factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), proteína osteogénica- 1 (OP-1), miembros del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) como FGF-2, FGF-9 y FGF-10 y miembros de proteínas morfogénicas óseas (BMP) especialmente BMP-2, BMP-4 y BMP-7.

Preferiblemente, el implante completo se trasplanta luego a un sitio predeterminado de pérdida ósea.

De manera ejemplar, las aplicaciones ilustrativas no limitantes de tales implantes y/o prótesis y/o procedimientos de acuerdo con la presente invención incluyen al reemplazo óseo, aumento óseo (por ejemplo, en casos de debilidad ósea, osteoporosis y/u otras afecciones en las que se reduce la materia ósea pero no necesariamente falta), aplicaciones dentales (que pueden relacionarse opcionalmente con el reemplazo por pérdida ósea y/o aumento óseo), áreas corporales específicas de reemplazo, tales como senos en los que los medios o gel semisólidos pueden usarse opcionalmente como plataforma en lugar de una plataforma rígida (que luego puede extenderse opcionalmente para llenar el área), aplicaciones combinadas de hueso/cartílago (en las cuales la plataforma puede combinar opcionalmente ambos tipos de estructuras, que pueden separarse opcionalmente dentro de la plataforma, por ejemplo para el

tratamiento de articulaciones que incluyen pero no se limitan a rodillas, codos, tobillos, etc.), aplicaciones de cirugía plástica, reparación de hueso o cartílago, reemplazo de cartílago, aplicaciones ortopédicas y otras aplicaciones de tejido, o aplicaciones de cartílago solo. El cartílago se prepara opcionalmente a partir de materiales alogénicos.

5 Los implantes pueden prepararse opcionalmente para cada aplicación y/o pueden mantenerse congelados en nitrógeno líquido, por ejemplo, antes de su uso. Además, los implantes pueden prepararse opcionalmente parcialmente y luego terminarse en el momento del uso, por ejemplo, para permitir el uso de células autólogas del sujeto a tratar.

10 Las células se expanden preferiblemente y se cultivan conjuntamente en un sistema de biorreactor dedicado. Los resultados preliminares presentados en la sección de ejemplos a continuación demuestran que un sistema de flujo dinámico, como un biorreactor, por ejemplo, estimula la densidad celular óptima y la viabilidad celular en una construcción tridimensional, que se prefiere para una implantación *in-vivo* exitosa.

15 La Figura 1 ilustra una muestra para el sistema de biorreactor de flujo de tapón que puede usarse para el crecimiento de células de acuerdo con los principios de la presente invención.

20 El biorreactor se describe en detalle en la patente de los Estados Unidos Núm. 6,911,201 y divulga un sistema de biorreactor de flujo de tapón que permite el crecimiento y el mantenimiento prolongado de cultivos de células estromales de alta densidad, que imita de cerca el microambiente tridimensional de la médula ósea. Las células se sembraron en platos inorgánicos porosos (es decir, que tienen poros) hechos de una matriz de poliéster no tejida, lo que permite la propagación de grandes números de células en un volumen relativamente pequeño. La estructura y el empaque del plato tienen un gran impacto en la transferencia de oxígeno y nutrientes, así como en las concentraciones locales y los productos de células del estroma liberados (p. Ej., Proteínas ECM, citocinas). Además, se ha determinado que la capacidad de las células mesenquimales y estromales cultivadas en este sistema para promover el mantenimiento y la expansión de células madre hematopoyéticas humanas trasplantables es muy superior a los procedimientos de la técnica anterior.

30 El biorreactor comprende un depósito de medio **1**; un recipiente de mezcla de gases **2**; filtros de gas **3**; puntos de inyección **4**; **5** tapones o contenedores de varios tamaños que contengan una plataforma tridimensional preformada; monitores de flujo **6**; válvulas de flujo **6a**; recipiente de recogida y separación de medio condicionado **7**; contenedor para intercambio de medio **8**; bomba peristáltica **9**; punto de muestreo **10**; contenedor para intercambio de medio **11**; monitor **12**; dispositivo de dirección **14**; y sonda de pH.

35 Preferiblemente se usa un sistema de flujo continuo. Sin embargo, debe entenderse que cualquier sistema de flujo controlado podría usarse en lugar del biorreactor de la Figura 1, que pretende ser un ejemplo ilustrativo no limitante solamente. El flujo, adecuado, pero no excesivo, los niveles de oxígeno disuelto, el control del pH, el nivel de glucosa y la temperatura son los componentes más importantes de dicho sistema. Por ejemplo, el biorreactor puede implementarse opcionalmente de acuerdo con el biorreactor PluriX™ (Pluristem, Haifa, Israel), los biorreactores de New Brunswick y los tanques de agitación controlados o el sistema de botellas rodantes.

40 El sistema de flujo o biorreactor descrito en la presente memoria incluye las características preferidas de soportar cultivos tridimensionales de MSC con un sistema de flujo continuo. El biorreactor de flujo de tapón descrito en la presente memoria es capaz de soportar el crecimiento a largo plazo de MSC primarias humanas, osteoblastos, cultivos multicelulares tridimensionales endoteliales y de HSC.

45 El uso de cultivos multicelulares tridimensionales en el biorreactor no solo es esencial para el establecimiento de un contacto superior entre células (a través de "nichos" únicos e interacciones célula-célula, célula-ECM), sino también para la producción de y nuevas citocinas solubles y unidas a la membrana. El cultivo multicelular tridimensional puede facilitar la suplementación de dichos biorreactores con citocinas apropiadas, mediante el uso de variantes genéticamente modificadas que producen citocinas.

50 En clara distinción con los procedimientos de la técnica antecedente, el biorreactor que se puede usar en la presente invención emplea una matriz de crecimiento que aumenta sustancialmente la superficie de unión disponible para la adherencia de las MSC, osteoblastos, endoteliales y HSC para imitar la infraestructura mecánica del microambiente óseo y permite la formación ósea *in vitro*. La matriz de crecimiento comprende un material poroso como se describe con mayor detalle a continuación. Por ejemplo, para una matriz de crecimiento de 0,5 mm de altura, el aumento es por un factor de al menos 5 a 30 veces, calculado por proyección sobre una base de la matriz de crecimiento. Tal aumento en un factor de aproximadamente 5 a 30 veces, es por capa de unidad, y si se usa una pluralidad de tales capas, ya sea apiladas o separadas por espaciadores o similares, se aplica el factor de 5 a 30 veces por cada estructura.

60 Cuando la matriz se usa en forma de hoja, preferiblemente hojas de fibra no tejida, u hojas de polímeros espumados de poro abierto, el grosor preferido de la hoja es de aproximadamente 50 a 1000 µm o más, proporcionando una porosidad adecuada para la entrada de la celda, entrada de nutrientes y para la eliminación de productos de desecho de los tejidos en crecimiento.

65

Según una realización preferente, los poros tienen un diámetro efectivo de 10 μm a 100 μm . Dichas hojas se pueden preparar a partir de fibras de diversos espesores, siendo el grosor de fibra preferido o el intervalo de diámetro de fibra de aproximadamente 0,5 μm a 20 μm , aún las fibras más preferidas están en el intervalo de 10 μm a 15 μm de diámetro.

5 Las hojas de matriz también se pueden cortar, perforar o triturar para proporcionar partículas con un área proyectada del orden de aproximadamente 0,2 mm^2 a unos 10 mm^2 , con el mismo orden de grosor (aproximadamente 50 a 1000 μm).

10 Las estructuras de las plataformas 3D de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención pueden estar soportadas por, o unidas a, una hoja o pantalla de soporte porosa que proporciona estabilidad dimensional y resistencia física.

15 Por lo tanto, una plataforma tridimensional en conjunto con un biorreactor de flujo dinámico como se ilustra en la Figura 1 proporciona la viabilidad celular a largo plazo de células cultivadas *in vitro* sembradas en plataformas tridimensionales destinadas para la aplicación *in vivo*.

20 Como se muestra en las Figuras 2-4, este sistema de crecimiento proporciona la masa crítica necesaria célula/volumen y el medio fisiológico, incluido un suministro constante de oxígeno y nutrientes esenciales, imitando así estrechamente las condiciones *in vivo*.

25 Las Figuras 3 y 4 muestran micrografías del microscopio electrónico de barrido (SEM) y confocales de una plataforma sintética tridimensional sembrada con MSC humanas cultivadas en un sistema de flujo dinámico; y demuestra la densidad celular a lo largo y entre las fibras.

30 Las células mesenquimales, osteoblastos, condrocitos, endoteliales y HSC que pueden usarse en diversas realizaciones de la presente invención son de fuentes autólogas, singénicas o alogénicas. Para el trasplante de células hematopoyéticas o endoteliales de fuentes de donantes alogénicos, se realiza la tipificación de HLA y solo se utilizan células suficientemente emparejadas. La causa más común de falla del injerto óseo es el rechazo del injerto (Hoffmann y otros, 1998). Sin embargo, las células mesenquimales y las MSC expresan bajos niveles de antígenos MHC (Sun y otros, 2003; Niemeyer y otros, 2004) y las MSC mostraron que inhiben las respuestas de células T (Krampera y otros, 2003; Maitra y otros, 2004). Las células mesenquimales alogénicas trasplantadas y las MSC podrían detectarse en receptores en puntos de tiempo prolongados, lo que indica la falta de reconocimiento y eliminación inmune (Aggarwal y Pittenger, 2005). En consecuencia, las MSC y las células mesenquimales como los osteoblastos y los condrocitos pueden generarse a partir de fuentes autólogas o alogénicas. Las células endoteliales, aunque expresan solo niveles bajos de antígenos HLA (Neppert y otros, 1984; Shahgasempour, 1998; Johnson, 2000) son inmunogénicos y podrían mediar en el rechazo vascular (endotelialitis). Esto también se aplica a las células de origen HSC como los osteoclastos. Como tal, de acuerdo con la presente invención y antes de la expansión de prótesis óseas a partir de fuentes alogénicas, debe tipificarse el repertorio de HLA en células donantes. Solo se deben manipular las células endoteliales alogénicas, las HSC y los osteoclastos estrechamente emparejados.

40 La plataforma tridimensional de la presente invención comprende un material no tóxico y biocompatible, biodegradable o no biodegradable, que puede prepararse en una estructura tridimensional para apoyar el crecimiento de cultivos celulares tridimensionales y promover la generación guiada de tejido.

45 La plataforma comprende preferiblemente un polímero biocompatible que tiene un tamaño de poro en el intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 2000 micrómetros, más en el intervalo de aproximadamente 250 a aproximadamente 750 micrómetros. Los entornos físicos que soportan el crecimiento de los cocultivos en dichas matrices tridimensionales se pueden elegir entre sistemas estáticos que involucran matraces y placas para cultivo celular. Sin embargo, el cultivo de células en plataformas lo suficientemente grandes como para salvar defectos de tamaño crítico es problemático. La difusión simple puede ser incapaz de proporcionar suficientes nutrientes en las plataformas grandes. En consecuencia, en condiciones de cultivo estático, las células pueden proliferar preferentemente en la periferia de la plataforma solamente. Bajo las condiciones de crecimiento de la presente invención, varias variantes de maquinarias podrían usarse opcional y preferiblemente para permitir el flujo de medios y transportar los medios de cultivo de manera uniforme. Estos incluyen, entre otros, tanques agitados, matraces giratorios, recipientes rotativos, botellas rodantes, cestas rodantes y un sistema de flujo de tapón de perfusión o flujo (flujo de tapón) (véase el ejemplo 55 1, Figura 1 para más detalles).

60 La plataforma tridimensional del material de la presente invención puede ser en polvo, semisólido o similar a un gel, por lo que es adecuado para su uso en implantes que no tienen requisitos de función de resistencia mecánica. Sin embargo, la plataforma también puede ser sustancialmente preformada y similar a una esponja o poroso y, por ejemplo, puede comprender un material orgánico, cerámico o metálico y, en función del material de plato específico elegido, puede cumplir una función de resistencia mecánica y permitir el crecimiento de células a alta densidad. El implante preformado también puede prepararse opcionalmente cortando o alterando de otro modo la estructura de la plataforma tridimensional para que sea adecuada para las características y requisitos del implante deseado.

65 La plataforma tridimensional de la presente invención puede comprender opcionalmente partículas óseas o polímeros secos, congelados o desmaterializados seleccionados del grupo que consiste en poliésteres alifáticos, poli

(aminoácidos), copoli (éter-éster), polialquilenos oxalatos, poliamidas, policarbonatos derivados de tirosina, poli (iminocarbonatos), poliortoésteres, polioxésteres, poliamidoésteres, polioxésteres que contienen grupos amina, poli (anhídridos), polifosfacenos, vidrio bioactivo y derivados de fosfato de calcio. También se pueden usar polímeros biodegradables que comprenden biopolímeros naturales como alginato, quitosana, fibrina, fibronectina, derivados de hialuronano y colágeno. Los polímeros sintéticos biodegradables pueden incluir derivados tales como la policaprolactona, ácido poliglicólico, ácido poliláctico y ácido poliláctico coglicólico y poli tartónico.

La plataforma es preferiblemente porosa, con un tamaño de poro de entre 50 micrómetros y 2000 micrómetros. Se encontró que este intervalo era adecuado de acuerdo con los experimentos realizados por uno o más de los inventores, de modo que los poros que son más pequeños que 50 micrómetros no permiten que las células entren; los poros de más de 2000 micrómetros no brindan suficiente soporte para la plataforma 3D.

Los implantes deben tener resistencia mecánica y requieren una estructura más rígida que presumiblemente no sea inyectable. Opcionalmente, el implante puede tener una forma previa del tamaño y la estructura precisos del espacio entre los tejidos y puede estar listo para el trasplante en la lesión a reparar. Opcionalmente, el implante puede ser inyectable y servir como carga. Como carga, los cultivos 3-B pueden estar opcional y preferiblemente en forma inyectable, como un gel, semisólido o polvo, por ejemplo.

Ejemplos

Materiales y métodos

Biorreactor: El biorreactor utilizado de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención se construyó de acuerdo con el diseño mostrado en la Figura 1, y se describe en detalle anteriormente.

La cristalería fue diseñada y fabricada por los inventores y conectada por tubos de silicona (Degania, Israel).

Los platos de las células se rotaron durante la noche en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Beit Ha'Emek Industries, Israel) sin Ca^{2+} y Mg^{2+} , seguido de la eliminación del PBS y los desechos liberados.

