



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 329 953**

51 Int. Cl.:
A61K 35/28 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **97920427 .8**
96 Fecha de presentación : **17.04.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **0906415**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.1999**

54 Título: **Regeneración e incremento de hueso utilizando células madre mesenquimales.**

30 Prioridad: **19.04.1996 US 16245 P**
28.10.1996 US 29838 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.12.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.12.2009

73 Titular/es: **Osiris Therapeutics, Inc.**
7015 Albert Einstein Drive
Columbia, Maryland 21046, US

72 Inventor/es: **Kadiyala, Sudha;**
Bruder, Scott, P. y
Muschler, George, F.

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 329 953 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

Regeneración e incremento de hueso utilizando células madre mesenquimales.

5 Se ha demostrado recientemente que las células madre mesenquimales (CMM) autólogas derivadas de médula ósea expandidas en cultivo regeneran defectos óseos clínicamente significativos. Mediante la utilización de técnicas para el aislamiento y cultivo de CMMs humanas, debería resultar posible implementar estrategias terapéuticas basadas en la administración de las propias células de un paciente que han sido recolectadas mediante una simple aspiración en la cresta ilíaca. Este procedimiento podría proporcionar una alternativa al injerto de hueso autógeno, y resultará particularmente útil en contextos clínicos, tales como el envejecimiento y la osteoporosis, en las que se reducen el número y/o función de las CMMs endógenas.

15 La reparación de defectos segmentarios grandes en el hueso diafisario es un problema significativo al que deben hacer frente los cirujanos ortopédicos. Aunque dicha pérdida de hueso puede producirse como resultado de una lesión aguda, estos defectos masivos comúnmente se presentan secundariamente a malformaciones congénitas, tumores benignos y malignos, infección ósea y la no unión de fracturas. La utilización de material autólogo fresco de injertación ósea se ha considerado el estándar histórico de tratamiento, aunque se asocia a morbilidad sustancial, incluyendo infecciones, malformaciones, dolor y pérdidas de función (72, 149). Las complicaciones resultantes de la obtención de injerto, en combinación con la cantidad limitada disponible, han inspirado el desarrollo de estrategias alternativas para la reparación de defectos óseos clínicamente significativos. El enfoque principal a este problema se ha centrado en el desarrollo de materiales efectivos de implante óseo.

25 Han surgido tres clases generales de implantes óseos a partir de dichos esfuerzos de investigación, categorizadas como osteoconductores, osteoinductores o directamente osteogénicos. El hueso de aloinjerto probablemente es el tipo mejor conocido de implante osteoconductor. Aunque se ha utilizado ampliamente durante muchos años, el riesgo de transmisión de enfermedades, el rechazo del huésped y la falta de osteoinducción comprometen su deseabilidad (76). Entre los implantes osteoconductores sintéticos se incluyen los fibrometales de titanio y la cerámica compuesta de hidroxiapatito y/o fosfato de tricalcio. La naturaleza favorablemente porosa de estos implantes facilita el crecimiento óseo, pero su falta de potencial osteoinductor limita su utilidad. También se ha estudiado una diversidad de compuestos osteoinductores, incluyendo la matriz de hueso desmineralizado (34, 45), que es conocido que contiene proteínas morfogénicas óseas (BMP). Desde el descubrimiento original de Urist de las BMP (138), otros han caracterizado, clonado, expresado e implantado BMPs purificadas o recombinantes en sitios ortotópicos para la reparación de grandes defectos óseos (44, 126, 146, 147). El éxito de este enfoque se ha basado en la presencia de células mesenquimales capaces de responder a la señal inductora proporcionada por las BMP (74, 129). Son estos progenitores mesenquimales que experimentan diferenciación osteogénica y que son finalmente responsables de la síntesis de hueso nuevo en el sitio quirúrgico.

35 Una alternativa al enfoque osteoinductor es la implantación de células vivas que son directamente osteogénicas. Debido a que se ha demostrado que la médula ósea contiene una población celular que presenta potencial osteogénico, algunos autores han concebido terapias experimentales basadas en la implantación de médula autóloga fresca o singénica en sitios que requieren la reparación esquelética (26, 27, 49, 105, 113, 144, 145). Aunque la idea es teóricamente sólida, en la práctica la obtención de suficiente médula ósea, con el número requerido de células osteoprogenitoras, resulta un factor limitante.

45 Sumario de la invención

La presente invención proporciona composiciones para dirigir la diferenciación de las CMMs cultivadas *in vitro* hacia rutas de linajes celulares específicos antes o durante la implantación de las mismas para el tratamiento terapéutico de procedimientos electivos o condiciones patológicas en seres humanos y en otras especies. La utilización de CMMs tanto autólogas como alogénicas se encuentra contemplada en la presente invención.

55 En particular, la presente invención proporciona una composición para incrementar la formación de hueso, comprendiendo la composición un biopolímero reabsorbible seleccionado de entre el grupo constituido por gelatina, celulosa y colágeno en combinación con células madre mesenquimales aisladas, en la que el biopolímero reabsorbible es una esponja, tira, película o malla, o un implante tridimensional estructuralmente estable en forma de cubo, cilindro o bloque, o conformado en una forma anatómica, y con la condición de que las células madre mesenquimales no sean células madre embrionarias humanas. El biopolímero reabsorbible puede encontrarse en forma particulada. La gelatina puede ser una gelatina derivada de piel bovina.

60 En una forma de realización, la composición comprende además por lo menos un factor bioactivo que induce o acelera la diferenciación de dichas células madre mesenquimales en el linaje osteogénico. En la presente forma de realización, las células pueden ponerse en contacto con el factor bioactivo *ex vivo* o al encontrarse en contacto con el biopolímero reabsorbible. Preferentemente, el factor bioactivo es un glucocorticoide sintético, preferentemente dexametasona, o una proteína morfogénica ósea, preferentemente seleccionada de entre el grupo constituido por BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6 y BMP-7. Preferentemente, la proteína morfogénica ósea se encuentra en un portador líquido o semisólido adecuado para la inyección intramuscular, intravenosa, intramedular o intraarticular.

Además, la presente invención proporciona la utilización de una composición según la invención para la preparación de una composición farmacéutica para incrementar la formación de hueso en un individuo que necesita de la misma. En una forma de realización, la composición farmacéutica comprende una cantidad incrementadora de la formación de hueso.

5

Las investigaciones informadas en la presente memoria confirman el potencial osteogénico *in vitro* e *in vivo* de las CMMs al implantarlas en un sitio subcutáneo ectópico, e ilustran que las CMMs purificadas y expandidas en cultivo pueden regenerar un defecto óseo segmentario que de otra manera resultaría en una no unión clínica. Estos experimentos compararon el potencial de cicatrización de las CMMs administradas en un medio osteoconductor, osteoinductor u otro medio reabsorbible apropiado. También se ha demostrado la formación *de novo* de hueso en el sitio de una fusión deseada, por ejemplo en fusiones espinales o articulares.

10

La composición de la invención resulta útil para llevar a cabo la reparación o la regeneración de defectos óseos en un animal o individuo que necesita de la misma. Entre dichos defectos se incluyen, por ejemplo, defectos óseos segmentarios, no uniones, malas uniones o uniones retrasadas, quistes, tumores, necrosis o anomalías del desarrollo. Otras condiciones que requieren el incremento óseo, tales como la reconstrucción de articulaciones, la reconstrucción cosmética o la fusión ósea, tal como la fusión espinal o la fusión articular pueden tratarse en un individuo mediante la administración, por ejemplo en el sitio del hueso que requiere el incremento, de médula completa fresca y/o de células madre mesenquimales humanas aisladas o combinaciones de los mismos en el medio basado en gelatina, celulosa o colágeno en un grado suficiente para incrementar la formación de hueso a partir de las mismas. La composición también puede contener uno o más componentes que degradan, reabsorben o remodelan a velocidades que se aproximen a las de formación de tejido nuevo.

15

20

La invención también contempla la utilización de otros componentes de la matriz extracelular, conjuntamente con las células, de manera que se consiga la osteoconducción u osteoinducción. Además, mediante la modificación de las proporciones de los componentes en dichas matrices biodegradables, pueden ajustarse las propiedades de manipulación quirúrgica de los implantes de biomatrices de células, desde una matriz dimensionalmente estable, tal como una esponja o una película, hasta unos polvos.

25

La composición anteriormente indicada puede comprender además por lo menos un factor bioactivo que induzca o acelere la diferenciación de las células madre mesenquimales para formar el linaje osteogénico. Las CMMs pueden ponerse en contacto con el factor bioactivo *ex vivo* y preferentemente se ponen en contacto con el factor bioactivo durante el contacto de las CMMs con la matriz. El factor bioactivo puede ser, por ejemplo, un glucocorticoide sintético, tal como dexametasona, o una proteína morfogénica ósea, tal como BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6 o BMP-7. La proteína morfogénica ósea puede encontrarse en un portador líquido o semisólido adecuado para la inyección intramuscular, intravenosa, intramedular o intraarticular.

30

35

Más particularmente, la composición de la invención resulta útil como implante rígido de matriz de células para defectos segmentarios grandes y fusiones o no uniones espinales. Los implantes de matriz de células ajustados al paciente que contienen CMMs autólogas o alogénicas pueden administrarse utilizando técnicas quirúrgicas abiertas o artroscópicas o la inserción percutánea, por ejemplo la inyección directa, la canulación o la cateterización.

40

En una forma de realización preferida, se obtiene una composición de células madre mesenquimales humanas (CMMhs) a partir de preparaciones expandidas en cultivo homogéneas derivadas a partir de médula completa (u otra fuente prenatal o post-natal de CMMhs autólogas o alogénicas) o a partir de cultivos enriquecidos o heterogéneos que contienen una dosis efectiva de CMMhs. La clave para los resultados clínicos efectivos utilizando la terapia de CMM es proporcionar al paciente el número de células madre mesenquimales que repare el hueso u otro defecto de tejido. Se hace referencia a lo anterior como “umbral regenerativo de las CMM”, o aquella concentración de CMMs necesaria para conseguir la reparación directa del defecto de tejido. El umbral regenerativo de las CMMs varía con: 1) el tipo de tejido (es decir, hueso, cartílago, ligamento, tendón, músculo, estroma medular, dermis y otros tejidos conectivos), 2) el tamaño o extensión del defecto de tejido, 3) la formulación con portador farmacéutico, y 4) la edad del paciente. En un medio completo o en medio libre de suero definido químicamente, las CMMhs expandidas en cultivo y aisladas son capaces de incrementar la formación de hueso. En un medio osteoconductor u otro medio optimizado, tal como un biopolímero reabsorbible, la médula ósea completa fresca que contiene aproximadamente 10^4 CMMs por ml de médula también resulta capaz de incrementar la formación de hueso. Las combinaciones de dichas técnicas también se encuentran contempladas.

45

50

55

La invención resulta útil para la administración de: (i) células madre mesenquimales humanas expandidas en cultivo y aisladas, (ii) médula ósea recién aspirada, o (iii) la combinación de las mismas en un material portador o matriz, proporcionando un área de fusión ósea y una masa de fusión mejorados en comparación con la matriz sola. Resulta particularmente preferida la administración de una composición que comprende células madre mesenquimales purificadas y aspirados frescos de médula ósea administrados en un material portador o matriz, proporcionando un área de fusión ósea y una masa de fusión mejorados.

60

Pueden obtenerse células de médula ósea a partir de cresta ilíaca, fémures, tibias, columna, costillas u otros espacios medulares. Entre otras fuentes de células madre mesenquimales humanas se incluyen el saco vitelino embrionario, la placenta, el cordón umbilical, el periostio, la piel fetal y adolescente y la sangre.

65

La composición también puede contener componentes adicionales, tales como factores osteoinductores. Entre dichos factores osteoinductores se incluyen, por ejemplo, dexametasona, 2-fosfato de ácido ascórbico, β -glicerofosfato y proteínas de la superfamilia TGF, tales como las proteínas morfogénicas óseas (BMPs). La composición también puede contener antibiótico, antimicótico, antiinflamatorio, inmunosupresor y otros tipos de agentes terapéuticos, conservantes y excipientes.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A-1D. Fotomicrografías de contraste de fases de cultivos de CMMs de rata en diversas etapas del desarrollo.

Figura 1A. Una colonia de CMM el día siete de cultivo primario está compuesto de células uniformemente ahusadas.

Figura 1B. Las CMMs de rata de pase uno se encuentran distribuidas uniformemente sobre la superficie de la placa 4 días después de la nueva siembra en placa.

Figura 1C. Las CMMs de rata cultivadas en medio de control durante veintiocho días se convirtieron en confluentes y multicapa, pero no forman nódulos mineralizados. La tinción con APasa (gris oscuro) revela una fracción de las células que es positiva.

Figura 1D. Los cultivos de CMMs de rata cultivados en presencia de suplementos osteogénicos durante veintiocho días forman nódulos mineralizados que se tiñen de negro mediante el método von Kossa. Los cultivos celulares se tiñeron con las técnicas histoquímicas de la APasa y de von Kossa tal como se indica posteriormente (no teñidos (a, b), histoquímica de fosfatasa alcalina y von Kossa (c, d), todos a $\times 45$).

Figura 2. Micrografía óptica de una sección histológica representativa de un implante de HA/TCP cargado de CMMs situado ectópicamente en tejido subcutáneo. Se cargaron las CMMs y la muestra se implantó tal como se indica posteriormente, se recolectaron a las ocho semanas, se descalcificaron y se procesaron en parafina para la microscopía. Únicamente quedan restos de la cerámica HA/TCP (c), mientras que los poros del implante se encuentran llenos de hueso (b), vasos sanguíneos (v) y elementos hematopoyéticos, incluyendo adipocitos (azul de toluidina O, $\times 70$).

Figura 3A-3H. Radiografías de alta resolución que muestran la cicatrización del defecto segmentario a las cuatro y a las ocho semanas con diversos implantes. Las radiografías se obtuvieron en un sistema formador de imágenes Faxitron inmediatamente después del sacrificio. La placa de fijación con polietileno se encuentra en la parte superior del hueso en cada radiografía. La radiografía de las cuatro semanas se encuentra a la izquierda, y la radiografía de las ocho semanas se encuentra a la derecha para cada grupo. La radiodensidad del material de HA/TCP revela la naturaleza porosa y el canal central de cada implante.

Figuras 3A y 3B. Defectos que se dejaron vacíos.

Figuras 3C y 3D. Defectos con portador de HA/TCP solo.

Figuras 3E y 3F. Defectos con portador HA/TCP cargado con CMMs.

Figuras 3G y 3H. Los defectos con un portador HA/TCP cargado con médula. Los defectos que se dejaron vacíos tras la resección segmentaria del hueso experimentaron la formación de hueso reactivo en los extremos cortados del hueso, conduciendo a una clásica no unión en este modelo bien establecido. A las cuatro semanas, las cargas cargadas con CMM empiezan a llenar los poros del material del implante. No resulta evidente ninguna unión en ningún tipo de implante a las cuatro semanas. A las ocho semanas, se ha producido una unión modesta de la interfaz huésped-implante en los grupos de portador (d) y de portador más médula, aunque resulta evidente la integración completa y la formación de puente óseo en el grupo de portador más CMM (f). El llenado total de los poros con hueso en la muestra cargada con CMM también resulta evidente en el panel F ($\times 1,5$).

Figura 4A-4F. Micrografías ópticas que muestran una cicatrización representativa del defecto segmentario a las cuatro y a las ocho semanas con diversos tipos de implante. Se recolectaron, fijaron, deshidrataron, aclararon, insertaron en polimetilmetacrilato, cortaron y molieron hasta un espesor de 100 micrómetros extremidades intactas previamente a la tinción. Algunos animales recibieron inyecciones de tinta china para permitir la visualización del árbol vascular, presente en los paneles B, C, D y E en forma de tinción negra. El material HA/TCP presenta una apariencia artefactualmente negra en estas fotomicrografías, como resultado del procesamiento sin descalcificación. Los márgenes cortados de los córtex del huésped se indican con flechas en *a* y *b*, y se presentan secciones similares en todos los demás paneles.

Figuras 4A y 4B. Defectos con portador HA/TCP solo a las cuatro y a las ocho semanas, respectivamente.

Figuras 4C y 4D. Defectos con un portador de HA/TCP cargado con CMM a las cuatro y a las ocho semanas, respectivamente.

ES 2 329 953 T3

Figuras 4E y 4F. Defectos con HA/TCP cargado con médula a las cuatro y a las ocho semanas, respectivamente. El hueso nuevo presente dentro de los poros o en la interfaz huésped-implante presenta una apariencia azul o violeta en estos especímenes. Resulta importante que únicamente las muestras que contenían un implante cargado con MSC cicatrizan con efectividad el defecto, tal como indica la cantidad sustancial de hueso presente dentro del implante y en la interfaz con el huésped en los paneles *c* y *d*. Ver el texto para más detalles (azul de toluidina O, x8).

Figura 5A-5B. Micrografías ópticas de alta magnificación que muestran la regeneración ósea a las ocho semanas en huecos segmentarios con un implante de HA/TCP cargado con CMM. El panel *a* muestra el margen cortado (flechas) del córtex del huésped con hueso nuevo en aposición directa. El hueso nuevo en esta interfaz huésped-implante es contigua al hueso formado en los poros del portador HA/TCP. El panel *b* muestra hueso de tipo tanto lamelar como tejido (azul) que llena los poros del portador HA/TCP. El portador presenta un color negro en estas imágenes como resultado espurio de la preparación sin descalcificación del espécimen. Los vasos sanguíneos (v) que orientan la actividad secretoria de los osteoblastos resultan evidentes dentro de los poros (azul de toluidina O, x75).

Figura 6. Diferenciación osteogénica de CMMs humanos *in vitro*. Fotomicrografías de contraste de fases (*a*, *b*) de cultivos de CMM humanas bajo condiciones de crecimiento y osteogénicas.

Figura 6A. CMMs de primer pase muestran una morfología de huso característica y se encuentran distribuidos uniformemente en la superficie de la placa tras la nueva siembra en placa.

Figura 6B. Los cultivos de CMM en presencia de OS durante 16 días forman agregados nodulares mineralizados que se tiñen de gris para la APasa y de negro para la matriz mineralizada (no teñido (*a*) x 18, APasa e histoquímica de von Kossa (*b*), x45).

Figura 6C. Actividad de APasa y deposición de calcio en cultivos de CMM cultivados en medio de control o en medio de OS, días 4, 8, 12 y 16. Se recolectaron muestras en los días indicados y se determinó la actividad de APasa, el número de células y la deposición de calcio tal como se describe en la sección Materiales y métodos. Los resultados representan la media \pm SD de cultivos por triplicado procedentes del primer pase de las células. *P<0,05, †P<0,005 (en comparación con el control).

Figura 7. Micrografía óptica de una sección histológica representativa de un implante de HA/TCP cargado con CMMs humanas situado ectópicamente en tejido subcutáneo de una rata atómica. Las CMMs se cargaron en la cerámica, se implantaron tal como se describe en la sección Materiales y métodos, se recolectaron a las 12 semanas, se descalcificaron y se procesaron en parafina para la microscopía. Únicamente quedaron residuos de la cerámica HA/TCP (*c*), mientras que los poros del implante se encontraban llenos de hueso (*b*), vasos sanguíneos (flecha) o tejido fibroso (*f*). Se observan osteoblastos cuboidales revistiendo la superficie del hueso en desarrollo (azul de toluidina O, x75).

Figura 8. Modelo y radiografía de defecto segmentario de hueso. (*a*) Placa de fijación de polietileno que se sitúa en el aspecto lateral de un fémur de rata representativo. Se utilizaron cuatro tornillos bicorticales y 2 alambres de cerclaje para fijar la placa. Se extrajo un segmento de hueso de 8 mm conjuntamente con su periostio adherente, y se introdujo un implante cerámico, con o sin células, en el sitio del defecto. Los músculos situados encima se devolvieron a su posición anatómica correcta y se cerró la piel con suturas reabsorbibles. Las radiografías de alta resolución obtenidas inmediatamente después del sacrificio muestran la extensión de la cicatrización del defecto segmentario a las 12 semanas con los 2 tipos de implante (*b*, *c*). Aunque la integración total del implante en la interfaz huésped-cerámica resulta evidente en el grupo de portador más CMM (*b*), sólo se observó una unión modesta en los implantes sin células (*c*). Los poros del implante cargado de CMM se llenaron de hueso en todo el hueso, pero el portador sin células contenía poco hueso y varias grietas.

Figura 9. Representación histológica de la regeneración ósea en defectos segmentarios femorales. La tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo 6E2 (*a*) demuestra que 4 semanas después del implante de una muestra cargada de CMM, las células dentro de los poros del portador son reactivos en la superficie de las mismas, y por lo tanto son de origen humano, mientras que las células situadas en el exterior de la cerámica no son inmunorreactivos. En la microscopía de contraste de fases (*b*), la cerámica es negra y las células en los poros y circundando el exterior del implante resultan evidentes. El material cerámico mismo adsorbe anticuerpo secundario fluorescente y presenta una apariencia verde (*a*, *b*, x75). Las micrografías ópticas muestran cicatrización representativa de un defecto segmentario implantado con portador HA/TCP solo (*d*), o con portador más CMMs (*c*, *e*, *f*), 12 semanas después del implante. Se obtuvieron las extremidades, se fijaron, se deshidrataron, se aclararon, se incluyeron en polimetilmetacrilato, se cor-taron y se molieron hasta un espesor de 100 μ m para la tinción. La cerámica presenta una apariencia negra en dichas fotomicrografías, a modo de artefacto de la preparación sin descalcificación del espécimen, y el hueso presente dentro de los poros o en la interfaz huésped-implante presenta una apariencia azul-violeta. El espécimen cargado de CMM mostrado en la presente memoria se sometió a un ensayo destructivo de torsión mecánica y después se procesó para el análisis histológico en dos trozos separados. Las fotomicrografías de reposicionamiento de los dos trozos aproxima la apariencia del fémur antes de los ensayos (*c*). El plano real de la fractura se indica mediante las flechas dobles encima y debajo del implante. Los márgenes cortados de los córtex del huésped se indican con puntas de flecha en *c*, *d* y *e*. Únicamente las muestras que contenían un implante cargado con CMM cicatrizaban con efectividad el defecto. Las micrografías de magnificación elevada demuestran la cantidad sustancial de hueso presente en la interfaz huésped-implante (*e*) y dentro del cuerpo del implante (*f*). (Azul de toluidina O, (*c*, *d*) x7, (*e*) x31, (*f*) x45).

Figuras 10A-10B. Sistema de coordenadas 3-D definido por la regla de la mano derecha, centrado en el punto medio de la línea entre los marcadores de foramen neural en el nivel de interés, que define el eje X. La dirección Z está definida por una línea que atraviesa los puntos medios de las líneas entre los forámenes neurales en los niveles indicados anteriormente y debajo del nivel de interés (es decir, entre los puntos naranja). La dirección Z positiva es cervical a lumbar. La dirección Y positiva es dorsal. La base del volumen de interés está definida por el plano X-Z. El volumen de la masa de fusión está definido por el contorno de todos los vóxels de densidad ósea en el eje Y positivo del plano X-Y entre $z=-7,5$ mm y $z=+7,5$ mm. Las fusiones completas presentan una anchura de entre 20 y 30 mm en la dimensión X y un altura de entre 10 y 15 mm en la dimensión Y.

Figura 11. El sistema de cuadrícula utilizado para asignar puntuaciones de unión se muestra en sección transversal esquemática en el nivel de las articulaciones de las carillas. Se asigna medio punto a la unión en cada una de las áreas de caja.

Descripción detallada de la invención

Los procedimientos de injertación ósea se utilizan ampliamente para el tratamiento de fracturas agudas, no uniones de fracturas, defectos óseos y para conseguir la artrodesis terapéutica. El hueso canceloso autógeno es el "estándar de oro" actual para la injertación ósea clínica. El dogma contemporáneo atribuye esta efectividad a tres propiedades intrínsecas principales: osteoconducción, células osteogénicas y osteoinducción (76, 96), que pueden definirse de la manera siguiente:

Osteoconducción - función de andamiaje proporcionada por la matriz ósea extracelular trasplantada que facilita la unión y migración celulares, y por lo tanto la distribución de una respuesta de cicatrización ósea en todo el volumen injertado. Esta propiedad probablemente depende de las moléculas de adhesión en el interior de la matriz ósea, tales como colágenos, fibronectina, vitronectina, osteonectina, osteopontina, osteocalcina, proteoglicanos y otros. Los factores de crecimiento en la matriz también podrían desempeñar un papel.