Cada columna se cargó con 10 ml del plato empaquetado. El biorreactor se cargó con PBS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} , todas las salidas se sellaron y el sistema se esterilizó en autoclave (120 °C, 30 minutos). El PBS se eliminó mediante un recipiente [8] y el biorreactor se hizo circular en una incubadora a 37 °C con 300 ml de medio con alto contenido de glucosa de Dulbecco (DMEM; GIBCO BRL) que contenía suero de ternera fetal inactivado por calor al 10 % (FCS; Beit Ha'Emek Industries, Israel) y una mezcla de Pen-Strep-Nystatin (100 U/ml: 100 µg/ml: 1,25 µn/ml; Beit Ha'Emek), por un período de 48 horas. El medio circulante se reemplazó con DMEM nuevo que contenía lo anterior y 2 mM de L-glutamina (Beit Ha'Emek).

Células estromales/MSK: Los cultivos primarios estromales y MSC de médula humana se establecieron a partir de médula estromal aspirada de donantes sanos hematológicos sometidos a cirugía a corazón abierto. En variante, se establecieron cultivos estromales y MSC a partir de placenta o tejidos adiposos.

Las células estromales derivadas de médula ósea -, los aspirados de médula se diluyeron 3 veces en solución de sales equilibradas de Hank (HBSS; GIBCO BRL) y se sometieron a centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Robbins Scientific Corp. Sunnyvale, CA). Las células mononucleares de médula (<1,077 gm/cm³) se colectaron, se lavaron 3 veces en HBSS y se resuspendieron en medio de cultivo a largo plazo (LTC), que consiste en DMEM (Beit Ha'Emek) suplementado con 12,5 % de FCS, 12,5 % de suero de caballo (Beit Ha'Emek), 10⁻⁴M de β-mercaptoetanol (Merck) y 10⁻⁶ mol/l de succinato de sodio de hidrocortisona (Sigma). Las células se incubaron en matraces de cultivo de tejidos de 25 ml (Corning) durante 3 días a 37 °C (5 % de CO₂) y luego durante 3 días a 33 °C (5 % de CO₂) con realimentación de cultivo semanal. Se emplearon células estromales de donantes individuales para cada biorreactor. Los cultivos de células estromales primarios se dividieron por tripsinización (tripsina al 0,25 % y EDTA en solución salina A de Puck; Beit Ha'Emek) cada 10 días, para permitir una expansión celular suficiente. Los cultivos se mantuvieron a 33 °C-37 °C en medio LTC.

Las células estromales derivadas de placenta - Las partes internas de una placenta de nacimiento a término (centro médico Bnei Zion, Haifa, Israel) se cortaron en condiciones estériles, se lavaron 3 veces con tampón de Hank y se incubaron durante 3 h a 37 °C con colagenasa al 0,1 % (tejido de 1 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Lewis, MO). Usando un pipeteo suave, las células suspendidas se lavaron con DMEM suplementado con FCS al 10 %, mezcla de Pen-Strep-Nystatin (100 U/ml: 100 µg/ml: 1,25 un/ml) y L-glutamina 2 mM, sembradas en matraces de 75 cm² e incubados a 37 °C en una incubadora de cultivo de tejidos en condiciones humidificadas con 5 % de CO₂. Posteriormente, se permitió que las células se adhirieran a una superficie de plástico durante 72 horas, después de lo cual se cambió el medio cada 3-4 días. Al alcanzar el 60-80 % de confluencia (generalmente a los 10-12 días), las células se separaron del matraz de crecimiento usando 0,25 % de tripsina-EDTA y se sembraron en nuevos matraces. Las células cultivadas se colectaron posteriormente para análisis o para cultivo en biorreactores.

Las células estromales derivadas del tejido adiposo - Las células del estroma se obtuvieron del tejido adiposo humano de los procedimientos de liposucción (Rambam Haifa, Israel). El tejido adiposo se lavó extensivamente con volúmenes iguales de PBS y se digirió a 37 °C durante 30 minutos con colagenasa (20 mg/ml). Luego, las células se lavaron con DMEM que contenía FCS al 10 %, una mezcla Pen-Strep-Nystatin (100 U/ml: 100 µg/ml: 1,25 un/ml) y L-Glutamina y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, se resuspendieron con solución de lisis (1:10; Biological Industries, Beit Ha'emek, Israel, para descartar glóbulos rojos) centrifugada y resuspendida con DMEM que contiene 10 % de FCS, mezcla de Pen-Strep-Nystatin (100 U/ml: 100 µg/ml: 1,25 un/ml) y L-glutamina. Las células lavadas se sembraron en un matraz de cultivo de tejido medio estéril a 3-10⁷

células/matraz. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS para eliminar los glóbulos rojos residuales y las células muertas. Las células se mantuvieron a 37 °C en una incubadora de cultivo de tejidos en condiciones humidificadas con 5 % de CO₂. El medio se cambió cada 3 a 4 días. Con una confluencia del 60-80 %, las células se separaron del matraz de crecimiento usando 0,25 % de tripsina-EDTA (Beit Ha'Emek) y se sembraron en nuevos

matraces.
Siembra de MSC en los cultivos tridimensionales: Las MSC de 3-5 semanas se tripsinizaron y las células se lavaron 3 veces en HBSS, se resuspendieron en el medio de biorreactor (véase más arriba), se contaron y sembraron a 10⁶ células/ml en volúmenes de 10 ml a través de un punto de inyección ([4], Figura 1) en platos tridimensionales de 10-100 ml en la columna de vidrio del biorreactor. Inmediatamente después de la siembra, la circulación se detuvo durante 0,25-24 horas para permitir que las células se depositen en los platos. El crecimiento celular en el biorreactor se controló analizando la demanda de glucosa de los cultivos y eliminando los platos y la enumeración celular mediante el procedimiento del MTT (56). Cuando los cultivos de células eran confluentes, el medio se reemplazó con medio LTC.

Aislamiento de células hematopoyéticas CD34+: Se tomaron muestras de sangre del cordón umbilical (CB), BM y sangre periférica en condiciones estériles y se fraccionaron en Ficoll-Hypaque y se colectaron las células mononucleares flotantes (<1,077 gr/cm³). Las células se incubaron con anticuerpos anti-CD34 y se aislaron mediante midi MACS (Milteny Biotech).

Aislamiento de células endoteliales: Las células endoteliales en cultivo se colectaron de sangre periférica. Las células mononucleares del revestimiento leucocitario a partir de 50 o 100 ml de sangre se resuspendieron en medio EGM-2 (Clonetics Inc, EE. UU.) sin procedimientos adicionales de enriquecimiento de subpoblación celular y se colocaron en placas recubiertas con colágeno tipo I (Becton Dickinson, EE. UU.). La placa se incubó a 37 °C en un ambiente humidificado con 5 % de CO₂. El medio de cultivo se cambió a diario. Después de 24 horas, las células y los restos no unidos se eliminaron lavando con medio. Este procedimiento deja las células endoteliales unidas, como se identifica por la morfología y la tinción con el anticuerpo monoclonal anti-endotelial P1H12, más otras células mononucleares que se extinguieron dentro de las primeras 2-3 semanas de cultivo.

Las células se mantuvieron a 37 °C en una incubadora de cultivo de tejidos en condiciones humidificadas con 5 % de CO₂. El medio se cambió cada 3 a 4 días. Con una confluencia del 60-80 %, las células se separaron del matraz de crecimiento usando 0,25 % de tripsina-EDTA y se sembraron en nuevos matraces recubiertos con 50 µg/ml de fibronectina (Sigma) como sustrato.

Cocultivos MSC-HSC: Se sembraron células CD34+ derivadas de CB aisladas en números equivalentes (aproximadamente 5x10⁵) en monocapa o biorreactor que contiene densidades equivalentes de MSC confluentes. Tras la adición al biorreactor, el flujo del medio se detuvo durante 0,25-16 horas para permitir el contacto con las MSC y se reinició a una velocidad de 0,1-1,0 ml por minuto. Se eliminaron los platos de células CD34+ de MSC sembradas para estudios de control en ausencia de intercambio de medio. Los cocultivos se mantuvieron en medio de crecimiento, con o sin citocinas. En varios momentos (hasta 4 semanas), se colectaron células no adherentes de sobrenadantes de monocapa o de medio de cultivo circulante a través de un recipiente ([8], Figura 1). Las células adherentes se colectaron mediante tripsinización secuencial y exposición a tampón de disociación basado en EDTA (GIBCO BRL), seguido de un pipeteo suave de las células. Para evitar la presencia de MSC en la suspensión resultante, las células se resuspendieron en HBSS + 10 % de FCS y se sometieron a un procedimiento de adhesión de 60 minutos en placas de cultivo de tejidos plásticas (Corning), a 37 °C.

Diferenciación del cultivo osteogénico: La formación final del tejido óseo se ejecuta en medio de diferenciación de cultivo osteogénico compuesto por una o más de las siguientes moléculas en concentración preferida: dexametasona (10-200 nM) (Sigma), β-glicerofosfato de sodio (5-25 mM) (Sigma), 1,25 dihidroxicolecalciferol (calcitriol: 5-50 nM) (Sigma) y ácido L-ascórbico-2-fosfato (10-500 nM) (Sigma).

Diferenciación de condrocitos: Las células esenquimales se sembraron en una concentración de 2·10⁵ células/tubo - células suspendidas en 1 ml de medio con cóctel condrogénico: DMEM HG, BMP-6 [500 ng/ml] (Sigma), TGF-β3 [10 ng/ml] (Sigma), premezcla ITS + [dil.: 20 de la dil. Stock (:100)] (Sigma), Dexametasona [100 nM] (Sigma), ácido L-ascórbico 2-fosfato [50 mg/ml] (Sigma), piruvato de sodio [100 mg/ml] (Sigma), Prolina [40 mg/ml] (Sigma), Pen/Strep/Nys al 1 %, glutamina al 1 %. El medio debe reemplazarse cada 2 días, durante 21 días. Después de 21 días de diferenciación, el cultivo se tiñó con azul Alcian (Sigma). Procedimiento de tinción: Fijación: secciones de tejido embebidas en parafina fijadas con formalina. Desparafinar las láminas e hidratarlas en agua destilada. Se tiñe en una solución de azul alcian durante 30 minutos. Lavar en agua. Contratinción en solución roja rápida nuclear durante 5 minutos. Deshidrate a través de alcohol al 95 %, 2 cambios de alcohol absoluto, 3 minutos cada uno.

Ejemplo 1: Crecimiento de cultivos tridimensionales de MSC y osteoblastos en el sistema de flujo (para referencia)

El ejemplo 1 describe los experimentos de expansión típicos para el cocultivo de estos componentes, pero con la adición de los componentes en momentos separados.

En un experimento, se sembraron 30.000 MSC derivadas de BM en cada plato y el sistema se cultivó durante 50 días. Los resultados se muestran en la Figura 2A. Durante las primeras seis semanas, no se observó expansión celular, pero la semana siguiente se caracterizó por una extensa proliferación celular. Al final del período de 50 días, la expansión se midió a 2,8 veces (total de 85.000 células/plato). A continuación se sembraron 10.000 células CD34+ derivadas de CB en el sistema del cual las HSC tempranas (CD34+38-45+) contaba solo con 2.500 células (relación de MSC a HSC en el

momento del establecimiento del cocultivo). Catorce días después, en el momento de la recolección, se demostró que las células MSC se expandían por un factor adicional de 2. Durante el mismo período de tiempo, el número de HSC en este sistema se incrementó en 42 veces.

5 En el segundo experimento, se sembraron 42.000 MSC derivadas de BM en cada plato. Los resultados se muestran en la Figura 2B. Se observó una caída inicial del recuento de estroma, que persistió durante 24 días. Luego se sembraron 9.400 células CD34+ en cada plato y se permitió que el cultivo continuara durante 13 días adicionales. Al final de este período, hubo un aumento neto del 20 % en el número de MSC, mientras que el HSC se expandió en un 90 %.

10 Estos resultados muestran que al variar el período de expansión inicial del monocultivo de estroma y la proporción de MSC CD34+ sembradas en el momento del establecimiento del sistema de cocultivo, se podría lograr un control sobre la mezcla celular final. Esta es una capacidad deseada donde las demandas de resistencia y elasticidad del material óseo pueden variar.

15 La **figura 3** muestra las micrografías del microscopio electrónico de barrido (SEM) y confocales de una plataforma sintética tridimensional sembrada con MSC en sistemas de flujo estático y de cultivo:

(A) Micrografía SEM de MSC humanas sembradas en una plataforma 3D;

20 (B) Imagen confocal de MSC humanas sembradas en una plataforma 3D. Se ven numerosas células alargadas en toda la plataforma. Observe la autofluorescencia de las fibras de la plataforma (verde: Imagen confocal del cultivo estático X10).

(C) SEM de la plataforma cultivada con MSC humanas en el sistema de crecimiento de flujo dinámico. Obsérvese la distribución celular densa y la matriz celular adicional, así como la estructura de malla tridimensional distinta de las células que contiene la plataforma que están alineadas a lo largo y entre las fibras.

25 (D) Imagen de proyección del microscopio confocal de las MSC humanas cultivadas en una plataforma tridimensional en un sistema de flujo dinámico. Se ven numerosas células alargadas en toda la plataforma. Obsérvese el citoplasma celular (azul) y los núcleos (rojo).

30 La **figura 4** muestra imágenes de microscopía óptica de la plataforma que contiene células mesenquimales después del implante subcutáneo *in vivo* en un ratón desnudo:

(A) El implante parece estar completamente integrado con los tejidos circundantes. Se observa una distribución celular densa y una matriz que contiene vasos sanguíneos infiltrados (flechas).

35 (B) Un aumento mayor de la figura anterior que muestra la unión de las células a las nanofibras y los vasos sanguíneos que contienen eritrocitos dentro de la plataforma (flechas).

Ejemplo 2: Diferenciación de MSC a osteoblastos.

40 Este ejemplo se refiere a cultivos 2D y 3D de células MSC que luego se diferencian en preosteoblastos y osteoblastos. El cultivo 3D es similar al Ejemplo 1, excepto que las células componentes se colocan juntas simultáneamente en cultivo.