Células osteogénicas - las células en el autoinjerto derivadas de hueso o de médula ósea que sobreviven al trasplante y después proliferan y/o experimentan diferenciación osteoblástica.

Osteoinducción - propiedad bioactiva del hueso autógeno derivada de la presencia de factores de crecimiento u otros elementos en el injerto, que estimulan la proliferación y/o diferenciación de los progenitores osteoblásticos. Se han identificado muchos factores de crecimiento en la matriz ósea, incluyendo: proteínas morfogénicas óseas (BMPs), factor beta de crecimiento transformante (TGF- β), factor básico de crecimiento fibroblástico (bFGF) y factor de crecimiento similar a insulina (IGF). Las células no osteogénicas trasplantadas en la médula ósea también pueden producir factores que contribuyen a una respuesta de cicatrización ósea (140, 48). Se han implicado específicamente células endoteliales (141).

La presente invención proporciona una composición para la reparación de defectos óseos mediante la regeneración rápida de hueso sano. La composición es una matriz de gelatina absorbible, celulosa y/o basada en colágeno, en combinación con médula ósea y/o células madre mesenquimales aisladas. La composición puede utilizarse en la forma de una esponja, tira, malla u otro formato físico. La composición se inserta, por ejemplo, en el defecto y resulta en la cicatrización osteogénica del mismo.

La composición también puede contener componentes adicionales, tales como factores osteoinductores. Entre dichos factores osteoinductores se incluyen, por ejemplo, dexametasona, ácido ascórbico 2-fosfato, β -glicerofosfato y proteínas de la superfamilia del TGF, tales como las proteínas morfogénicas óseas (BMPs). La composición también puede contener antibiótico, antimicótico, antiinflamatorio, inmunosupresor y otros tipos de agentes terapéuticos, conservantes y excipientes.

La composición de la invención resulta útil para el tratamiento de un defecto óseo en un animal, particularmente un mamífero y todavía más particularmente un ser humano, que necesita de dicho tratamiento, mediante la administración en el defecto óseo de dicho animal de una cantidad regeneradora del defecto óseo de la composición de la invención.

Las investigaciones informadas en la presente invención confirman el potencial de cicatrización *in vivo* de la médula ósea fresca o de CMMs administradas en la matriz separadamente, o en la matriz en combinación.

La invención también contempla la utilización de otros componentes de la matriz extracelular, conjuntamente con las células, de manera que se consigan propiedades osteoconductoras u osteoinductoras.

La médula o las células madre mesenquimales aisladas pueden ser autólogas, alogénicas o proceder de fuentes xenogénicas, y pueden ser embrionarias o de fuentes post-natales, con la condición de que las células madre mesenquimales no sean células madre embrionarias humanas. Las células de médula ósea pueden obtenerse de la cresta ilíaca, fémures, tibias, columna, costillas u otros espacios medulares. Entre otras fuentes de células madre mesenquimales humanas se incluyen el saco vitelino embrionario, la placenta, el cordón umbilical, el periostio, la piel fetal y adolescente y la sangre. Con el fin de obtener células madre mesenquimales, resulta necesario aislar las raras células madre mesenquimales pluripotentes de otras células en la médula ósea o en otra fuente de CMM.

ES 2 329 953 T3

En una forma de realización particularmente preferida, la composición de la invención comprende un implante absorbible, que contiene médula completa y/o CMMs aisladas para la reparación de defectos segmentarios, fusiones o no uniones espinales y otros defectos óseos. Los implantes adaptados de matriz de células que contiene médula ósea autóloga, alogénica o xenogénica y/o CMMs pueden administrarse utilizando técnicas quirúrgicas abiertas, técnicas artroscópicas o la inyección percutánea.

Las células madre mesenquimales humanas (CMMhs) pueden proporcionarse en forma de preparaciones homogéneas expandidas en cultivo derivadas de médula completa (o de otra fuente prenatal o postnatal de CMMhs autólogas o alogénicas), de cultivos enriquecidos en CMMhs o heterogéneos, o de médula completa fresca (en el caso de que se combine con un medio osteoinductor u otro medio optimizado) que contenga una dosis efectiva de por lo menos aproximadamente 10^3 , preferentemente de aproximadamente 10^4 , CMMs por mililitro de composición. La clave de los resultados clínicos efectivos, en la presente forma de realización utilizando terapia de CMMs, es proporcionar al paciente el número de células madre mesenquimales enriquecidas o expandidas en cultivo, o aproximadamente el mismo número en un medio optimizado, que repare el hueso u otro defecto de tejido en un grado superior al del volumen de médula completa equivalente al del defecto. Se hace referencia a lo anterior como "umbral regenerativo de las CMMs", o aquella concentración de CMMs necesaria para conseguir la reparación directa del defecto de tejido. El umbral regenerativo de las CMMs puede variar según: 1) el tipo de tejido (es decir, hueso, cartílago, ligamento, tendón, músculo, estroma medular, dermis y otros tejidos conectivos), 2) el tamaño o extensión del defecto de tejido, 3) la formulación con el portador farmacéutico, y 4) la edad del paciente.

En una forma de realización preferida, la composición comprende además por lo menos un factor bioactivo que induce o acelera adicionalmente la diferenciación de dichas células madre mesenquimales en el linaje osteogénico. Preferentemente, las células se ponen en contacto con el factor bioactivo *ex vivo*, mientras se encuentran en la matriz, o se inyectan en el sitio del defecto durante o después de la implantación de la composición de la invención. Resulta particularmente preferido que el factor bioactivo sea un elemento de la superfamilia de TGF- β , que comprende diversos factores de crecimiento de tejidos, particularmente proteínas morfogenéticas óseas, tales como por lo menos una seleccionada de entre el grupo constituido por BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6 y BMP-7.

En la forma de realización que utiliza una matriz de base gelatina, una esponja, polvos o película de gelatina absorbible apropiada es la gelatina reticulada, por ejemplo Gelfoam[®] (Upjohn, Inc., Kalamazoo, MI) que se forma a partir de colágeno desnaturalizado. La matriz de base gelatina absorbible puede combinarse con las células reparativas de hueso y, opcionalmente, otros ingredientes activos, mediante inmersión de la esponja de gelatina absorbible en una suspensión celular de células de la médula ósea y/o CMMs, en la que el líquido de la suspensión puede presentar otros ingredientes activos disueltos en la misma. Alternativamente, puede transferirse una cantidad predeterminada de una suspensión celular sobre la esponja de gelatina, de manera que pueda absorberse la suspensión celular.

En la forma de realización que utiliza una matriz basada en celulosa, una celulosa absorbible apropiada es material laminar de celulosa oxidada regenerada, por ejemplo Surgicel[®] (Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ), que se encuentra disponible en la forma de tiras de diverso tamaño, u Oxycel[®] (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), que se encuentra disponible en la forma de almohadillas, compresas y tiras de diverso tamaño. La matriz basada en celulosa absorbible puede combinarse con las células óseas reparativas y, opcionalmente, con otros ingredientes activos mediante inmersión de la matriz basada en celulosa absorbible en una suspensión celular de las células de médula ósea y/o CMMs, en la que la suspensión líquida puede presentar otros ingredientes activos disueltos en la misma. Alternativamente, puede transferirse una cantidad predeterminada de una suspensión celular a la parte superior de la matriz basada en celulosa, de manera que pueda absorberse la suspensión celular.

En la forma de realización que utiliza una matriz basada en colágeno, un colágeno reabsorbible apropiado es colágeno de corion bovino purificado, por ejemplo Avitene[®] (MedChem, Woburn, MA), que se encuentra disponible en diversos tamaños de malla no tejida y espuma fibrosa, Helistat[®] (Marion Merrell Dow, Kansas City, MO), que se encuentra disponible en forma de polvos. La matriz de base colágeno reabsorbible puede combinarse con las células reparativas de hueso y, opcionalmente, otros ingredientes activos, mediante inmersión de la matriz de base colágeno reabsorbible en una suspensión celular de las células de médula ósea y/o CMM, en la que el líquido de suspensión puede presentar otros ingredientes activos disueltos en el mismo. Alternativamente, puede transferirse una cantidad predeterminada de una suspensión celular a la parte superior de la matriz de base colágeno, de manera que pueda absorberse la suspensión celular.

Las matrices anteriormente indicadas de base gelatina, de base celulosa y de base colágeno pueden, opcionalmente, presentar propiedades hemostáticas.

Los ingredientes activos preferidos son los agentes biológicos que incrementan la cicatrización de heridas o la regeneración de hueso, particularmente las proteínas recombinantes. Dichos ingredientes activos se encuentran presentes en una cantidad suficiente para incrementar la cicatrización de una herida, es decir, una cantidad efectiva para la cicatrización de heridas. La cantidad real del ingrediente activo será determinada por el médico responsable y dependerá de factores diversos, tales como la severidad de la herida, la condición del paciente, la edad del paciente y cualquier lesión colateral o condiciones médicas presentadas por el paciente. Generalmente, la cantidad de ingrediente activo se encuentra comprendida entre aproximadamente 1 pg/cm^2 y 5 mg/cm^2 .

Ejemplos

La exposición en los Ejemplos 1 a 5 referente a la utilización de cerámica porosa como matriz se proporciona meramente a título comparativo.

Ejemplo 1

Reparación de defecto de hueso en la rata

Materiales y métodos

Materiales

Se adquirieron, dexametasona (Dex), β -glicerofosfato sódico (β GP), antibiótico penicilina/estreptomicina y el kit nº 85 de histoquímica de fosfatasa alcalina, de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), y medio de cultivo de tejidos DMEM-LG (DMEM) de GIBCO Laboratories (Gran Island, NY), y ácido L-ascórbico 2-fosfato (AsAP) de Wako Chemical (Osaka, Japón). Se adquirió suero de feto bovino (FBS) de GIBCO tras un protocolo extenso de ensayo y selección (80). La cerámica de hidroxiapatito poroso/fosfato β -tricálcico (HA/TCP), tamaño medio de poro comprendido entre 200 y 450 μ m, fue generosamente proporcionada por Zimmer, Inc. (Warsaw, IN). Todos los demás reactivos rutinarios utilizados eran de grado analítico.

Aislamiento y cultivo de CMMs

Se llevó a cabo el aislamiento y expansión en cultivo de las CMMs siguiendo los métodos anteriormente publicados (32). Brevemente, se sacrificaron ratas Fischer F344 macho (de 200 a 275 g) mediante sobredosis de pentobarbital. Se recuperaron las tibias y fémures mediante disección bajo condiciones estériles, se cortaron los extremos metafisarios de los huesos y se expulsaron los tapones de la médula haciendo pasar solución salina por una aguja insertada en un extremo del hueso. Los coágulos de médula agrupados se dispersaron mediante pipeteado suave, seguido del pase secuencial a través de una serie de agujas más pequeñas, rindiendo una suspensión de células individuales. A continuación, las células se centrifugaron durante diez minutos a 900xg y se resuspendieron en DMEM que contenía FBS al 10% (medio de control). Se sembraron cincuenta millones de células nucleadas en placas de Petri (de sesenta cm²) en siete mililitros de medio de control y se cultivaron a 37°C en presencia de 5% de CO₂. Las células no adherentes se eliminaron en el momento del primer cambio de medio, cuatro días después de la siembra en placa y posteriormente las células se alimentaron rutinariamente dos veces por semana. Estos cultivos primarios alcanzaron la confluencia típicamente a los trece días, liberándose después mediante una exposición de cinco minutos a tripsina al 0,25% que contenía EDTA 1 milimolar, y se subcultivaron a una densidad de 10⁴ células/cm². Las células para el implante se derivaron de dichos cultivos de primer pase diez días después de la nueva siembra en placa, momento en el que eran confluentes aproximadamente al 85%.

Ensayos osteogénicos in vitro

Al final del primer pase, las CMMs se sembraron nuevamente en placas de seis pocillos a una densidad de 10⁴ células/cm² en medio de control. El día siguiente (día 0), se proporcionó un medio de control fresco y las células se cultivaron en ausencia o en presencia de suplementos osteogénicos (OS) (Dex 100 nanomolar, AsAP 0,05 milimolar y β -GP diez milimolar) (64). Se llevaron a cabo cambios de medio dos veces por semanas y en los días siete, catorce, veintiuno y veintiocho, los cultivos se analizaron para número de células, histoquímica de la fosfatasa alcalina (APasa) y producción de matriz mineralizada utilizando las técnicas indicadas anteriormente (64).

Preparación del implante

Se conformaron bloques de HA/TCP en cilindros de aproximadamente cuatro milímetros de diámetro y ocho milímetros de longitud. Se excavó un canal central de aproximadamente un milímetro de diámetro a través de la longitud completa del cilindro utilizando una aguja hipodérmica de calibre dieciocho. Los cilindros se limpiaron mediante sonicación y se enjuagaron en agua destilada y después se esterilizaron con calor seco a 220°C durante cinco horas. Los cilindros posteriormente se recubrieron con fibronectina plasmática humana (Calbiochem, Irvine, CA) mediante inmersión en una solución de 100 microgramos por mililitro durante dieciséis horas a 4°C. A continuación, los implantes se secaron al aire a temperatura ambiente durante la noche en una cabina de bioseguridad estéril, y se almacenaron a 4°C. Los cubos de HA/TCP, que medían tres milímetros por cara, se prepararon y recubrieron de manera similar con fibronectina tal como se ha indicado anteriormente, para la utilización en el ensayo de osteogénesis ectópica.

Los implantes de HA/TCP, en forma tanto de cubo como de cilindro, se cargaron con CMMs utilizando una modificación de una técnica descrita anteriormente (32, 83). Brevemente, se introdujeron los implantes en una suspensión de CMMs (7,5 x 10⁶ células/ml) en DMEM libre de suero. El recipiente de carga se tapó y los implantes se sometieron a un vacío en tres pulsos de cinco segundos para eliminar el aire presente dentro de los poros de la HA/TCP y para facilitar el flujo de líquido hacia el interior de los poros. Los recipientes de carga se taparon laxamente, se introdujeron en un incubador de cultivos de tejido durante dos horas y se agitaron suavemente cada treinta minutos hasta el momen-

to de la cirugía. Los cilindros de control libres de células se trataron idénticamente, con la notable excepción de que el medio DMEM libre de suero no contenía células. El tercer grupo de implantes se diseñó para aproximar generosamente el control clínicamente relevante de aspirado fresco de médula ósea. Inmediatamente antes de la implantación, se obtuvieron suspensiones celulares frescas de médula tal como se ha indicado anteriormente, se centrifugaron durante diez minutos a 900xg y se resuspendieron en un volumen de DMEM libre de suero que recubriese cada cilindro con el número de células de médula ósea derivado de un fémur entero, aproximadamente cincuenta millones (144, 145). Los implantes de HA/TCP se cargaron con esta médula fresca haciéndolos rodar en la suspensión cuajada de médula.

Modelo quirúrgico y diseño experimental

El modelo de hueso femoral de rata descrito en la presente memoria es una modificación de uno utilizado ampliamente para estudiar la reparación de los huesos largos (34, 37, 61, 83, 105, 126, 129, 144, 145, 147). Brevemente, se expusieron ambos fémures de ratas F344 macho (de 300 a 350 g) mediante aproximación anterolateral. Se elevó el tejido y músculo blandos manteniendo el periostio intacto a lo largo de la superficie del hueso. Se fijó una placa de fijación de polietileno (cuatro por cuatro por veintitrés milímetros) (Hospital for Special Surgery, New York, NY) al aspecto anterolateral de cada fémur con cuatro alambres Kirschner roscados y dos alambres de cerclaje (Zimmer, Warsaw, IN). Se eliminó un segmento transversal de ocho milímetros de la diáfisis central, conjuntamente con su periostio adherente, utilizando una fresa rotatoria para osteotomía, bajo irrigación con solución salina. Estos defectos segmentarios estabilizados se dejaron vacíos o se sustituyeron por un cilindro de HA/TCP libre de células, por un cilindro cargado con CMMs o por un cilindro cargado con una suspensión fresca de células medulares. Los implantes se fijaron con dos suturas de Vycril 4-0 (Ethicon, Somerville, NJ) circundando la cerámica y la placa de fijación. Se yuxtapusieron los músculos, y se cerraron rutinariamente las fascia y la piel, por capas. Las ratas con implante de cilindros cargados con CMMs también recibieron implantes subcutáneos de los cubos de HA/TCP cargados con CMMs para correlacionar el ensayo de osteogénesis ectópica con la regeneración ósea ortotópica y el potencial osteogénico *in vitro* de las CMMs singénicas. Las ratas con implante de cilindros cargados con médula de manera similar recibieron implantes subcutáneos de cubos cargados de médula. Postoperatoriamente se permitió la actividad completa de los animales en sus jaulas. Ningún animal experimentó un fallo de la fijación ni otras complicaciones postoperatorias. Se utilizaron por lo menos seis extremidades para cada uno de los grupos de implante, seleccionados aleatoriamente entre izquierdo y derecho. Tras el sacrificio, a las cuatro y ocho semanas, se perfundió con tinta china el árbol vascular de algunos animales y se diseccionó cuidadosamente el fémur entero y el tejido blando circundante. Los especímenes se evaluaron radiográficamente de inmediato y se procesaron posteriormente para histología no descalcificada.

Análisis radiográfico

Los especímenes se radiografiaron utilizando un sistema de formación de imágenes Faxitron de alta resolución (Buffalo Grove, IL) con una exposición de treinta y cinco kVP durante treinta segundos. Las radiografías fueron independientemente evaluadas por dos de los autores, que eran ciegos respecto a la duración y tipo del implante. La formación de hueso se puntuó en una escala semicuantitativa con los intervalos siguientes: unión distal de huésped-implante (0 a 2), unión proximal de huésped-implante (0 a 2) y densidad del núcleo del implante (0 a 4). Se sumaron las puntuaciones de la unión y las puntuaciones de densidad del núcleo, proporcionando una puntuación máxima posible de ocho para cada implante. Se promediaron los resultados de ambos examinadores para proporcionar las puntuaciones finales.

Histología e histomorfometría

Tras la fijación en formalina tamponada al 10%, se deshidrataron los fémures, se aclararon y se incluyeron en polimetilmetacrilato. Se cortaron secciones longitudinales en una sierra Isomet enfriada con agua (Buehler, WI) y se molió una sección central de cada pata hasta un espesor de 100 micrómetros, se pulió y se tiñó con azul de toluidina O. Se utilizó software de análisis de imágenes Leica Quantimet 500MC (Cambridge, Reino Unido) para determinar el área de implante de HA/TCP, hueso y tejido blando en la región de defecto diafisario de cada sección. Los datos se analizaron mediante análisis de la varianza con un factor (ANOVA) (Sigmastat, Jandel Scientific). Se llevaron a cabo análisis adicionales con ensayos post-hoc de Student-Newman-Keuls.

De manera similar se fijaron en formalina cubos de cerámica implantados subcutáneamente, después se descalcificaron, se deshidrataron, se incluyeron en parafina, se cortaron en secciones en serie y se tiñeron con azul de toluidina O.

Resultados

Cultivo de CMMs y diferenciación osteogénica in vitro

Se establecieron cultivos de CMMs de rata a partir de animales singénicos y, transcurridos siete días, formaron colonias características sobre la superficie de la placa de cultivo (fig. 1A). Aparecieron varios cientos de colonias de CMM a partir de los cincuenta millones de células nucleadas sembradas en cada placa de sesenta cm². Basándose en esta observación, las CMM de rata, al igual que las CMM humanas (13, 54), aparentemente se encuentran presentes con una frecuencia de aproximadamente una por cada 10⁵ células nucleadas medulares. Los cultivos primarios de CMM subcultivados el día catorce se unieron uniformemente a la superficie de las placas nuevas, y se dejaron dividir durante

aproximadamente diez días o hasta que las placas presentaban una confluencia de ~85%. Las células transferidas también demostraban una morfología característica (fig. 1B) y se dividieron uniformemente sobre la placa, resultando en una distribución uniforme de las CMMs en toda la placa. Las células derivadas de dicho primer pase se utilizaron para preparar implantes tal como se ha indicado anteriormente, y se utilizó una alícuota para confirmar el potencial osteogénico *in vitro* de las CMMs de rata.

Siete días después de la nueva siembra en placa para el ensayo osteogénico, los cultivos de control y tratados con OS estaban compuestos de células de forma ahusada, entre el 40% y el 50% de las cuales se tiñeron para APasa. Durante los siguientes veintiún días, las células de control siguieron siendo fibroblásticas, incrementaron su APasa de superficie celular, pero no experimentaron cambios morfológicos asociados al desarrollo de nódulos de hueso mineralizado (fig. 1C). En contraste, los cultivos tratados con OS iniciaron la formación de agregados de células poligonales y cuboidales intensamente teñidas para APasa, y el día veintiuno, los cultivos habían formado nódulos osteoides característicos que contenían depósitos minerales con tinción von Kossa. La mineralización adicional de estos nódulos hasta el día veintiocho (fig. 1D) se vio acompañada por una reducción de la tinción de APasa, especialmente dentro de las regiones internodulares.

Osteogénesis mediada por CMMs en implantes de HA/TCP ectópicos

Todos los cubos de HA/TCP cargados de CMMs implantados en las ratas huésped presentaban claros indicios de osteogénesis transcurridas cuatro semanas. A las ocho semanas, se encontró una cantidad sustancial de hueso, y ocasionalmente de cartílago, dentro de los poros de los cubos. En la figura 2 se muestra una sección representativa de un cubo cargado de CMMs recolectado ocho semanas después del implante. Las áreas granulares no teñidas reflejan las regiones que anteriormente contenían el material cerámico que ha sido extraído durante la etapa de descalcificación de la preparación del espécimen. Tal como se observa en la fotomicrografía, la formación de hueso se produce dentro de los poros de los cubos y se asocia a elementos vasculares que penetran en el implante. Este tipo de angiogénesis resulta necesario para la formación de hueso nuevo, debido a que la actividad secretoria de los osteoblastos es un fenómeno orientado que es guiado por la vasculatura. Puede observarse hueso tanto fibroso como lamelar, dependiendo de la duración del implante y de la región precisa examinada. La mayoría de los poros se encuentra llena de hueso y de pequeñas islas de elementos hematopoyéticos, encontrándose el resto lleno de tejido conectivo laxo. En contraste con estas muestras cargadas de CMMs, los cubos cargados de médula fresca contenían cantidades negligibles de tejido óseo a las cuatro semanas y sólo una cantidad ligeramente superior a las ocho semanas. Tal como se ha demostrado anteriormente (32, 54), los cubos implantados sin CMMs ni médula no contenían hueso, aunque se encontraban llenas de tejido fibroso y de vasos sanguíneos.

Evaluación radiográfica

Las radiografías Faxitron de alta resolución proporcionaron imágenes suficientemente claras y detalladas para distinguir cambios sutiles producidos dentro del implante y en el hueso huésped circundante. La figura 3 muestra unas radiografías representativas de los fémures de cada uno de los grupos, recuperados en las cuatro y ocho semanas posteriores al implante. Tal como se demuestra en estas radiografías, la fijación siguió intacta en todas las muestras y no se produjeron fracturas en ninguno de los fémures. En los animales cuyos defectos femorales se dejaron vacíos, se observó a las cuatro semanas la formación de hueso reactivo en los márgenes cortados transversalmente del fémur huésped (fig. 3A). A las ocho semanas se encontraba presente ligeramente más hueso dentro del hueco, sin embargo la mayor parte del hueso aparentemente se había formado a lo largo del margen de la placa de fijación que se encontraba en contacto con el periostio (fig. 3B). Todos los especímenes que se dejaron vacíos resultaron en la formación de una no unión radiográfica. Algunas extremidades, con independencia del grupo, también contenían una espícula excéntrica de hueso que habitualmente se encontraba en el exterior del defecto, enfrente de la placa de fijación.