45 La formación final del tejido óseo se ejecuta en medio de diferenciación de cultivo osteogénico compuesto por una o más de las siguientes moléculas en concentración preferida: dexametasona (10-200 nM) (Sigma), β-glicerofosfato de sodio (5-25 mM) (Sigma), 1,25 dihidroxicolecalciferol (calcitriol: 5-50 nM) (Sigma) y ácido L-ascórbico-2-fosfato (10-500 μM) (Sigma).

50 La **figura 5** muestra una imagen de microscopía óptica de cultivos de MSC, 7 días después de inducir la diferenciación a osteoblastos.

La **figura 6** muestra la diferenciación de MSC a preosteoblastos y osteoblastos, y el análisis del espectro EDS de elementos en concentración molar en cultivos de MSC después de 3 semanas de crecimiento.

Ejemplo 3: Cocultivo de células osteoprogenitoras y células endoteliales (para referencia)

55 Las células osteoprogenitoras (OS) y las células endoteliales (C) se cultivaron conjuntamente en una plataforma tridimensional para inducir la osteogénesis. *in vitro*.

60 Las células osteoprogenitoras derivadas de MSC de médula ósea (OS) (50.000 células/pocillo de placa de cultivo de 24 pocillos) se colocaron en placas solas o se cultivaron conjuntamente con células endoteliales (EC) (2.000 células/pocillo de placa de cultivo de 24 pocillos), en una plataforma de hidrogel tridimensional en un medio MEM que contiene suplementos osteogénicos, hasta por 21 días. Las células endoteliales se cultivaron solas de manera similar.

65 El efecto de las células endoteliales en el patrón de diferenciación de las células osteoprogenitoras para el linaje osteogénico fue seguido por Alizarin Red S, tinción para la demostración de depósitos de calcio y por osteocalcina en inmunotinción para demostrar la síntesis de macromoléculas específicas del hueso.

Los resultados en las **figuras 7-9** demuestran la diferencia en la actividad proliferativa de estos dos tipos de células. Por lo tanto, cuando se cultivan solas, las células osteoprogenitoras proliferan a una velocidad menor que las células endoteliales. Además, esos resultados prueban que la diferenciación osteogénica progresó solo cuando una gran cantidad de células (cerca de la confluencia) estaban presentes en el sistema de cultivo. Por lo tanto, en comparación con las células endoteliales, se necesitaba un mayor número de osteoprogenitores para el cultivo.

Para poder cocultivar estos dos tipos de células juntos, se utilizaron dos enfoques:

A: Las células osteoprogenitoras se cultivaron desde el principio en un número mayor (50.000 células/grupo) y las células endoteliales se sembraron en placas en números más bajos (2.000 células/grupo).

B: Las células osteoprogenitoras se sembraron primero y solo después de 7 días (cuando aumentaron sus números) las células endoteliales se agregaron al cultivo. Este enfoque fue crucial en la técnica de cultivo dinámico de microesferas tridimensionales, ya que las células osteoprogenitoras formaron puentes entre las microesferas y causaron su coalescencia formando un coágulo, antes de la siembra de las células endoteliales (durante una semana adicional)

La **figura 7** muestra una vista microscópica de un cocultivo tridimensional que contiene ambos tipos de células (células osteoprogenitoras y células endoteliales) después de 7 y 14 días en cultivo, lo que demuestra que la cantidad de células aumentó en el cultivo de 7 a 14 días.

Las células osteoprogenitoras y las células endoteliales se cultivaron conjuntamente durante 3, 7, 10, 14 días en una plataforma de hidrogel tridimensional, teñidas con tinción con Alizarin Red S, para depósitos de calcio.

Como se muestra en la **figura 8**, la combinación de células osteoprogenitoras y células endoteliales provocó la inducción de tinción con rojo Alizarina S en cultivos que contienen ambos tipos de células después de 14 y 21 días, en comparación con los cultivos control con células osteoprogenitoras solamente. Este resultado indica la deposición inducida de calcio en la combinación de cocultivo tridimensional. Obsérvese el aumento gradual de la tinción con rojo de alizarina en el cocultivo después de 10 y 14 días. Las células osteoprogenitoras y las células endoteliales se cultivaron conjuntamente durante 7 y 14 días en una plataforma de hidrogel.

La **figura 9** muestra que la inmunotinción positiva para la osteocalcina fue mayor en cocultivos de osteoprogenitores y células endoteliales después de 14 días en cultivo, lo que indica la síntesis de macromoléculas específicas de hueso. Observe la tinción después de 14 días en el cultivo (indicado por flechas)

Los resultados mostrados en las Figuras 8 y 9 indican que la combinación tridimensional de los dos tipos de células aumentó la deposición de calcio, lo que indica una diferenciación osteogénica mejorada que incluye mineralización, mediante alizarina S roja, y promovió la síntesis de macromoléculas positivas para osteocalcina específicas para hueso.

Ejemplo 4: Crecimiento del cocultivo tridimensional de células osteoprogenitoras y células endoteliales (para referencia)

Las células osteoprogenitoras (OS) y las células endoteliales (C) se cultivaron conjuntamente en una plataforma de hidrogel tridimensional para inducir la osteogénesis *in vitro*.

Las células osteoprogenitoras (OS) derivadas de MSC de médula ósea se sembraron en cocultivo con células endoteliales (EC), en una plataforma tridimensional en medio α -MEM que contiene suplementos osteogénicos, durante hasta 21 días.

La viabilidad celular fue seguida por marcadores fluorescentes de vivas/muertas. Las células osteoprogenitoras se marcaron previamente con CFDA (fluorescencia verde) y las células endoteliales se marcaron previamente con Hoechst (fluorescencia azul). Las células osteoprogenitoras (50.000 células/construcción) se sembraron primero en una plataforma de hidrogel de microesferas en cultivo dinámico durante hasta 7 días (Figura 10), seguido de la siembra de las células endoteliales (2.000 células/construcción) durante 7 días adicionales.

Las células cultivadas en la plataforma de hidrogel tridimensional se tiñeron con un reactivo marcador de células: Diacetato de carboxifluoresceína succinimidil éster (CFDA SE). El CFDA SE no fluorescente se difunde en las células y tras la escisión por esterasas intracelulares se vuelve fluorescente, lo que indica células proliferativas viables. La tinción de Hoechst penetra en los núcleos celulares y permite la detección de células viables en el cultivo.

La **figura 10** demuestra una visión general de la construcción de microesferas tridimensionales cargadas con células osteoprogenitoras y endoteliales. Las dos poblaciones celulares, los osteoprogenitores y las células endoteliales, eran viables en la plataforma y pueden usarse para implantes *in vivo*. Las microesferas de la plataforma se sembraron primero con células osteoprogenitoras (marcadas previamente con CFDA, verde) y luego se sembraron con ECS (marcadas previamente con Hoechst, Blue). La Figura 10 también muestra la interacción entre el cocultivo de la célula Osteoprogenitora (CFDA, verde) y las células Endoteliales (Hoechst, azul) cultivadas en la construcción de microesferas

(1 semana; cultivo dinámico) demostrando la alta densidad de células viables osteoprogenitoras y endoteliales y la co-localización de células endoteliales y osteoprogenitores sembradas en la plataforma de microesferas (superposición de los colores verde y azul).

5 **Ejemplo 5: Crecimiento del cocultivo tridimensional de osteoblastos y condrocitos (para referencia)**

Una de las primeras necesidades de injertos de cartílago óseo son las lesiones del cartílago de la articulación de la rodilla. Las lesiones en la rodilla no son infrecuentes tanto entre los atletas profesionales como entre los entusiastas deportivos no profesionales activos; y los incidentes de trauma de rodilla también se encuentran entre los resultados desafortunados causados por accidentes de todo tipo. Hay un gran grupo de pacientes que necesitan una solución para el cartílago de la rodilla dañado.

El trasplante de aloinjerto es un procedimiento convencional para tratar tales lesiones. Las ventajas del trasplante de aloinjerto incluyen buenos resultados durante un período de tiempo más largo después de la cirugía y el hecho de que este tratamiento se puede aplicar a un espectro más amplio de pacientes. Sin embargo, la falta de donantes y la falta de disponibilidad de estos injertos, la viabilidad necesaria de los condrocitos y los osteoblastos, así como la cuestión de seguridad con respecto al tejido donante suministrado y la necesidad de cumplir los requisitos específicos del sitio (tamaño, forma, grosor del cartílago), limitan el uso de esos tejidos.

El uso de prótesis de reemplazo de cartílago óseo y crecimiento de implantes de cartílago óseo basados en células *in vitro* puede permitir la creación de injertos osteoarticulares, que comprenden implantes consistentes en cartílago hialino unido al hueso. Este complejo injerto puede ser cultivado *in vitro*, mantenido congelado y almacenado por períodos de tiempo indefinidos. El injerto óseo de cartílago recibido después de la descongelación contiene un alto nivel de condrocitos viables. Este enfoque permitirá el crecimiento y el suministro de tejido compatible, seguro y disponible. La capacidad de crecer y criopreservar injertos de cartílago también proporciona una forma de almacenar el tejido creado *in vitro* a largo plazo, creando así un banco de varias formas, tamaños y otras características específicas que incluyen la edad del donante, el grosor del cartílago, etc. Los implantes de cartílago óseo basados en células pueden suministrar un tejido más seguro para el trasplante, reducir el tiempo de espera para un donante apropiado y permitir una mejor coincidencia de la forma y el tamaño del tejido para una mejor reparación.

Para lograr este objetivo, los tapones de aloinjerto osteocondral tridimensional, hechos de implantes osteogénicos, se tratan en un lado para inducir el crecimiento del tejido del cartílago. La fase de crecimiento final en el lado del tapón se estimula hacia la diferenciación de los condrocitos utilizando un factor de crecimiento como, entre otros, TGF-beta (**Sigma**) BMP (**Sigma**) retinoides (**Sigma**), FGFs (**Sigma**) GH (**Sigma**), IGF (**Sigma**) y transferrina (**Sigma**). Después del crecimiento del cartílago, los tapones de aloinjerto se procesan, se criopreservan y se almacenan listos para usar. Cuando es necesario, los tapones se descongelan en el escenario de operación antes del trasplante y se trasplantan utilizando una técnica de ajuste a presión.

La **figura 11** demuestra la capacidad de las células mesenquimales tridimensionales expandidas *ex vivo* para diferenciar *in vitro* en condrocitos maduros.

45 **Ejemplo 6: trasplante del cocultivo tridimensional de células osteoprogenitoras y células endoteliales (para referencia)**

Para aumentar aún más el potencial osteogénico de los implantes basados en plataformas, se usó un enfoque de terapia celular para incorporar células osteoprogenitoras derivadas de células estromales mesenquimales (MSC) de médula ósea en la plataforma para mejorar la reparación ósea. Las células osteoprogenitoras (OS) y las células endoteliales (CE) se cultivaron conjuntamente en las plataformas tridimensionales *in vitro*. Los resultados presentados en las Figuras 12-16 se validaron mediante el uso de marcadores osteogénicos específicos que demuestran que los cultivos de un número suficiente de células osteogénicas, células endoteliales y factores de crecimiento podrían utilizarse con plataformas para la ingeniería de tejido óseo para reparar la pérdida ósea en el envejecimiento y en trasplante óseo (Figura 15).

Los presentes inventores han demostrado que los procedimientos utilizados para la selección *in vitro* de la subpoblación osteogénica de los cultivos de MSC y los procedimientos utilizados para incorporarlos en la plataforma son cruciales para los trasplantes exitosos para su uso futuro en la reparación ósea de ingeniería de tejidos. Los presentes inventores también han demostrado que la plataforma es preferiblemente biocompatible para células osteogénicas seleccionadas y proporciona soporte para la proliferación y diferenciación.

La plataforma es opcional y preferiblemente biocompatible, osteoconductor, biodegradable y osteoinductivo, pero no inmunorreactivo. Las plataformas tridimensionales proporcionan el soporte necesario para que las células proliferen y mantengan su capacidad de diferenciarse.

La transición de un sistema de cultivo bidimensional a la plataforma tridimensional proporciona un sistema que imita la estructura tridimensional natural de los tejidos del cuerpo y específicamente la estructura del hueso. Las plataformas tridimensionales que contienen osteoprogenitores derivados de MSC y células de soporte adicionales se pueden

emplear dentro de los trasplantes para mejorar la reparación ósea. La construcción compleja pretende imitar el microambiente nativo *in vivo* y esto requiere la construcción de plataformas bioactivas que también sean capaces de soportar la vascularización, así como la proliferación celular y la diferenciación osteogénica.

5 Las pruebas preclínicas en animales desarrolladas por los presentes inventores son un paso crucial antes de la realización de los ensayos clínicos reales y finalizaron las pruebas preclínicas destinadas a validar la funcionalidad de las células trasplantadas, sus parámetros de seguridad y la evaluación de la no inmunorreactividad de las células o la plataforma en las construcciones de plataforma de células trasplantadas diseñadas. Las pruebas con animales *in vivo* descritas constituyen un paso intermedio entre los estudios *in vitro* y las aplicaciones clínicas en seres humanos, y son cruciales para demostrar la funcionalidad de las construcciones de las plataformas celulares diseñadas.

10 La **Figura 12** demuestra el modelo de animal pequeño desarrollado y utilizado por los presentes inventores en los estudios preclínicos de animales pequeños (ratones y ratas). Los métodos disponibles incluyen el uso de un dispositivo de fijación externo para realizar un defecto de tamaño crítico (CSD) en un hueso largo que no cicatriza. Como lo demuestra la Figura 12, luego de la creación de un defecto crítico y la fijación externa del hueso, el defecto óseo no se cura por más de 3 meses.

15 Las **Figuras 13-14** demuestran otros modelos animales de brecha crítica utilizados por los presentes inventores para estudiar la reparación ósea, incluidos los defectos del segmento óseo realizados en la tibia de la rata y el defecto óseo de tres paredes realizado en la mandíbula de la rata. Ambos modelos probados por los presentes inventores han demostrado una reparación ósea completa y exitosa dentro de las 6 semanas posteriores al nuevo trasplante óseo desarrollado *in vitro*.

20 Las **Figuras 15-16** demuestran el uso de cepas de ratones inmunodeficientes (Desnudos, SCID/NOD) para analizar células humanas trasplantadas. Los ratones se trataron con trasplantes de implante óseo (modelo animal ortotópico). La Figura 15 demuestra la reparación completa del defecto como se muestra por rayos X, histología y μ CT. La Figura 16 demuestra construcciones de plataforma celular de MSC marcadas con GFP cultivadas en plataformas 3D y trasplantadas por vía subcutánea/intramuscular (modelos animales ectópicos), revelando la formación de hueso nuevo y la formación de vasos sanguíneos en el animal trasplantado.