Al implantarse el cilindro de HA/TCP, se formó una cantidad negligible de hueso reactivo en los márgenes cortados del fémur. Debido al contenido mineral del material del implante (HA/TCP), pueden apreciarse los detalles estructurales del implante mismo en la evaluación radiográfica. Los detalles del canal central y de los poros resultan claramente visibles en las radiografías de las cuatro semanas (fig. 3C) y sirven para proporcionar una importante línea base para la comparación con otras imágenes radiográficas. Puede apreciarse borrosidad de los márgenes de los poros a las ocho semanas (fig. 3D) en estos implantes sin células. Resulta importante que la falta de unión entre el implante y el huésped se manifieste como una zona clara de radiolucencia entre el implante mismo y los márgenes cortados del fémur en todos los animales a las cuatro semanas. En contraste con el grupo de portador solo a las cuatro semanas, los animales que recibieron cilindros de HA/TCP cargados de CMMs mostraron la formación sustancial de hueso nuevo dentro de los poros del implante a las cuatro semanas (fig. 3E). Se utilizó la radiodensidad creciente y la eliminación de la aparente estructura de los poros como indicación de la formación de hueso nuevo dentro del núcleo del implante. Aunque la integración del implante, o unión, no se podía observar a las cuatro semanas, la formación posterior de un puente óseo radiodenso entre el implante y el huésped enmascaró por completo la interfaz implante-huésped. A las ocho semanas, el implante cargado de CMM era contiguo y se encontraba completamente integrado con el hueso normal del huésped (fig. 3F). Los implantes de HA/TCP cargados de médula fresca aparentemente no produjeron hueso radiodenso dentro de los poros en ningún punto del tiempo, aunque resultó evidente una integración modesta con los extremos cortados del hueso del huésped a las ocho semanas (figs. 3G y 3H).

ES 2 329 953 T3

En la Tabla 1 se proporciona la media de las puntuaciones radiográficas en cada punto del tiempo para cada grupo de implantes.

TABLA 1

Media de puntuaciones radiográficas para cada grupo de implantes

	Cuatro semanas			Ocho semanas		
	C sólo	C + CMMs	C + M	C sólo	C + CMMs	C + M
Unión proximal	1,5	0,8	0,2	1,2	1,3	1,0
Unión distal	0,5	1,4	0,7	1,2	2,0	1,6
Densidad del núcleo	0,7	2,0	0,3	0,6	3,7	0,7
Puntuación total	2,7	4,2	1,2	3,0	7,0*	3,3

Tabla 1. Media de puntuaciones radiográficas para cada grupo de implantes en cada punto del tiempo. C=portador, M=médula. Las radiografías fueron evaluadas y puntuadas por dos observadores independientes ciegos para la identidad de cada implante. Se puntuó la unión tanto proximal como distalmente en una escala de 0 a 2. Se puntuó la densidad del núcleo en una escala de 0 a 4. n=3 para cada grupo en cada punto del tiempo. La puntuación total máxima posible era de 8. El análisis de la varianza con un factor en los dos puntos diferentes del tiempo, con la carga de células (ninguna, CMMs y médula) como la variable independiente, mostró diferencias significativas entre grupos a las 8 semanas (F=10,9, p=0,01), aunque no eran significativamente diferentes a las cuatro semanas. *=significativamente mayor (p<0,05) que otros grupos en el punto temporal correspondiente (según los ensayos post-hoc de Student-Newman-Keuls).

En el caso de los defectos rellenados de únicamente portador de HA/TCP, las bajas puntuaciones indican la ausencia de material radiodenso dentro de los poros y la unión mínima del implante con el hueso del huésped. La carga del implante de HA/TCP con médula fresca no resultó en una mejora de la cicatrización del defecto, y las bajas puntuaciones reflejan la similitud entre este grupo y el grupo de portador solo. Sin embargo, la carga con CMMs del portador de HA/TCP produjo una vigorosa respuesta osteogénica. Incluso a las cuatro semanas, ya se observaba el relleno de los poros, lo que se refleja en las puntuaciones considerablemente más altas de estos implantes. Resulta interesante, incluso en este caso, que la unión huésped-implante fuese modesta en comparación con los controles. Transcurridas ocho semanas, los poros del implante se encontraban llenos de hueso nuevo y la unión huésped-implante se encontraba bien establecida.

Evaluación histológica e histomorfométrica

La evaluación histológica de las muestras confirmó las observaciones realizadas en las radiografías. En los defectos vacíos, la formación de hueso reactivo aparentemente aparecía en los márgenes cortados de los córtex y endosteo del huésped. Incluso a las ocho semanas no se había generado un puente a través del defecto y se había formado una no unión fibrosa en el centro del hueco segmentario. Las fotomicrografías de secciones representativas de los grupos de implante recuperadas a las cuatro y a las ocho semanas se muestran en la figura 4. En los defectos rellenados con el portador de HA/TCP solo, los poros del implante se llenaron con tejido fibroso (fig. 4A) y se encontraban bien vascularizados, según se determinó mediante inyección de tinta china. No pudo observarse hueso dentro de los poros del implante y se había producido una integración limitada con el huésped. Incluso a las ocho semanas, la mayoría de los poros se encontraba vacía de hueso, a pesar de que resultaba evidente una vascularización significativa en la fotomicrografía (fig. 4B). Se encontraba presente una cantidad pequeña de hueso nuevo en los contactos huésped-implante y en un extremo de dicho implante representativo; aparentemente avanzaba el hueso endostial derivado del huésped hacia el interior del canal medular del implante. La formación de hueso en muestras cargadas con médula fresca fue muy similar a la del grupo de portador de HA/TCP solo (figs. 4E y F). Sin embargo, pudo observarse una cantidad modesta de hueso nuevo dentro de los poros del implante a las ocho semanas, correlacionado con los resultados de los implantes ectópicos. La unión de estos implantes fue similar a la observada con los implantes sin células; la formación de hueso reactivo penetró ligeramente en los poros en los extremos del implante.

En contraste con la escasa osteogénesis resultante de la adición de médula fresca al HA/TCP, la mayoría de los poros de los implantes cargados de CMMs contenía una cantidad considerable de hueso nuevo a las cuatro semanas (fig. 4C). Nuevamente, todavía existía un límite claro entre los márgenes cortados del hueso del huésped y los extremos del implante. A las ocho semanas, prácticamente todos los poros se encontraba lleno de hueso nuevo, excepto en algunas áreas discretas en las que la carga de CMMs había sido subóptima. Resulta interesante que la formación sustancial de hueso nuevo se produjo en la interfaz entre el huésped y el implante, conduciendo a un área continua de hueso que cruzaba el defecto (fig. 4D). Además, también se encontraba presente un callo periostial en las muestras cargadas de CMMs (fig. 4D), pero no en los otros tipos de implante. El hueso formado dentro de los poros y en los extremos de estos implantes representa formación *de novo* de hueso, es altamente celular y se presenta en las fotomicrografías de magnificación más elevada, en la figura 5. Puede observarse hueso nuevo fibroso y lamelar en

ES 2 329 953 T3

contacto íntimo con el margen cortado del córtex del huésped a las ocho semanas (fig. 5A). Resulta importante que esta región de la unión es directamente contigua al hueso formado atravesando los poros del implante. En las regiones más profundas del interior del HA/TCP, el llenado de los poros con hueso nuevo resulta evidente, así como la vasculatura asociada, que orienta la actividad secretoria de los osteoblastos en diferenciación (fig. 5B).

Los resultados que anteriormente se han descrito cualitativamente se reflejan en los datos histomorfométricos presentados en la Tabla 2.

TABLA 2

Portador solo	Portador + CMMs	Portador + médula
$23 \pm 1,5$	$19,3 \pm 3,7^*$	$2,9 \pm 1,7$
$10,4 \pm 2,4$	$43,3 \pm 7,7^*$	$17,2 \pm 6,0$

Tabla 2. Relleno óseo en implantes de HA/TCP como porcentaje del espacio disponible. Se obtuvieron mediciones histomorfométrico en el hueso formado dentro de los límites de la resección segmentaria, excluyendo el material del implante mismo y el canal medular. Los valores se informan como medias de tres muestras junto con las desviaciones estándar de la media. El análisis de la varianza con un factor en los dos puntos temporales diferentes, con carga celular (ninguna, CMMs y médula) como la variable independiente, mostró una diferencia significativa entre las muestras cargadas de CMM tanto a las 4 semanas ($F=43,3$, $p<0,001$) como a las 8 semanas ($F=26,2$, $p<0,002$). *=significativamente mayor ($p<0,01$) que en otros grupos en los puntos temporales correspondientes (según los ensayos post-hoc de Student-Newman-Keuls). No se observó diferencia entre médula y portador solo en ninguno de los puntos temporales ($p>0,1$).

Los implantes de HA/TCP sin células presentaban una fracción ósea de sólo 2,3% y 10,4% a las cuatro y a las ocho semanas, respectivamente. Resulta importante que esta fracción ósea a las ocho semanas se correlaciona con resultados publicados anteriormente (126). Estas fracciones representan principalmente el crecimiento de hueso desde los extremos cortados de los córtex del huésped. Los cilindros de HA/TCP cargados de médula mostraron una osteogénesis modesta dentro del cuerpo del implante y consecuentemente presentaban un valor ligeramente más alto de 17,2% a las ocho semanas. Resulta importante que a las cuatro semanas, las muestras cargadas de CMM excedían el valor de las ocho semanas para los otros dos grupos. El relleno óseo de 19,3% en este punto temporal de las cuatro semanas probablemente es atribuible a la osteogénesis mediada por las CMMs. La fracción ósea media dentro del implante se incrementó con el tiempo, alcanzando 43% a las ocho semanas. El ANOVA con un factor llevado a cabo en los datos conjuntamente con los ensayos de Student-Newman-Keuls demostró que tanto a las cuatro como a las ocho semanas, el tratamiento de CMM era significativamente mejor que el portador solo o que el portador cargado de médula ($p<0,01$). No se detectaron diferencias significativas entre implantes con portador solo y cargados con médula. La fracción en volumen de portador de HA/TCP permaneció constante y sirvió de control interno para el sistema histomorfométrico. Aunque los defectos vacíos presentaban 34% de relleno óseo a las ocho semanas, no se observaron puentes a través del defecto y de esta manera se clasificarían como no unión clínica.

Comentario

En el presente estudio, se ha demostrado que las células progenitoras singénicas expandidas en cultivo y purificadas son capaces de cicatrizar un defecto óseo clínicamente significativo en un modelo animal bien establecido. Estas células progenitoras se denominan células madre mesenquimales debido a que dan lugar no sólo a hueso (11, 32, 54, 64), sino también a cartílago (32, 66, 80, 142), músculo (121, 143), tendón (23) y un tejido estromal que proporciona un soporte para la diferenciación hematopoyética (87). Aunque el potencial osteogénico de las CMMs tanto animales como humanas ha sido demostrado mediante implantes subcutáneos en ensayos ectópicos, al conocimiento de los presentes inventores no se ha informado de estudios cuantitativos y rigurosos que establezcan la capacidad de las CMMs expandidas en cultivo de regenerar grandes defectos óseos segmentarios. La combinación de CMMs con un material de implante HA/TCP poroso se ha demostrado en el presente estudio que resulta una estrategia efectiva para la cicatrización de grandes defectos óseos segmentarios. La investigación actual corrobora adicionalmente que, en comparación con la médula fresca, las CMMs producen significativamente más hueso al introducirse en un sitio ectópico u ortotópico. Basándose en estos resultados, se ha iniciado el perfeccionamiento de su enfoque a las terapias con células autólogas para la regeneración de defectos esqueléticos.

Con el fin de caracterizar adicionalmente las células utilizadas en el presente estudio, se cultivaron las mismas en presencia y en ausencia de un medio que induce la diferenciación osteogénica *in vitro*. De la misma manera que se ha informado en numerosos otros laboratorios (77, 88, 89, 118, 135), estas células derivadas de médula de rata se desarrollan siguiendo el linaje osteogénico en respuesta a la dexametasona, formando finamente nódulos mineralizados de tejido osteoide sobre la superficie de la placa. Este tipo de diferenciación resulta evidente en las fotomicrografías de la presente invención (fig. 1) y sirve para documentar que las células utilizadas en estos implantes en efecto presentan la capacidad de formar hueso, una de las propiedades inherentes de las CMMs. Además, el hueso y el cartílago formados en cubos implantados subcutáneamente no sólo confirma el potencial osteocondral de las CMMs, sino que actúa de control interior para verificar que todas las ratas huésped fueron capaces de proporcionar un ambiente que podía

proporcionar soporte a la osteogénesis dentro de estos implantes combinados de células:matriz. No se han incluido como parte del presente estudio experimentos adicionales que documenten el potencial multilíneaje de estas células, debido a que algunas publicaciones anteriores se han centrado en la descripción de dicho potencial en más detalle (32, 79, 80, 121, 143). Los procedimientos de aislamiento y selección de CMMs de rata resultan similar a los utilizados para las CMMs humanas (32, 54, 80) y resultan en la formación de colonias primarias características, ilustradas en la figura 1A. Estas células se expanden mitóticamente para rendir una población morfológicamente homogénea que se divide uniformemente en toda la placa. Se ha demostrado que las CMMs tanto humanas como de rata presentan un potencial multilíneaje, y los detalles de la diferenciación osteogénica *in vitro* de las CMMs humanas han sido informados recientemente (33, 64). Se han optimizado las condiciones para el aislamiento y expansión en cultivo de las CMMs humanas sin progresión del linaje (13, 54, 80) y se ha completado el desarrollo de un medio libre de suero para el crecimiento de las CMMs humanas (58).

Los resultados radiográficos en el presente estudio establecen un precedente para la obtención de datos de pruebas no invasivas de la regeneración ósea en animales, o seres humanos, que han recibido CMMs en una localización ortotópica. Dada la naturaleza porosa de los implantes de HA/TCP, el hueso nuevo que se forma dentro de los intersticios del material resulta fácilmente evidente en radiografías a las cuatro semanas, a pesar de la radiodensidad inherente del material de HA/TCP. El progresivo incremento de la radiodensidad evidente a las ocho semanas se correlaciona bien con las observaciones histológicas de las extremidades procesadas. Resulta interesante que, a pesar de la presencia de hueso nuevo dentro del núcleo de los implantes a las cuatro semanas, no se observó la integración en la interfaz huésped-implante hasta las ocho semanas. Las puntuaciones radiográficas medias para los tres grupos de implante documentan una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las CMMs y tanto los implantes cargados de médula como los implantes cerámicos a las ocho semanas, mientras que no se observaron diferencias significativas entre los implantes cargados de médula y los implantes cerámicos en ningún punto temporal.

Los estudios histológicos demuestran un crecimiento óseo aposicional sobre la superficie del HA/TCP en todo el núcleo del implante, lo que resulta consistente con observaciones anteriores de osteogénesis en implantes ectópicos cargados de CMMs (32, 47, 54). El hueso que se forma a las cuatro y a las ocho semanas en las muestras cargadas de CMMs es fibroso en muchas áreas, aunque también puede apreciarse hueso lamelar (figs 5A y 5B). Resulta crítico indicar que, durante el proceso de regeneración del defecto óseo, la formación de hueso se produce a través de la conversión directa de células mesenquimales en osteoblastos y no siguiendo una secuencia endocondral. A medida que continúa la regeneración del hueso en el sitio del defecto, se rellenan los poros de la cerámica con una cantidad más significativa de hueso, que se deposita sobre las paredes del implante o del hueso existente, y que orienta en su crecimiento la vasculatura en crecimiento invasivo. Estos vasos sanguíneos, visualizados mediante la inyección de tinta china en animales inmediatamente antes del sacrificio, también proporcionan una puerta para la entrada y el establecimiento de nuevas islas de médula que contienen elementos hematopoyéticos, así como CMMs derivadas del huésped. Se inicia el proceso de remodelado óseo, eventualmente sustituyendo el hueso del donante por hueso del huésped (47). En el margen del defecto, la integración del implante se consigue en continuidad directa entre el margen cortado del córtex del huésped y el hueso nuevo formado sobre la superficie del implante (fig. 5A). Debido a que únicamente se produce una unión mínima entre el huésped y el implante en ratas a las que se ha proporcionado cerámica cargada de médula o cerámica libre de células, la integración avanzada observada en la cerámica cargada de CMMs probablemente refleja la contribución combinada de CMMs implantadas y células derivadas del huésped. La falta de unión temprana en todas las muestras resultó inesperada a la luz del hecho de que los defectos que se habían dejado vacíos experimentaron una cantidad sustancial de formación de hueso reactivo en los márgenes cortados de los córtex. Resulta posible que la presencia de un implante en el sitio del defecto inhibiese la migración y/o el prolapso del mesénquima laxo circundante, contribuyendo a la formación de hueso reactivo en los defectos vacíos. Además, el microdesplazamiento de los cilindros implantados probablemente perjudicaría la unión estable en la interfaz.

La capacidad de las CMMs de regenerar un defecto segmentario grande en dicho modelo experimental se compara favorablemente con otras investigaciones que han sometido a ensayo implantes tales como matriz ósea desmineralizada, médula ósea, BMPs purificadas o recombinantes, aloinjertos, cerámicas y fibrometales (34, 37, 74, 83, 105, 126, 129, 144, 145, 147). Aunque la utilización de BMPs recombinantes ha recibido una atención considerable, sólo se ha identificado recientemente el mecanismo exacto de acción. Estas potentes moléculas inductoras actúan sobre células mesenquimales no diferenciadas, iniciando la cascada endocondral, resultando finalmente en la formación de hueso. Los estudios de células estromales no diferenciadas de rata confirman que BMP-2 actúa estimulando directamente el desarrollo de los osteoblastos, y que esta estimulación resulta incrementada por la adición de dexametasona (77). Otros han demostrado que la formación de hueso se produce en un sitio ortotópico al añadir médula fresca sola, pero que la tasa y extensión de la cicatrización es una función de la cantidad de médula y del número de células osteoprogenitoras residentes en la misma (26, 49, 129, 144). Un importante conjunto de experimentos llevado a cabo por Takagi y Urist (129) demuestra que la adición de BMPs no resulta efectiva en la cicatrización de defectos segmentarios en el caso de que se bloquee el acceso al canal y estroma medulares, indicando de esta manera que los constituyentes celulares de la médula son un requerimiento absoluto para la reparación ósea mediada por las BMPs. Estos resultados resultaron corroborados por unos estudios que indicaron que el implante de médula fresca conjuntamente con las BMPs en un modelo de hueso segmentario en la rata resulta más efectivo que cualquiera de los componentes implantado por sí solo (74). Podría concluirse a partir de todo lo anterior que los progenitores mesenquimales derivados de la médula, o CMMs, son la diana de las moléculas osteoinductoras endógenas, tales como las BMPs, que resultan liberadas durante la cicatrización ósea normal. Por lo tanto, se infiere que debe disponerse de un suministro adecuado de CMMs para responder a las señales normales (o de origen exógeno) de la reparación ósea, o de otro modo la cicatrización resultará débil.

Los datos histomorfométricos generados en el presente estudio proporcionan una base para la comparación con otras investigaciones. Al cargar médula fresca procedente de un fémur equivalente sobre un implante de HA/TCP, no se observa ninguna diferencia significativa en la formación de hueso comparado con implantes que no han recibido células. Lo expuesto anteriormente es cierto para ambos puntos temporales en el presente estudio, y probablemente refleja un número inadecuado de CMMs en el volumen de médula aplicado. En el caso de que se hubieran cargado los implantes con una cantidad considerablemente superior de médula, la presente invención y otras habrían predicho una mayor cicatrización del defecto óseo (74, 144). Sin embargo, se obtiene una aproximación generosa de un control clínicamente relevante apropiado mediante la aplicación de la población celular total obtenida a partir de un hueso largo, debido a que la extracción de toda la médula de múltiples huesos largos para la reparación de un defecto local contradice el juicio clínico ponderado. Resulta quizá más importante que las CMMs produjeron un relleno del hueso de 19,3% y 43,2% a las cuatro y a las ocho semanas, respectivamente. Al aplicar BMPs purificadas en un portador idéntico en el mismo modelo experimental, el relleno del hueso fue de 21% a las cuatro semanas y únicamente de 22% a las ocho semanas (126). Estos implantes de HA/TCP recubiertos de BMP no consiguieron un relleno óseo de 43 por ciento hasta transcurridas 16 semanas del implante. Aunque resultaron cantidades similares de hueso de ambos tipos de implante a las cuatro semanas, las CMMs produjeron el doble de hueso que las BMPs transcurridas ocho semanas. En esta formulación, las BMP necesitaron dieciséis semanas para formar la misma cantidad de hueso que el producido por las CMMs en sólo ocho semanas. Basándose en lo anterior, aparentemente las CMMs ofrecen una ventaja considerable respecto a la utilización de las BMPs solas, aunque alguna combinación de BMPs y CMMs podría proporcionar una reparación ósea incluso más vigorosa y rápida, tal como se ha comentado anteriormente.

Debido a que el número de células progenitoras en el sitio de la reparación es un factor crítico, resulta obligatoria la comparación entre implantes cargados de CMMs e implantes cargados de médula a este respecto. El número de células medulares nucleadas depositado sobre un implante fue de aproximadamente cincuenta millones; el mismo número que el recolectado de un solo hueso largo. Se utilizaron otros cincuenta millones de células para iniciar el cultivo de CMMs que finalmente proporcionó las células para un implante. A partir de estos cincuenta millones de células, se desarrollaron aproximadamente 500 colonias de CMMs, y estas células se expandieron mitóticamente hasta formar tres millones alcanzado el final del primer pase. Lo expresado anteriormente representa un incremento de 6.000 veces el número de CMMs al haberse producido aproximadamente doce duplicaciones de la población. Utilizando la técnica actual para cargar este tipo de implantes, aparentemente sólo aproximadamente 150.000 células se convirtieron en adherentes tras la incubación con la suspensión de CMMs (32). Sin embargo, la administración local de 150.000 CMMs purificadas incrementaría el número de células progenitoras 300 veces respecto al número normalmente presente en cincuenta millones de células medulares no fraccionadas. Basándose en estos cálculos, la ventaja que ofrece esta técnica respecto a otras estrategias de regeneración ósea es la administración directa de la maquinaria celular requerida para la formación de hueso. Este enfoque presentaría una ventaja extraordinaria en contextos en los que se reduce el número de células progenitoras endógenas, tal como el producido con el envejecimiento, la osteoporosis o una diversidad de otras condiciones patológicas (33, 72, 82, 118, 128, 135). Otros investigadores han seguido esta lógica, intentando administrar más células progenitoras simplemente mediante la concentración de la médula, mediante fraccionamiento crudo y separación de los glóbulos rojos, o mediante el cultivo de células estromales *in vitro* (26, 83, 103, 105, 144). Ahora que se han establecido técnicas y condiciones que permiten la expansión de CMMs humanas purificadas en cultivo en un factor de incluso mil millones sin pérdida de potencial osteogénico (13), no están lejos los protocolos clínicos análogos para la regeneración de defectos óseos humanos. Resultará posible acelerar adicionalmente el proceso de cicatrización dirigiendo estas CMMs expandidas en cultivo *ex vivo* hacia el linaje osteogénico previamente al implante, reduciendo de esta manera el intervalo *in situ* entre la implantación y su actividad biosintética como osteoblastos. Se están llevando a cabo esfuerzos adicionales para desarrollar vehículos de administración celular que proporcionen más flexibilidad al cirujano, incluyendo materiales que pueden conformarse para la adaptación a cualquier tipo de defecto. Mediante la combinación de un estímulo farmacológico, tal como las BMP, con un vehículo de administración todavía mejor, será posible ofrecer a los pacientes opciones terapéuticas que hasta el momento no se han encontrado disponibles.

50 Ejemplo 2

Cicatrización de defectos femorales caninos segmentarios grandes mediante terapia con células madre mesenquimales autólogas

55 El presente estudio demuestra que las células madre mesenquimales autólogas expandidas en cultivo pueden regenerar defectos óseos clínicamente significativos en un modelo animal grande.

Recientemente, se ha establecido la capacidad de las células madre mesenquimales (CMMs) derivadas de médula ósea singénica para reparar defectos segmentarios grandes en roedores (68). Estas CMMs pueden aislarse a partir de médula o periostio, expandir su número *ex vivo*, y administrarse nuevamente en el huésped en un vehículo portador apropiado. Los estudios en ratas han demostrado que la cantidad de hueso formado 8 semanas después de la implantación de las CMMs era el doble del resultante de las BMPs administradas en el mismo portador (68, 126). Con el fin de demostrar la viabilidad clínica de esta tecnología, el objetivo de los presentes inventores era regenerar los defectos óseos segmentarios en un animal grande, que puede someterse a ensayos biomecánicos estrictos. Para alcanzar este objetivo, se desarrolló un modelo canino de hueso femoral para comparar los datos radiográficos, histológicos y biomecánicos tras la implantación de un portador cargado de CMMs, de portador solo y de autoinjerto de hueso canceloso.