25 **Ejemplo 7: Prueba del modelo de reparación ósea de brecha crítica *in vivo***

La presente invención, en al menos algunas realizaciones, se refiere generalmente a la creación de defectos de tamaño crítico (CSD) en huesos de animales, incluidos seres humanos, usando fijadores óseos externos.

30 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un sistema de fijación externo para crear un CSD en un hueso largo de un animal, el sistema comprende un marco compuesto de al menos dos pasadores para inserción percutánea desde el lado lateral al medial de dicho hueso espaciado en una distancia mayor que la longitud del CSD; y al menos un puente moldeable para la fijación de dichos pasadores uno con respecto al otro y sobre dicho hueso de manera que se evite que los pasadores tengan un desplazamiento longitudinal o rotacional con respecto a dicho hueso y uno con respecto al otro.

35 Los pasadores se insertan perpendicularmente o con un cierto ángulo con respecto al eje largo del hueso y están adaptados para ser lo suficientemente largos como para sobresalir más allá de las cortezas opuestas del mismo. En este caso, se utilizan dos puentes moldeables para la fijación en los lados lateral y medial del hueso.

40 Cualquiera o más de las siguientes características pueden incluirse en el sistema de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, el sistema puede comprender además 4 pasadores, dos de ellos posicionados en el tercio superior del hueso, y los otros dos están posicionados en el tercio inferior del hueso, con un CSD entre ellos. En este caso, el sistema puede comprender además más de un puente, y cada puente fijo un par de clavijas (una clavija desde el tercio superior del hueso y otra clavija desde el tercio inferior del hueso).

45 Cada par de clavijas se puede insertar perpendicularmente o con un cierto ángulo con respecto al eje largo del hueso. El sistema puede comprender cualquier número par o impar de pines. El puente puede estar hecho de materiales acrílicos de endurecimiento rápido, como la pasta acrílica dental. El sistema es adecuado para animales pequeños como ratones, así como para animales más grandes como caballos, vacas, toros y otros animales de importancia agrícola, o incluso seres humanos.

50 Se puede proporcionar un kit que comprende el sistema de fijación externo para la creación de un CSD en un hueso largo de un animal, el sistema comprende un marco compuesto de al menos dos pasadores para la inserción percutánea desde el lado lateral al medial de dicho hueso separados en una distancia mayor que la longitud del CSD; y al menos un puente moldeable para la fijación de dichos pasadores entre sí y sobre dicho hueso de manera que se evite que los pasadores tengan un desplazamiento longitudinal o rotacional con respecto a dicho hueso y entre sí; y un molde hecho de material flexible para posicionar y fijar temporalmente una extremidad del animal para permitir la posición deseada del mismo. El molde es blando y puede estar hecho de silicio semirrígido.

Se puede proporcionar un procedimiento para la creación de un defecto de tamaño crítico (CSD) en un hueso largo de un animal, el procedimiento comprende: proporcionar un sistema de fijación externo que comprende un marco compuesto de al menos dos pasadores y un puente moldeable al menos; colocación y fijación temporal de una extremidad con un molde flexible del animal para permitir la posición deseada de la misma, en la que no se produce

5

daño a los vasos sanguíneos y nervios de la extremidad del animal; inserción percutánea de dichos pasadores desde el lado lateral al medial de dicho hueso en una distancia mayor que la longitud del CSD; fijación de dichos pasadores con dicho puente moldeable uno con respecto al otro y sobre dicho hueso de manera que se evite que los pasadores tengan un desplazamiento longitudinal o rotacional con respecto a dicho hueso; e inducción de la CSD.

10

En caso de que se usen dos puentes moldeables para la fijación en los lados lateral y medial del hueso, como se describió anteriormente, el molde se retira antes de la fijación de los pasadores en el lado medial del hueso.

15

Además de crear un CSD, el procedimiento de acuerdo con la presente invención puede usarse para crear fracturas, fracturas parciales e inmovilizaciones de huesos y articulaciones de animales (entre fémur y tibia).

Aunque el ejemplo detallado a continuación se centra en los ratones como un animal modelo de prueba, de hecho, el sistema y el procedimiento pueden ser adaptados para cualquier animal más grande por un experto en la materia.

La **Figura 17** ilustra un sistema de fijación externo generalmente designado **110** para crear un defecto de tamaño crítico (CSD) **130** en un hueso largo **150** de un animal (no mostrado), que tiene un lado lateral **140** y un lado medial **160**. El sistema está diseñado para usarse con animales pequeños, pero también está adaptado para usarse con animales grandes. El sistema comprende un primer par de pines **170** y un segundo par de alfileres **190**, sobresaliendo tanto del lateral **140** y el medial **160** lados del hueso **150**, posicionado en relación paralela a los lados derecho e izquierdo del CSD **130**. La primera y la segunda pareja de alfileres **170** y **190** están espaciados a una distancia mayor que la longitud del CSD. Los alfileres **170** y **190** están fijados sobre el hueso **150** y uno con respecto al otro con un puente lateral moldeable **100** y un puente moldeable medial **120**, para evitar que se muevan de forma longitudinal o rotacional con respecto al hueso **150** y con respecto el uno al otro. Los puentes moldeables **100** y **120** pueden estar hechos de materiales acrílicos de endurecimiento rápido, como pasta dental acrílica, y junto con los alfileres crean un marco con un peso de no más de 1 gr.

20

25

30

Las **Figuras 18 a 21** ilustran esquemáticamente un procedimiento de creación de CSD en un fémur de ratón **27**.

Las **Figuras 18A y 18B** demuestran la primera etapa del procedimiento. Esta etapa es el posicionamiento temporal y la fijación de la extremidad **21** (compuesto por el fémur **20** y la tibia **22**) del ratón con un molde de silicona semirrígido **23**. El molde **23** es suave y se endurece lentamente, manteniendo así la extremidad **21** en una posición deseada.

35

La **Figura 19** demuestra la segunda etapa del procedimiento. Esta etapa es la inserción percutánea de alfileres **31** (p. ej. agujas comerciales 25G) desde el lado lateral **30** al lado medial **32** del fémur **20** agujeros pasantes (no mostrados que fueron perforados manualmente por un taladro del diámetro correspondiente (0,3 mm) de cada lado del fémur **20**. Después de la inserción de los pasadores **31**, primero se fijan con el puente lateral moldeable **100** en el lado lateral **30** del fémur **20**. Entonces, el molde de silicio **23** se retira y los pasadores se fijan con el puente moldeable medial **120** en el lado medial **32** del fémur **20**.

40

La **Figura 20** demuestra la tercera etapa del procedimiento en el que los pines **31** ya están fijados con ambos puentes moldeables **100** y **120** y el molde de silicio **23** es removido.

45

La **Figura 21** demuestra que la última etapa del procedimiento es inducir la CSD. Cuando los alfileres **31** ya están fijos sobre el fémur **20**, el CSD **33** de aproximadamente 2 mm se induce entre los pasadores **31**.

50

Las figuras 19 y 20 ilustran otras realizaciones del sistema de fijación externo **110** para crear un CSD **60** en un hueso largo **62**. El sistema **110** comprende un primer par de pines **61a** y **61b** fijado con los primeros puentes moldeables **63** y un segundo par de pines **65a** y **65b** (se muestra en la Figura 19B) fijado con los segundos puentes moldeables **67**. Los alfileres **61a** y **65a** se colocan en el lado derecho de la CSD **60** y los alfileres **61b** y **65b** se colocan en el lado izquierdo de la CSD **60**. Como se muestra en la Figura 19A, el primer par de pines **61a** y **61b** es paralelo al eje z, por lo que los puentes **63** son paralelos al eje y (que es el eje largo del hueso **62**). El segundo par de alfileres **65a** y **65b** es paralelo al eje x, por lo que los puentes **67** son paralelos al eje y del hueso. Los pares de pines no necesariamente tienen que ser paralelos a uno de los ejes principales x, y o z, como se muestra en la Figura 19B, en la que el segundo par de pines **65a** y **65b** se coloca en un cierto ángulo con respecto al plano xy.

55

Una vez que se completa el procedimiento de fijación, se induce un CSD de aproximadamente 3,5 mm entre los pasadores utilizando un motor de perforación.

60

Se aprecia que ciertas características de la invención, que son, para mayor claridad, descritas en el contexto de realizaciones separadas, pueden proporcionarse además en combinación en una sola realización. Por el contrario, varias características de la invención que son, por razones de brevedad, descritas en el contexto de una sola realización, pueden proporcionarse además por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como sea

65

adecuado en cualquier otra realización de la invención descrita. Ciertas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización no sea operativa sin esos elementos.

5 En la medida en que se usan encabezados de sección, no deben interpretarse como necesariamente limitantes.

Referencias

- 10 Aggarwal S, Pittenger MF. 2005 Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 105:1815-22.
- Bielby RC, Boccaccini AR, Polak JM, Buttery LD. 2004 In vitro differentiation and in vivo mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells. *Tissue Eng*. 10:1518-25.
- Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. 1998a The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*. 80:985-96.
- 15 Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. 1998b Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 16:155-62.
- Buttery LD, Bourne S, Xynos JD, Wood H, Hughes FJ, Hughes SP, Episkopou V, Polak JM. 2001 Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng*. 7:89-99.
- Chakrabarti S, Mautner V, Osman H, Collingham KE, Fegan CD, Klapper PE, Moss PA, Milligan DW. 2002 Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery. *Blood*. 100:1619-27.
- 20 Cinotti G, Patti AM, Vulcano A, Della Rocca C, Polveroni G, Giannicola G, Postacchini F. 2004 Experimental posterolateral spinal fusion with porous ceramics and mesenchymal stem cells. *J Bone Joint Surg Br*. 86:135-42.
- Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. 1998 A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*. 125:725-32.
- 25 Cohen Y, Nagler A. 2004 Umbilical cord blood transplantation--how, when and for whom? *Blood Rev*. 18:167-79.
- Gang EJ, Hong SH, Jeong JA, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H, Kim H. 2004 In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 321:102-8.
- 30 Gerasimov IuV, Fridenshtein Ala, Chailakhian RK, Shishkova VV. 1986 Differentiation potentials of clonal strains of bone marrow fibroblasts. *Biull Eksp Biol Med*. 101:717-9.
- Gotoh Y, Hiraiwa K, Nagayama M. 1990 In vitro mineralization of osteoblastic cells derived from human bone. *Bone Miner*. 8:239-50.
- Hamaguchi I, Huang XL, Takakura N, Tada J, Yamaguchi Y, Kodama H, Suda T. 1999 In vitro hematopoietic and endothelial cell development from cells expressing TEK receptor in murine aorta-gonad-mesonephros region. *Blood*. 93:1549-56.
- 35 He Z, Huang S, Li Y, Zhang Q. 2002 Human embryonic stem cell lines preliminarily established in China. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 82:1314-8.
- Hofmann GO, Kirschner MH, Gonschorek O, Buhren V. 1998 Bridging long bone and joint defects with allogeneic vascularized transplants. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd*. 115:1285-7.
- Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. 1999 Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*. 5:309-13.
- 40 Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, McCarville ME, Orchard PJ, Pyeritz RE, Brenner MK. 2001 Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood*. 97:1227-31.
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. 2002 Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:8932-7.
- 50 Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Stromberg AM, Inzunza J, Hreinsson J, Rozell B, Blennow E, Andang M, Ahrlund-Richter L. 2003 A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum Reprod*. 18:1404-9.
- Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. 1997 Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 64:295-312.
- 55 Johnson DR. 2000 Differential expression of human major histocompatibility class I loci: HLA-A, -B, and -C. *Hum Immunol*. 61:389-96.
- Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. 1997 Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant*. 6:125-34.
- Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Hamaguchi H, Shiba H, Takata T, Kato Y, Kurihara H. 2004 Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol*. 75:1281-7.
- 60 Koc ON, Peters C, Aubourg P, Raghavan S, Dyhouse S, DeGasperis R, Kolodny EH, Yoseph YB, Gerson SL, Lazarus HM, Caplan AI, Watkins PA, Krivit W. 1999 Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Exp Hematol*. 27:1675-81.
- 65

- Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. 2003 Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 101:3722-9.
- Lane JM, Yasko AW, Tomin E, Cole BJ, Waller S, Browne M, Turek T, Gross J. 1999 Bone marrow and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in osseous repair. *Clin Orthop*. 361:216-27.
- 5 Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. 2004 Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 103:1669-75.
- Lee WY, Cho SW, Oh ES, Oh KW, Lee JM, Yoon KH, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Kim CC. 2002 The effect of bone marrow transplantation on the osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 87:329-35.
- 10 Lewandrowski KU, Gresser JD, Wise DL, Trantol DJ. 2000 Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: a histologic evaluation of osteointegration of poly(propylene glycol-co-fumaric acid)-based cement implants in rats. *Biomaterials*. 21:757-64.
- Maitra B, Szekely E, Gjini K, Laughlin MJ, Dennis J, Haynesworth SE, Koc ON. 2004 Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant*. 33:597-604.
- 15 Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, Helwig B, Beerstrauch M, Abou-Easa K, Hildreth T, Troyer D, Medicetty S. 2003 Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*. 21:50-60.
- Mizuno H, Hyakusoku H. 2003 Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells. *J Nippon Med Sch*. 70:300-6.
- 20 Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. 2000 Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 105:1527-36.
- Nade S, Armstrong L, McCartney E, Baggaley B. 1983 Osteogenesis after bone and bone marrow transplantation. The ability of ceramic materials to sustain osteogenesis from transplanted bone marrow cells: preliminary studies. *Clin Orthop Relat Res*. 181:255-63.
- 25 Neppert J, Nunez G, Stastny P. 1984 HLA-A, B, C; -DR; -MT, -MB, and SB antigens on unstimulated human endothelial cells. *Tissue Antigens*. 24:40-7.
- Nilsson SK, Dooner MS, Weier HU, Frenkel B, Lian JB, Stein GS, Quesenberry PJ. 1999 Cells capable of bone production engraft from whole bone marrow transplants in nonablated mice. *J Exp Med*. 189:729-34.
- Niemeyer P, Seckinger A, Simank HG, Kasten P, Sudkamp N, Krause U. 2004 Allogenic transplantation of human mesenchymal stem cells for tissue engineering purposes: an in vitro study. *Orthopade*. 33:1346-53.
- 30 Ohgushi H, Okumura M, Tamai S, Shors EC, Caplan AI. 1990 Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate: a comparative histomorphometric study of ectopic bone formation. *J Biomed Mater Res*. 24:1563-70.
- Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ. 1995 Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:4857-61.
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. 1999 Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 284:1168-70.
- 40 Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Buscher K, Bartel J, Smolian H, Schultz O, Burmester GR, Haupl T, Sittlinger M. 2002 Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res*. 307:321-7.
- Schmidt GM, Horak DA, Niland JC, Duncan SR, Forman SJ, Zaia JA. 1991 A randomized, controlled trial of prophylactic ganciclovir for cytomegalovirus pulmonary infection in recipients of allogeneic bone marrow transplants; The City of Hope-Stanford-Syntex CMV Study Group. *N Engl J Med*. 1991 324:1005-11.
- Shahgasempour S, Woodroffe SB, Garnett HM. 1998 Modulation of HLA class I antigen and ICAM-2 on endothelial cells after in vitro infection with human cytomegalovirus. *Immunol Cell Biol*. 76:217-21
- 45 Shang Q, Wang Z, Liu W, Shi Y, Cui L, Cao Y. 2001 Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *J Craniofac Surg*. 12:586-93;
- Sottile V, Thomson A, McWhir J. 2003 In vitro osteogenic differentiation of human ES cells. *Cloning Stem Cells*. 5:149-55.
- 50 Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang PH, Mao N. 2003 Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *Stem Cells*. 21:527-35.
- Suparno C, Milligan DW, Moss PA, Mautner V. 2004 Adenovirus infections in stem cell transplant recipients: recent developments in understanding of pathogenesis, diagnosis and management. *Leuk Lymphoma*. 45:873-85.
- Theunissen K, Verfaillie CM. 2005 A multifactorial analysis of umbilical cord blood, adult bone marrow and mobilized peripheral blood progenitors using the improved ML-IC assay. *Exp Hematol*. 33:165-72.
- 55 Valimaki MJ, Kinnunen K, Volin L, Tahtela R, Loytyniemi E, Laitinen K, Makela P, Keto P, Ruutu T. 1999 A prospective study of bone loss and turnover after allogeneic bone marrow transplantation: effect of calcium supplementation with or without calcitonin. *Bone Marrow Transplant*. 23:355-61.
- Wakitani S, Takaoka K, Hattori T, Miyazawa N, Iwanaga T, Takeda S, Watanabe TK, Tanigami A. 2003 Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint. *Rheumatology (Oxford)*. 42:162-5.
- 60 Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. 2004 Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 22:1330-7.
- Wertz JR, Lane JM, Burstein AH, Justin R, Klein R, Tomin E. 1996 Qualitative and quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow. *J Orthop Res*. 14:85-93.
- 65

Winston DJ, Ho WG, Champlin RE. 1990 Cytomegalovirus infections after allogeneic bone marrow transplantation. *Rev Infect Dis.* 12 Suppl 7: S776-92.

Yoshikawa T, Ohgushi H. 1999 Autogenous cultured bone graft--bone reconstruction using tissue engineering approach. *Ann Chir Gynaecol.* 88:186-92.

5 Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. 2001 Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7:211-28.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. 2002 Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 13:4279-95.

10 zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ. 2003 In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation.* 71:18-27.

REIVINDICACIONES

1. Un implante protésico que comprende una plataforma tridimensional biocompatible y, a este respecto, al menos tres tipos de células seleccionados del grupo que consiste en osteoblastos, osteoclastos, condrocitos, células endoteliales y células madre mesenquimales en un cultivo tridimensional, en el que dicho cultivo tridimensional es un cultivo en el que las células están dispuestas en condiciones que son compatibles con el crecimiento celular al tiempo que permiten que las células crezcan en más de una capa.
2. Un procedimiento de producción de un implante protésico ex-vivo que comprende aislar, expandir y cultivar conjuntamente en un cultivo tridimensional al menos tres tipos de células seleccionadas del grupo que consiste en osteoblastos, osteoclastos, condrocitos, células endoteliales y células madre mesenquimales en una plataforma tridimensional en un sistema de flujo, en el que dicho cultivo tridimensional es un cultivo en el que las células están dispuestas en condiciones que son compatibles con el crecimiento celular al tiempo que permiten que las células crezcan en más de una capa.
3. El implante de la reivindicación 1, en el que dichas células crecen a una densidad de al menos 10^6 células/ml.
4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dichos al menos tres tipos de células se obtienen de una fuente seleccionada del grupo que consiste en una fuente autóloga, una fuente singénica y una fuente alogénica, o una combinación de las mismas.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicha fuente se selecciona del grupo que consiste en médula ósea, placenta, tejido adiposo, sangre de cordón umbilical, vena de cordón umbilical, sangre periférica y sangre periférica movilizada.
6. El implante de la reivindicación 1, en el que dicha plataforma tridimensional comprende un material seleccionado del grupo que consiste en un material orgánico, un polímero, un material cerámico y un material metálico, en el que dicho material orgánico comprende una partícula ósea seleccionada del grupo que consiste en una partícula de hueso seco, una partícula de hueso congelada y una partícula de hueso desmaterializada; en el que dicho polímero o material cerámico se selecciona del grupo que consiste en poliésteres alifáticos, poli (aminoácidos), copoli (éter-éster), polialquilenos oxalatos, poliamidas, policarbonatos derivados de tirosina, poli (iminocarbonatos), poliortoésteres, polioxaésteres, poliamidoésteres, polioxésteres que contienen grupos amina, poli (anhídridos), polifosfocenos, vidrio bioactivo, derivados de fosfato de calcio, derivados de sulfato de calcio, hidroxiapatita de calcio, matrices de silicato, hidroxiapatita, ácido hialurónico, fosfato de calcio beta-3, fibras de colágeno reticuladas, materiales a base de resina, fibrina, fibronectina, colágeno, ECM y combinaciones de los mismos.
7. El implante de la reivindicación 6, en el que dicho polímero comprende un polímero biodegradable seleccionado del grupo que consiste en un polímero sólido, polímeros semisólidos y un polímero similar a un gel, dicho polímero biodegradable se selecciona del grupo que consiste en policaprolactona, ácido poliglicólico, poli-ácido láctico, ácido poliláctico-co-glicólico, ácido poli tartónico, fibrina, fibronectina, colágeno, ECM o copolímeros de los mismos, y combinaciones de los mismos.
8. El implante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha plataforma tridimensional comprende una capa de revestimiento, en el que dicha capa de revestimiento comprende un material seleccionado del grupo que consiste en poli-D-lisina, colágeno, fibronectina ECM e hidrogel, o una combinación de los mismos.
9. El implante de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 6-9 en el que dicha plataforma tridimensional está preformada para implante en una lesión ósea.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 y 5, en el que dicho cocultivo comprende someter dichas células a un estímulo osteogénico, en el que dicho estímulo osteogénico comprende poner en contacto las células con una molécula seleccionada del grupo que consiste en dexametasona, β -glicerofosfato de sodio, 1,25 dihidroxicolecalciferolcalcitriol y ácido L-ascórbico-2-fosfato.
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 5 y 10, en el que dicho cocultivo se lleva a cabo en un medio que comprende al menos uno de un factor de crecimiento y una citocina, en el que dicho factor de crecimiento o citocina se selecciona del grupo que consiste en factor de crecimiento transformante beta (TGF beta), factor de crecimiento similar a la insulina-1 y 2 (IGF-1 y 2), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), proteína osteogénica-1 (OP-1), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), FGF-2, FGF-9, FGF-10, PTH (hormona paratiroidea), PRP (plasma rico en plaquetas), EGF (factor de crecimiento epidérmico), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y un miembro de la familia de Proteína Morfogénica Ósea (BMP), o una combinación de los mismos, en el que dicha proteína morfogénica ósea se selecciona del grupo que consiste en BMP-2, BMP-4 y BMP-7.
12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 5, 10 y 11, en el que dicho implante se crioconserva y descongela antes de su uso.

13. Un tapón de aloinjerto o autoinjerto que comprende una plataforma biocompatible de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 6-9 en el que un primer lado de dicha plataforma comprende un revestimiento de tejido de cartílago, y en el que un segundo lado de dicha plataforma comprende una capa que comprende osteoblastos, y condrocitos o progenitores de los mismos.

5

14. El implante de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 6-9, para su uso en el trasplante a un paciente que necesite del mismo y opcionalmente en el que dicho trasplante comprende una técnica de ajuste a presión.