*Materiales y métodos**Cultivo y manipulación de CMMs*

5 Se obtuvo un aspirado de 15 cm³ de médula ósea a partir de la cresta ilíaca de cada animal, siguiendo un protocolo aprobado por el IACUC y se transportó sobre hielo mediante correo nocturno a las instalaciones de cultivo celular. El aislamiento de las CMMs caninas se llevó a cabo mediante centrifugación de aspirados de médula completa sobre un cojín de Percoll, utilizando procedimientos análogos a los desarrollados para el aislamiento de CMM humanas (54). Se sembraron matraces de cultivo de tejidos (185 cm²) con 10⁷ células nucleadas aisladas a partir del cojín y se cultivaron con DMEM que contenía suero de feto bovino al 10% de un lote seleccionado (80). Las células se subcultivaron a una densidad de 8 x 10³ células/cm² y se transportaron de vuelta al hospital veterinario, donde se mantuvieron hasta el momento de la implantación. Se prepararon implantes cargados de células mediante la incubación de cilindros porosos de hidroxiapatito-fosfato tricálcico (HA/TCP) recubiertos de fibronectina (Zimmer, Inc.) en una suspensión de 7,5 x 10⁶ células/ml de CMMs durante 3 horas a 37°C. El intervalo entre la recolección de la médula y la implantación fue de 16 días. También se cultivó una alícuota de células de cada preparación bajo condiciones osteoconductoras para cuantificar aspectos de diferenciación osteoblástica.

Modelo canino de hueso femoral

20 Se desarrolló un modelo de defecto femoral segmentario unilateral para el presente estudio tras la aprobación del IACUC. Bajo anestesia general se sometió a treinta y seis perros sabueso hembra esqueléticamente maduros (20 kg) a la resección de un segmento osteoperiosteal de 21 mm de longitud procedente de la diáfisis media. Se adaptó al contorno del aspecto lateral del hueso una placa de crecimiento de 8 orificios Synthes® de 4,5 mm, y se fijó con tornillos bicorticales. El defecto se rellenó con uno de los tres materiales siguientes: 1) un cilindro de HA/TCP sin células, 2) un cilindro de HA/TCP cargado de CMMs, o 3) hueso canceloso recolectado de la cresta ilíaca. Los implantes de HA/TCP se fijaron con dos suturas circundando el implante y la placa. Los animales recibieron antibióticos perioperatoriamente y se administraron analgésicos durante tres días postoperatoriamente.

Análisis radiográficos e histológicos

30 Se obtuvieron imágenes radiográficas estándares preoperatoriamente, inmediatamente después de las operaciones y a intervalos de 4 semanas hasta la finalización del estudio. Todas las muestras contenían una cuña escalonada de radiodensidad para proporcionar una base para la comparación de los cambios producidos en el tiempo y entre perros. Tras el sacrificio, los especímenes se sometieron a radiografía Faxitron de alta resolución y posteriormente se procesaron para la evaluación biomecánica. Tras el ensayo de torsión, se procesaron secciones longitudinales no descalcificadas para la histomorfometría cuantitativa.

Ensayo biomecánico

40 Dieciséis semanas después del implante, los animales se sacrificaron para el ensayo de torsión de los fémures. Se extrajo la placa de fijación, los tornillos y el tejido blando adherente y se incluyeron las metafisis de los huesos. Los especímenes se hicieron girar externamente en un aparato de ensayo de torsión adaptado, se registró la carga de fractura y la rigidez, y los datos se analizaron mediante una ANOVA con un factor con ensayos post-hoc de Student-Newman-Keuls.

Resultados

50 Todos los animales toleraron bien el procedimiento quirúrgico, sin incidencias de infección, rechazo del implante o fallo de la fijación. Resultaban evidentes dos modos de reparación en las muestras cargadas de CMMs: en primer lugar, se formó una cantidad considerable de callo en ambas interfaces huésped-implante, y en segundo lugar, se desarrolló un collar sustancial de hueso circundando el implante mismo. Los implantes sin células no presentaban ninguna de estas características. Las muestras de autoinjerto experimentaron una secuencia tradicional de consolidación, depositándose la mayoría de hueso en el aspecto medial del defecto de hueso. Las muestras cargadas de CMM no sólo se integraron completamente en la interfaz huésped-implante, sino que el collar periosteal se extendió proximal y distalmente más allá de los márgenes cortados del hueso. Además, el diámetro de hueso nuevo en la diáfisis central era mayor en los implantes cargados de CMM que en las muestras de autoinjerto y en extremidades intactas. Actualmente se está realizando el análisis biomecánico de las muestras recogidas. Los análisis *in vitro* del potencial osteogénico de las CMMs de cada animal demuestran el desarrollo de células positivas para la fosfatasa alcalina que depositan una cantidad significativa de matriz extracelular mineralizada.

60 Los datos histomorfométricos preliminares procedentes de portador HA/TCP cargado de CMMs (n=2) y sin células (n=1) muestra que el rellenado óseo como porcentaje del espacio disponible es de 39% y 7%, respectivamente. En el caso de las muestras cargadas de CMMs, además de una cantidad considerable de hueso en los límites del bloque cerámico, también se observó un callo periosteal mineralizado bastante grande. Además, se reestableció el espacio medular dentro del defecto. Por el contrario, en los cilindros de HA/TCP sin células, la mayoría del hueso presente se encontraba en el espacio endosteal, con cierta penetración en el implante.

El ensayo torsional de las muestras (n=6 en cada grupo) demostró que las muestras cargadas de CMM presentaban prácticamente el doble de fortaleza que las muestras sin células, pero presentaban sólo un tercio de la fortaleza de los controles de autoinjerto.

5 Comentario

El presente estudio demuestra que las CMMs de un animal grande pueden expandirse en cultivo e implantarse para la reparación con éxito de defectos óseos diafisarios grandes. Los datos radiográficos e histológicos indican que las CMMs no sólo forman hueso en el interior y circundando el implante directamente, sino que su presencia induce una respuesta en el periostio del huésped para formar hueso adicional. En la actualidad no se conoce el mecanismo de lo anterior, aunque es consistente con la observación de la presente invención de que las CMMs que experimentan diferenciación osteogénica secretan uno o más factores paracrinos que son osteoinductores (63). La falta conspicua de formación de callo y la reacción periostial en los implantes sin células fueron resultados inesperados. Los datos radiográficos sugieren que la regeneración ósea mediada por CMMs es más rápida que el autoinjerto durante el periodo de estudio. Además de establecer un nuevo modelo estandarizado para la reparación de huesos de animales grandes, el presente estudio ilustra la viabilidad de traducir la terapia de células madre autólogas desde el laboratorio a la clínica.

Ejemplo 3

20 Formación *in vivo* de hueso utilizando células madre mesenquimales humanas

Aunque se ha demostrado que las CMMs de rata sintetizan hueso estructuralmente competente en un sitio ortotópico (68), sólo se ha demostrado que las CMMs humanas formen hueso *in vitro* (12, 64), y en un sitio de implantación ectópica en ratones inmunodeficientes (55). Debido a que la cicatrización de fracturas y la reparación de hueso dependen de la capacidad de amasar suficientes células en el sitio del defecto para formar un blastema de reparación, una estrategia terapéutica es administrar directamente las células precursoras en el sitio que requiere la reparación. Este enfoque resulta particularmente atractivo para los pacientes que presentan fracturas de difícil cicatrización, o para pacientes en los que se ha reducido el reservorio de CMMs como resultado de la edad (72, 118), la osteoporosis (128) u otra alteración metabólica. A partir de lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente estudio es demostrar que las CMMs humanas expandidas en cultivo y purificadas son capaces de regenerar hueso en el sitio de un defecto clínicamente significativo.

Materiales y métodos

35 Cultivo y manipulación de CMMs humanas

El aislamiento y expansión en cultivo de las CMMs humanas a partir de un aspirado de médula ósea obtenido de un voluntario normal tras su consentimiento informado se llevó a cabo tal como se ha indicado anteriormente (54, 52). Tras la siembra inicial en una placa con medio de Eagle modificado por Dulbecco (Sigma) que contenía suero de feto bovino al 10% (BioCell) procedente de un lote seleccionado (80), se extrajeron células adherentes el día 3, en el momento del primer cambio de medio, y posteriormente se sustituyó el medio por medio fresco dos veces por semana. Las CMMs adherentes representaban aproximadamente 1 de cada 10^5 células nucleadas sembradas en la placa originalmente. Tras alcanzar las placas de cultivo prácticamente la confluencia, las células se desengancharon y se subcultivaron en serie.

Ensayos osteogénicos *in vitro*

Se sembraron nuevamente CMMs humanas en placas de seis pocillos a una densidad de 3×10^3 células/cm². El día siguiente (día 0), se proporcionó medio fresco y las células se cultivaron en ausencia o en presencia de suplementos osteogénicos (OS) (12, 64). Se llevaron a cabo cambios de medio dos veces por semana, y en los días 4, 8, 12 y 16, se sometieron a ensayo cultivos para número celular, bioquímica e histoquímica de la fosfatasa alcalina (APasa) y producción de matriz mineralizada utilizando las técnicas indicadas anteriormente (64).

55 Preparación de implantes

Se conformaron bloques de cerámica porosa de hidroxiapatito/fosfato β -tricálcico (HA/TCP), tamaño de poro medio de entre 200 y 450 μ m (Zimmer, Inc., Warsaw, IN), en cilindros de aproximadamente 4 mm de diámetro y 8 mm de longitud con un canal central de 1 mm, o se cortaron en cubos de 3 mm de lado. Los implantes cargados de CMMs se prepararon mediante incubación de cubos y cilindros de HA/TCP recubiertos de fibronectina humana en una suspensión de $7,5 \times 10^6$ células/ml de CMMs de primer pase durante 2 horas a 37°C, tal como se ha indicado anteriormente (68). Se prepararon cilindros de control sin células de manera idéntica.

Modelo de hueso femoral de rata atímica

65 El modelo quirúrgico de hueso femoral utilizado en la presente invención ha sido utilizado ampliamente en ratas eutímicas para estudiar la reparación de los huesos largos (68, 129, 34, 147). Brevemente, se expusieron ambos fémures de ratas Harlan desnudas (Hsd:Rh-rnu) (de 325 g) mediante aproximación anterolateral. Se unió una placa de fijación

ES 2 329 953 T3

de polietileno a cada fémur con cuatro alambres Kirschner y se extrajo un segmento transversal de 8 mm de la diáfisis central, conjuntamente con su periostio adherente, utilizando una fresa giratoria de osteotomía bajo irrigación con solución salina. A continuación, cada animal recibió un cilindro de HA/TCP sin células en un defecto femoral, un cilindro idéntico cargado de CMMs humanas en el defecto contralateral y un implante subcutáneo de un cubo de HA/TCP cargado de CMMs a lo largo del dorso.

Radiografía

Inmediatamente después del sacrificio en cada punto temporal, se radiografiaron todos los especímenes en una posición lateral utilizando un sistema formador de imágenes de alta resolución Faxitron con una exposición de 35 kVP durante 30 segundos.

Histomorfometría cuantitativa e inmunoquímica

Tras el sacrificio a las 4, 8 y 12 semanas, se procesó un mínimo de 3 especímenes de cada tipo para histología no descalcificada tras la radiografía. Se cortaron secciones longitudinales, se tiñeron con azul de toluidina O y se llevó a cabo una evaluación cuantitativa de la formación de hueso utilizando software de análisis de imágenes Leica Quantimet 500MC tal como se ha indicado anteriormente (68). Los datos se analizaron mediante pruebas t de Student. Las muestras implantadas subcutáneamente se fijaron en formalina, se descalcificaron, se incluyeron en parafina, se seccionaron en serie y de manera similar se tiñeron. Las extremidades de un animal en cada punto temporal también se prepararon para la inmunotinción con anticuerpo monoclonal 6E2, que distingue las células humanas de las células de rata (54). Se incubaron criosecciones no descalcificadas en sobrenadante 6E2 o en un control de anticuerpo monoclonal primario irrelevante (SB-1) (10), seguido de anticuerpo secundario IgG de cabra antiratón conjugado con FITC (GIBCO) diluido 1:500 en solución salina tamponada con fosfato.

Ensayos biomecánicos

Doce semanas después del implante, se sacrificaron 7 animales experimentales y 6 animales de control no operados para el ensayo de torsión de fémures tal como se ha indicado anteriormente (81). Se extrajo la placa de fijación y el tejido blando adherente y se incluyeron las metafisis de los huesos. Los especímenes se hicieron girar externamente en un aparato de ensayo de torsión adaptado, se registró la carga de fractura y la rigidez, y los datos se analizaron mediante ANOVA de un factor con ensayos post-hoc de Student-Newman-Keuls.