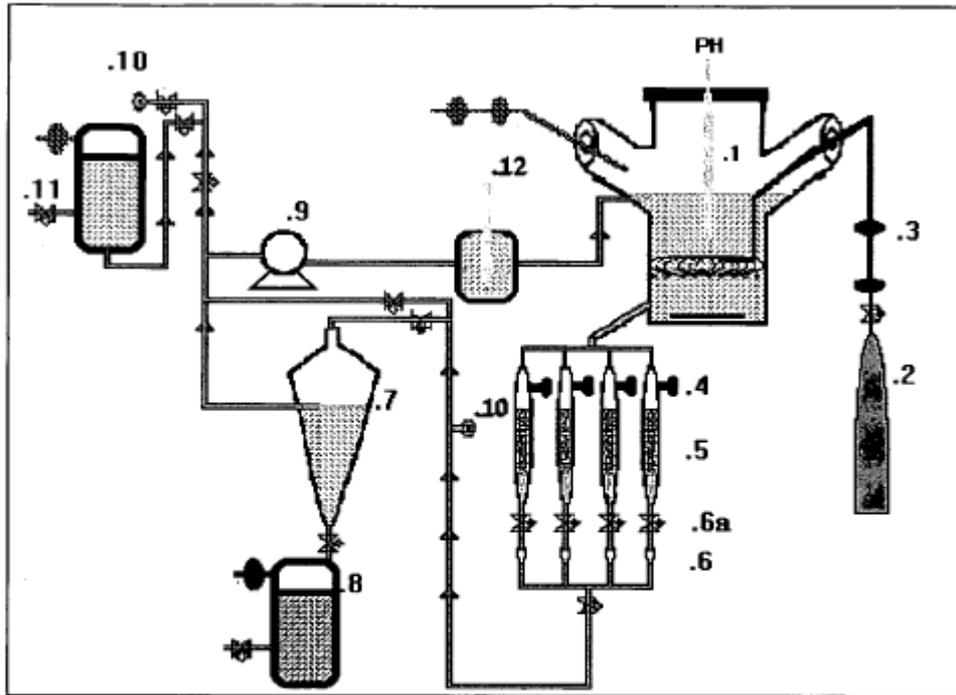


Figura 1

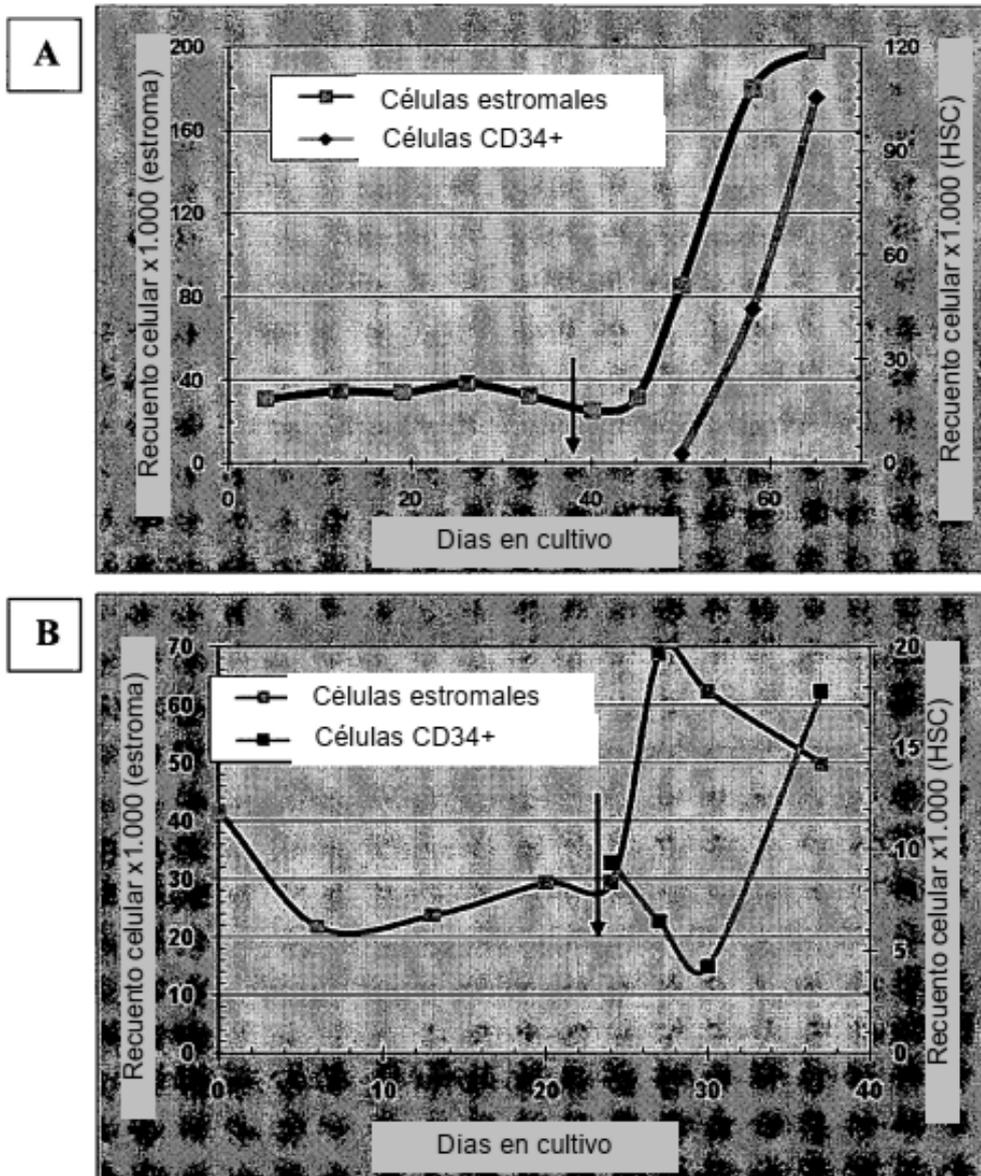


Figura 2

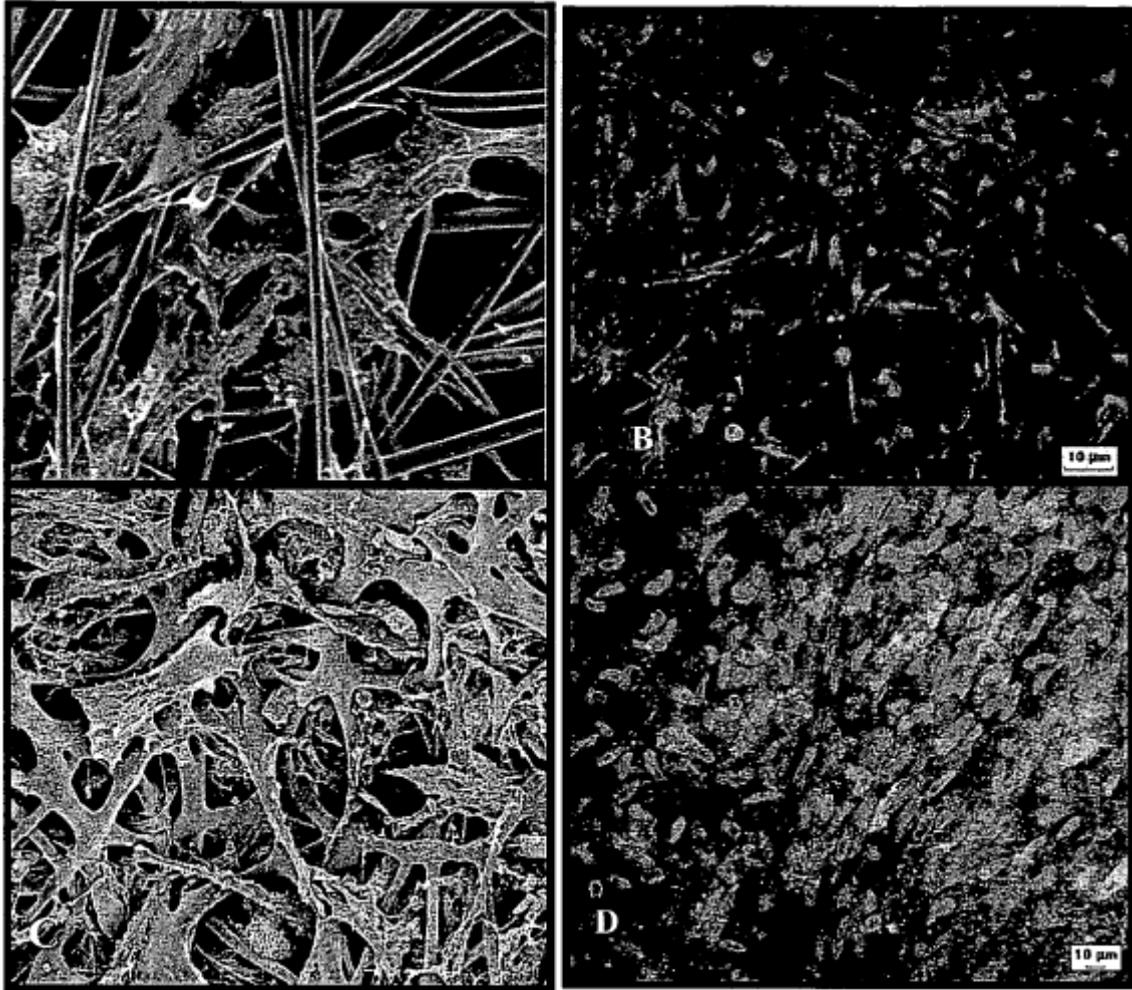


Figura 3

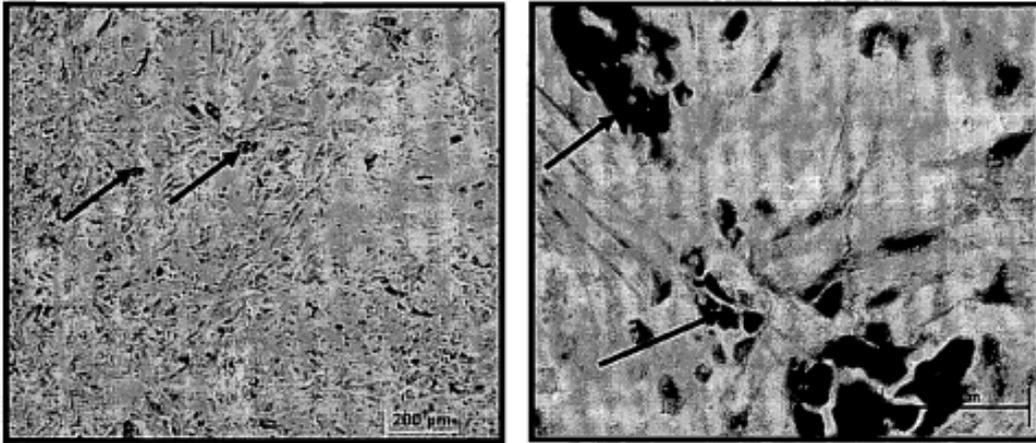


Figura 4

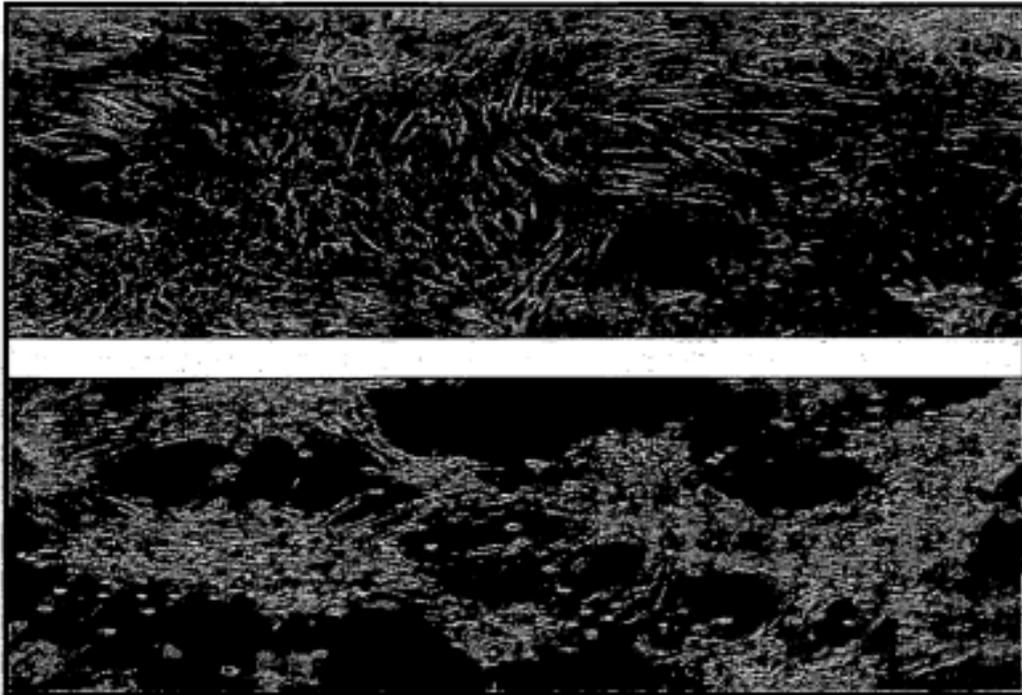


Figura 5

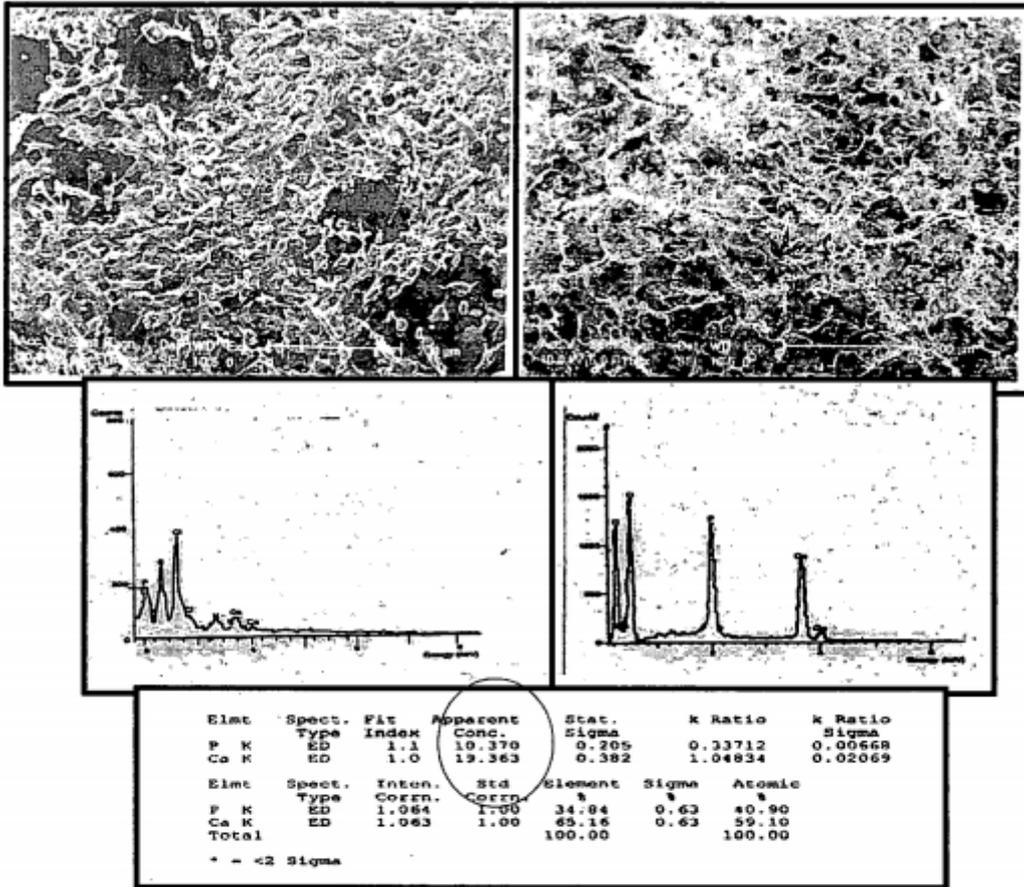


Figura 6

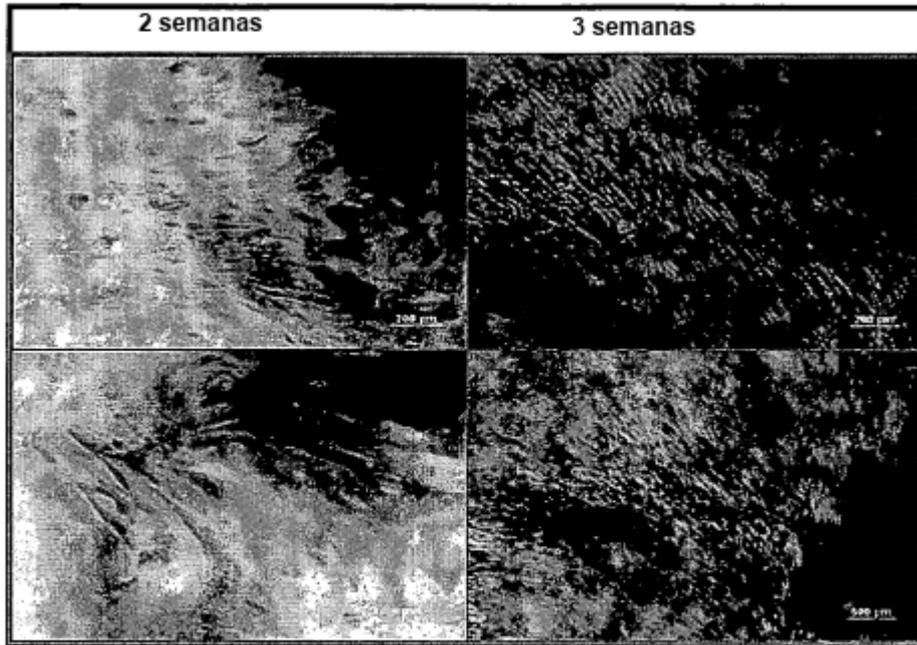


Figura 7

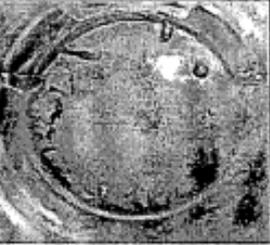
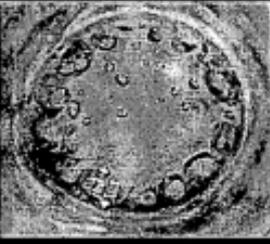
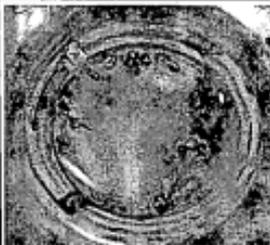
Cultivo Días	Células osteoprogenitoras	Co-cultivo de Células osteoprogenitoras + células endoteliales
3		
7		
10		
14		

Figura 8

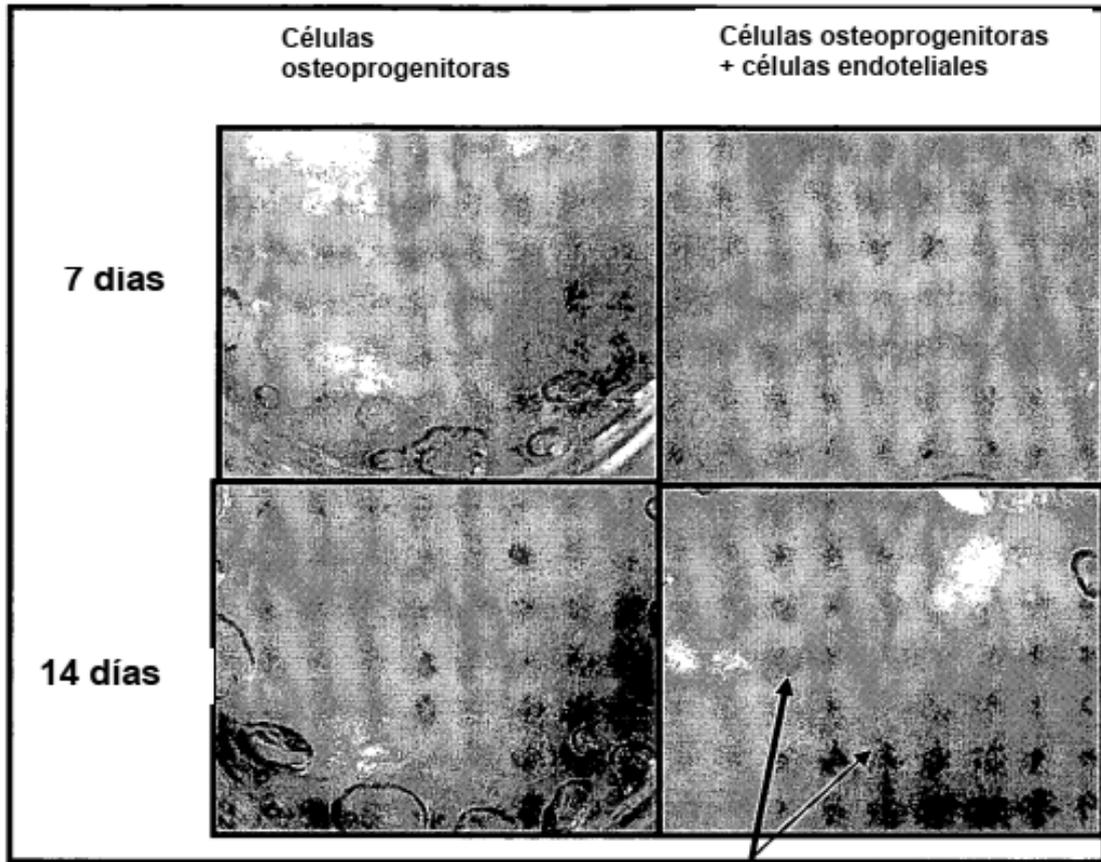


Figura 9

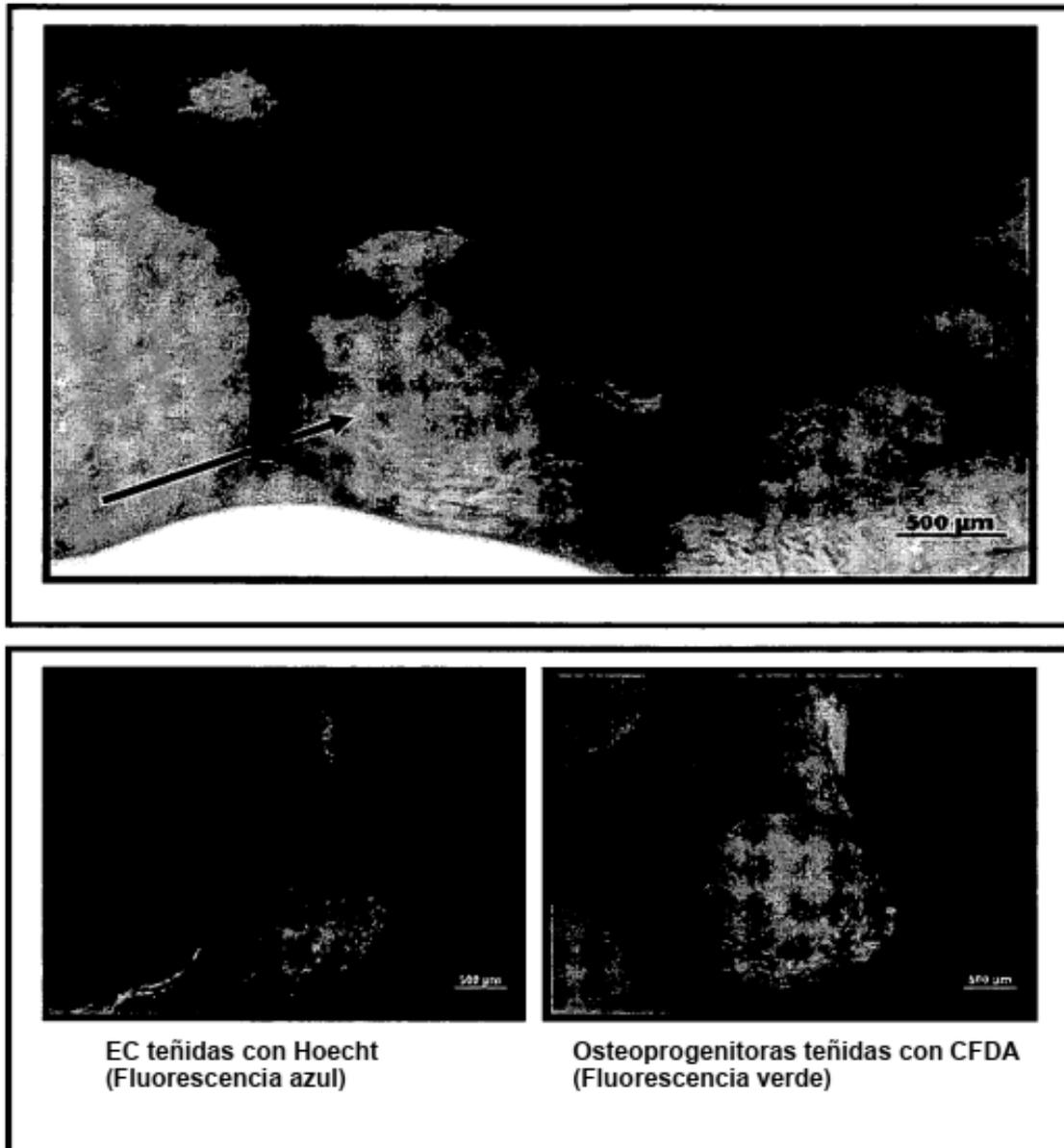


Figura 10

PLC(N)12A

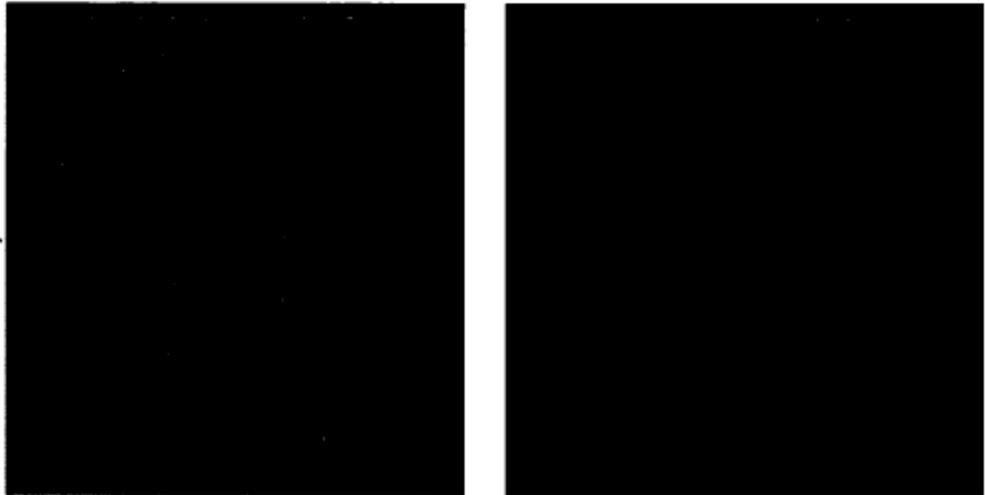


Figura 11

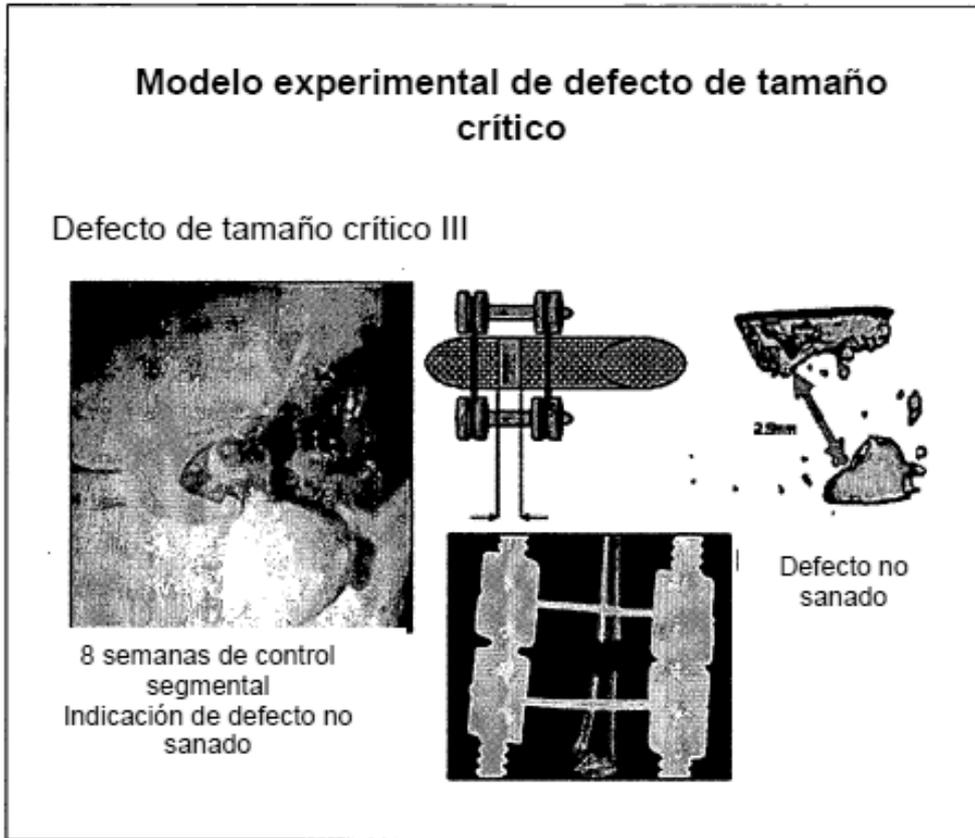
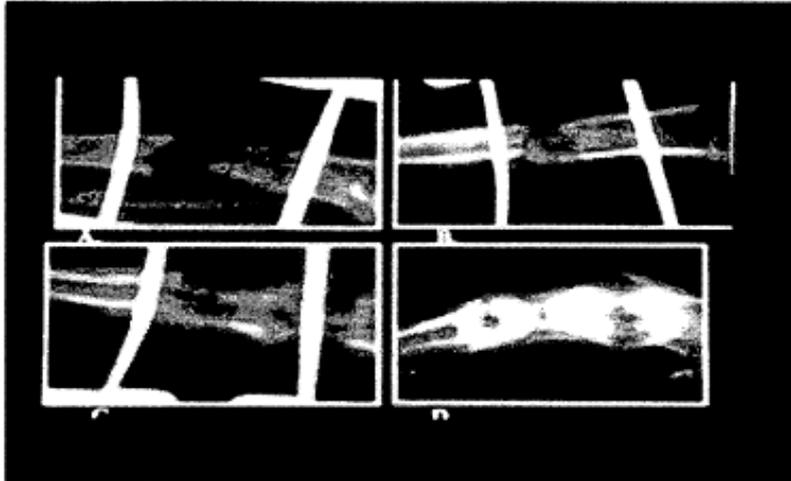


Figura 12

Resultados preclínicos



Reparación del defecto óseo

Fotografías de rayos X de una tibia de rata en el día de la inducción del defecto óseo: tiempo 0 (A), dos semanas (B), cuatro semanas (C) y seis semanas

Figura 13

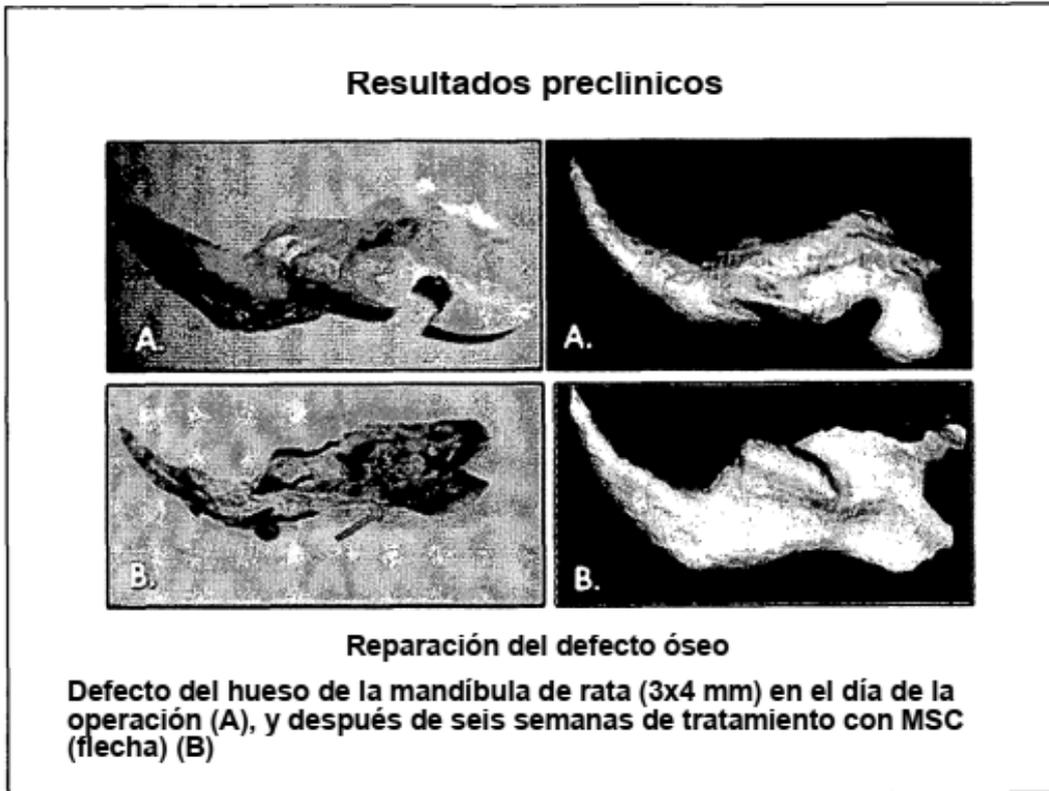


Figura 14

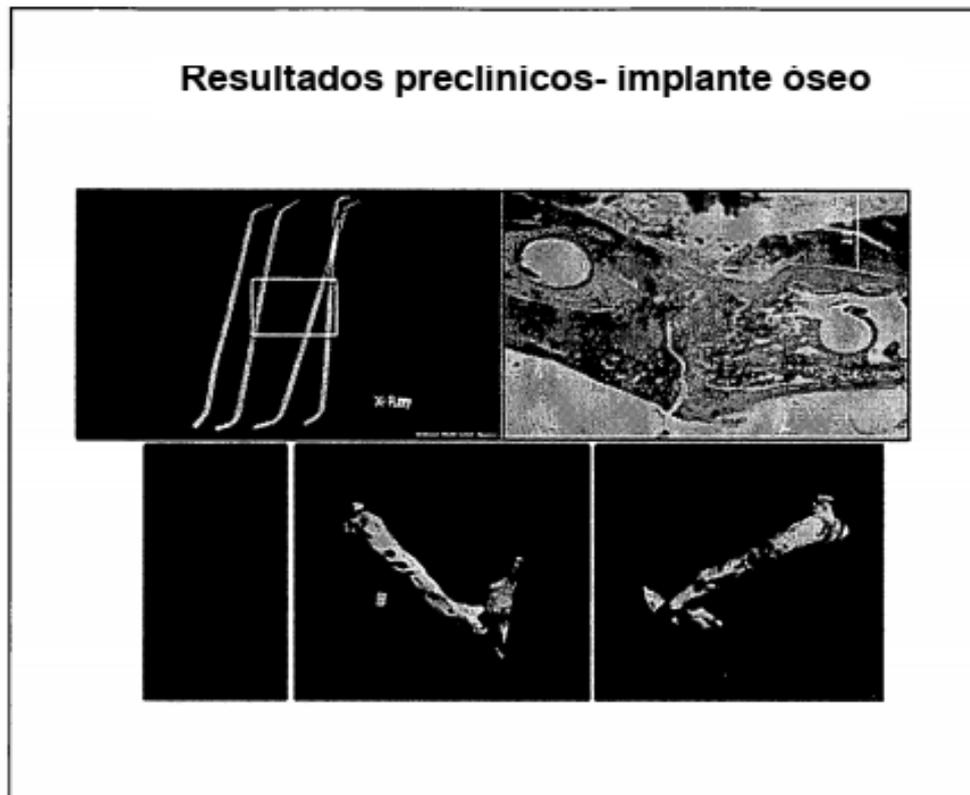


Figura 15

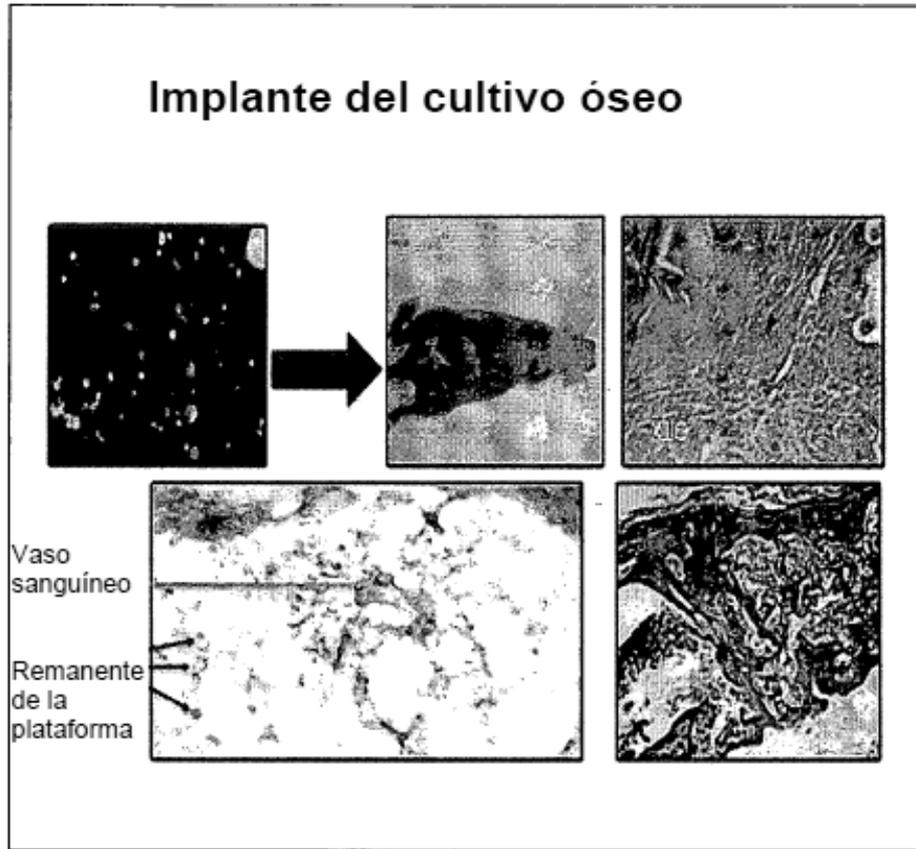


Figura 16

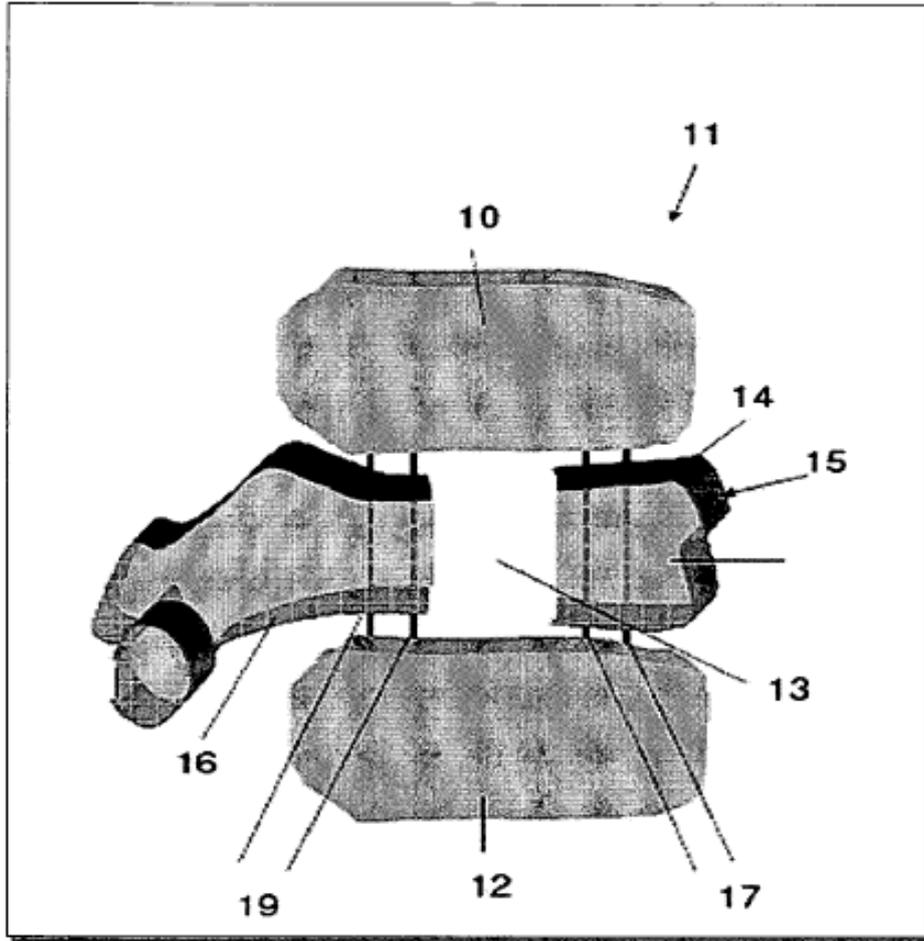


Figura 17

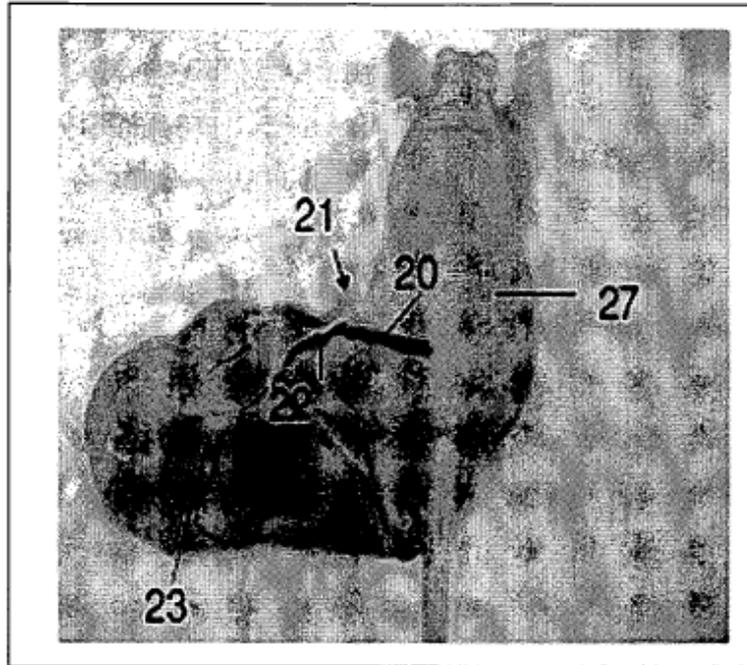


Figura 18A

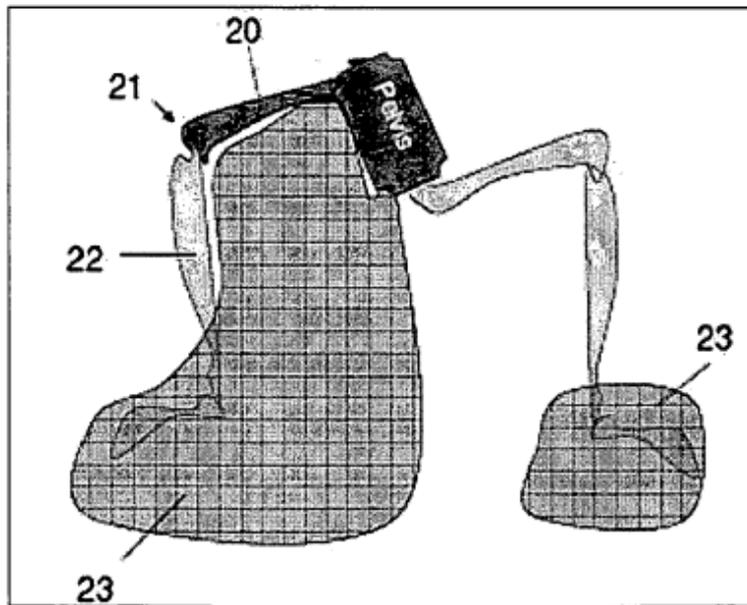


Figura 18B

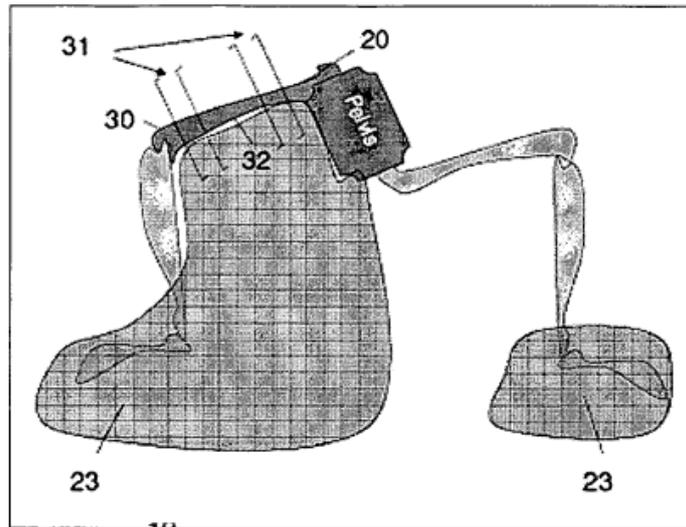


Figura 19

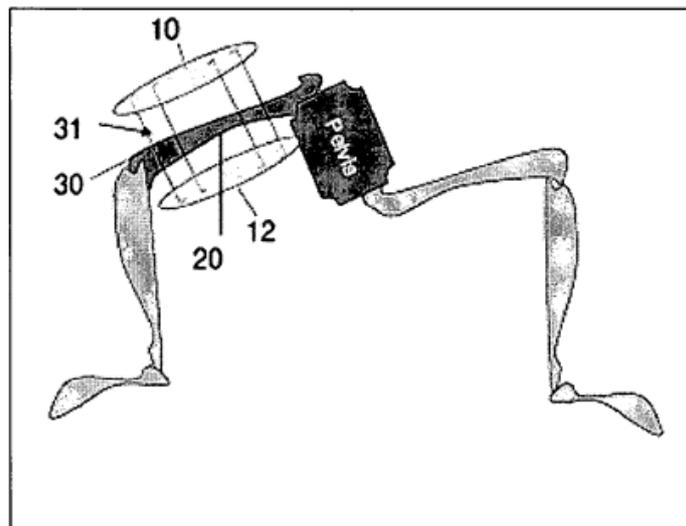


Figura 20

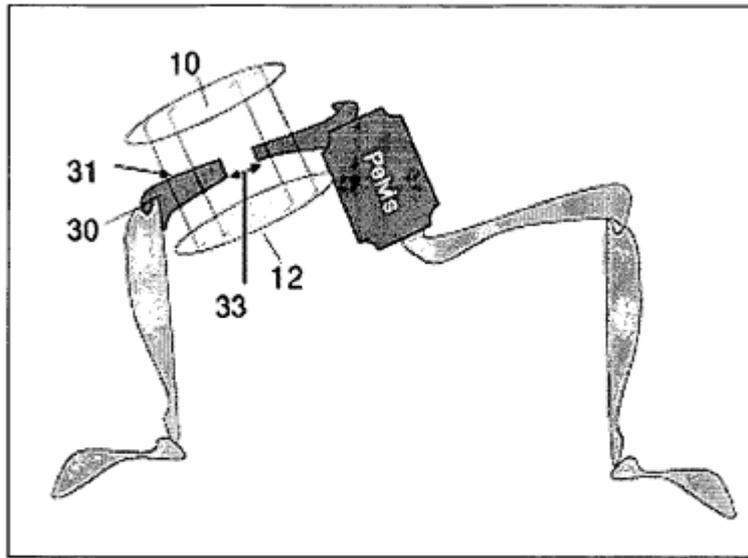


Figura 21