35 *Resultados*

Cultivo de CMMs y diferenciación osteogénica in vitro

Se establecieron cultivos de CMMs humanos y, transcurridos 7 días, formaron colonias características sobre la superficie de la placa de cultivo. Las colonias primarias subcultivadas el día 14 se unieron uniformemente a la superficie de nuevas placas, y se dejaron dividir durante 7 días más hasta alcanzar una confluencia de ~85%. Las células subcultivadas demostraron su morfología ahusada característica (fig. 6A) y se dividieron uniformemente, resultando en una distribución uniforme de las CMMs en toda la placa. Las células derivadas de este primer pase se utilizaron para la preparación de implantes, tal como se ha indicado anteriormente, y se utilizó una alícuota para confirmar el potencial osteogénico *in vitro* de las mismas.

Tal como se ha descrito en los estudios anteriores (12, 64, 13), las CMMs cultivadas con OS experimentaron un cambio drástico de morfología celular, de forma ahusada a cuboide, que se vio acompañado por un incremento de la actividad de APasa y de la producción de una matriz extracelular rica en hidroxiapatito óseo (fig. 6B). Se observó un incremento significativo de actividad de APasa tras 4 días de tratamiento con OS, alcanzándose la actividad máxima el día 8, seguido de un declive hasta el día 16 (fig. 6C). Esta reducción tardía de la actividad de APasa de los cultivos de OS se correlaciona con la creciente deposición mineral y la diferenciación terminal de las células en osteocitos. Aunque no se detectó deposición de calcio mediante tinción de von Kossa o el sensible ensayo cuantitativo colorimétrico del calcio en cultivos de control. La figura 6C ilustra que las CMMs cultivadas con OS habían depositado una cantidad significativa de calcio alcanzado el día 12 ($60 \pm 5,1 \mu\text{g/placa}$) y 16 ($98 \pm 5,0 \mu\text{g/placa}$).

Osteogénesis mediada por CMMs en implantes ectópicos de HA/TCP

Los cubos de HA/TCP cargados de CMMs humanas implantados en el espacio subcutáneo de ratas atímicas mostraron indicios de osteogénesis a las 4 semanas, aunque se encontraba presente considerablemente más hueso dentro de los poros a las 8 y a las 12 semanas. En la figura 7, se muestra una sección representativa de un cubo cargado de CMMs recolectado 12 semanas después del implante. La formación de hueso se produce dentro de los poros de los cubos y se asocia a elementos vasculares que penetran en el implante. Esta angiogénesis resulta necesaria para la formación de hueso nuevo, debido a que la actividad secretoria de los osteoblastos es un fenómeno orientado que es guiado por la vasculatura (25). Tal como se ha demostrado anteriormente (32, 54), los cubos implantados sin CMMs en ningún caso contenían hueso, pero se encontraban llenos de tejido fibroso y vasos sanguíneos únicamente.

Modelo de osteotomía y radiografía

La figura 8A ilustra el modelo de defecto segmentario utilizado en el presente estudio. La placa de fijación de polietileno en la parte superior del fémur proporciona estabilidad tras la creación del defecto diafisario de 8 mm. Ningún animal experimentó ningún fallo de la fijación ni ninguna otra complicación postoperatoria durante el curso del estudio. Los estudios anteriores han establecido que los defectos femorales que no se implantan con un material bioactivo dan lugar a una no unión fibrosa que carece de hueso (68, 34, 147). Las radiografías de alta resolución Faxitron proporcionaron suficiente claridad y detalle para distinguir cambios sutiles producidos dentro del implante y circundando el hueso del huésped. Las radiografías representativas de los fémures de los 2 grupos recuperados 12 semanas después del implante muestran sustancialmente más hueso en animales que habían recibido cilindros de HA/TCP cargados de CMMs (fig. 8B) que los que habían recibido cilindros sin células (fig. 8C). Se utilizó el incremento de radiodensidad, y la eliminación de la aparente estructura de poros, como indicación de la formación de hueso nuevo dentro del núcleo del implante. Aunque la integración del implante, o unión, no se observó generalmente a las 4 semanas, la formación posterior de un puente óseo radiodenso entre el implante y el huésped se observó por completo a las 8 semanas de la interfaz. A las 8 semanas, el implante cargado de CMMs contenía una cantidad considerable de hueso dentro de los poros y se encontraba integrado con el hueso del huésped en los extremos del implante. A las 12 semanas, la unión era completa y resultaba evidente la presencia de hueso adicional en los poros. En algunas muestras se observó la formación de callo a lo largo de la placa de fijación, al igual que una espícula excéntrica ocasional de hueso, habitualmente presente a lo largo del aspecto medial del fémur. Algunos especímenes, tanto con células como sin células, presentaban grietas dentro del núcleo del implante.

Evaluación inmunocitoquímica

La tinción inmunocitoquímica con anticuerpo 6E2 demuestra que, a las 4 semanas, prácticamente la totalidad de las células dentro de los poros del implante eran reactivos sobre su superficie y, por lo tanto, eran de origen humano (fig. 9A). A lo largo de la periferia inmediata del implante, las células huésped de rata se encontraban entremezcladas con las células de donante humano, aunque, a medida que se incrementaba la distancia respecto a la superficie del implante, caía rápidamente la proporción de células del donante. La presencia de estas células periféricas que no se encontraban inmunoteñidas también sirve como control negativo para este anticuerpo establecido. El material cerámico mismo, con apariencia negra en la micrografía de contraste de fases (fig. 9B), muestra un nivel elevado de fluorescencia de fondo. La exquisita sensibilidad de la interacción antígeno 6E2:anticuerpo exigía la utilización de secciones congeladas no fijadas que, por desgracia, limitaban la capacidad de procesar estos especímenes de tejido calcificado para la inmunotinción. Aunque, se pudieron obtener criosecciones satisfactorias de las muestras de 4 semanas (mostradas en la presente memoria), no pudieron preparar secciones de muestras posteriores, que contenían sustancialmente más hueso.

Evaluación histológica

El análisis de las muestras teñidas con azul de toluidina O confirmó las observaciones realizadas mediante radiografía. Las fotomicrografías de secciones representativas de los grupos de implante recuperados a las 12 semanas se muestran en la figura 9. La mayoría de los poros de los implantes cargados con CMMs contenían una cantidad sustancial de hueso nuevo a las 8 semanas, y este proceso de regeneración ósea continuó durante el periodo de evaluación de 12 semanas (fig. 9C). A las 8 semanas, prácticamente la totalidad de los poros contenía hueso nuevo, excepto en algunas áreas discretas, en las que podría haberse comprometido la carga de las CMMs. La evaluación de las extremidades tras los ensayos biomecánicos indica que las fracturas eran de naturaleza transversal o espiral, y generalmente se propagaron a través de una región central del implante que contenía cartílagos o una cantidad modesta de hueso, tal como se observa en la figura 9C. Durante el proceso regenerativo, se formó una cantidad sustancial de hueso nuevo en la interfaz entre el huésped y el implante, conduciendo a un área continua de hueso a través del defecto. Puede observarse hueso fibroso nuevo y hueso lamelar en contacto íntimo con el margen cortado del córtex del huésped a las 12 semanas (fig. 9E) y esta región de unión es directamente contigua con el hueso formado dentro de los poros del implante. En regiones más profundas del HA/TCP (fig. 9F), resulta evidente el relleno de los poros con hueso nuevo y vasculatura.

En los defectos con portador HA/TCP solo, los poros del implante se encontraban predominantemente llenos de tejido fibroso, incluso a las 12 semanas (fig. 9D). Muchas muestras presentaban evidencia de integración modesta de las interfaces de huésped-implante, y en un extremo de este implante representativo (fig. 9D), aparentemente avanzaba el hueso endostial derivado del huésped hacia el interior del canal medular del portador como resultado de la osteoconducción. Ninguno de los portadores cerámicos sin células contenía hueso atravesando los poros del implante.

Evaluación histomorfométrica

Los resultados descritos cualitativamente antes se reflejan en los datos histomorfométricos presentados en la Tabla 3.

TABLA 3

Relleno óseo en implantes de HA/TCP como porcentaje del espacio disponible

	Cuatro semanas	Ocho semanas	Doce semanas
Portador solo	1,89 ± 1,00	11,47 ± 7,08	29,51 ± 8,93
Portador más CMMs	1,95 ± 1,92	26,46 ± 3,60*	46,61 ± 14,83*

Tabla 3. Se evaluaron histomorfométricamente para el contenido óseo secciones longitudinales a través del defecto segmentario de ratas atímicas implantadas con portadores cerámicos, con o sin CMMs humanas. Los resultados representan medias ± SD de 3 extremidades experimentales de cada grupo a las 4 y a las 8 semanas, y 8 extremidades de cada grupo a las 12 semanas. *P<0,05 comparado con el portador solo en cada punto temporal.

El hueso presente en los implantes de HA/TCP sin células representa principalmente el crecimiento óseo desde los extremos cortados de los córtex del huésped. A las 4 semanas y posteriormente, las muestras cargadas de CMMs contenían significativamente más hueso que el grupo de implante sin células, y la fracción ósea media dentro del implante se incrementó con el tiempo, alcanzando 26,5% y 46,6% en los puntos temporales de las 8 y 12 semanas, respectivamente. Esta fracción ósea incrementada a las 8 semanas es 2,3 veces superior que la medida concurrentemente en implantes sin células, y a las 12 semanas es más de 23 veces superior a la observada en cualquiera de las dos condiciones a las 4 semanas. La fracción en volumen de portador de HA/TCP permaneció constante y sirvió de control interno para la histomorfometría.

Ensayos mecánicos

Doce fémures experimentales y 11 fémures intactos de animales de control de edad y peso iguales se sometieron a ensayos de torsión 12 semanas después del implante. Doce extremidades experimentales no se sometieron a ensayo debido a que eran extremadamente frágiles. La inspección gruesa de los defectos cicatrizados reveló una deformación de rotación en varo distal en la mayoría de especímenes. La Tabla 4 resume los resultados de los ensayos mecánicos en términos de resistencia torsional, rigidez y energía total absorbida.

TABLA 4

Propiedades mecánicas de fémures de rata 12 semanas después del implante

	Control intacto	Portador solo	Portador + CMMs
Resistencia (N·mm)	409 ± 71	74 ± 63	159 ± 37
Rigidez (N·mm/grado)	39 ± 5,5	6,6 ± 4,2	16,2 ± 4,0
Energía (N·mm x grado)	2,6 ± 0,7	0,6 ± 0,4	1,3 ± 0,8

Tabla 4. Resultados de los ensayos mecánicos en muestras de fémur de rata procedentes de controles de edades iguales no operados (Controles intactos), o de animales con defectos segmentarios que fueron implantados con el portador de HA/TCP solo (Portador solo) o con HA/TCP cargado de CMMs (Portador + CMMs). Estos resultados representan medias ± SD de 6 extremidades para cada grupo de implante experimental, y 11 extremidades de los animales de control. Doce semanas después del implante, se extrajo cada espécimen, se incluyeron los extremos del hueso y las muestras se sometieron a ensayo en rotación externa a 6 grados/segundo a lo largo del eje longitudinal hasta la fractura. La ANOVA de un factor en cada una de las variables demostró una diferencia significativa entre grupos con P<0,0001. Además, cada uno de los grupos era significativamente diferente de los demás para resistencia y rigidez (P<0,05), según se determinó mediante pruebas post-hoc de Student-Newman-Keuls.

Estos resultados demuestran un incremento de 115%, 145% y 112% de la resistencia, rigidez y energía torsional absorbida, respectivamente, en muestras cargadas de CMMs en comparación con muestras de portador sin células. Se encontró que los tres grupos eran estadísticamente diferentes entre sí en par de fractura y rigidez.

Comentario

Los resultados presentados en la presente memoria demuestran que las CMMs humanas expandidas en cultivo purificadas son capaces de cicatrizar un defecto óseo clínicamente significativo en un modelo bien establecido de reparación ósea. Aunque se ha demostrado mediante neo-osteogénesis el potencial osteogénico de las CMMs humanas en implantes subcutáneos (54), así como en estudios de CMMs aisladas *in vitro* (12, 64), ésta es la primera demostración de que las CMMs humanas pueden formar hueso en un sitio ortotópico que requiere reparación. La combinación de CMMs con un portador de HA/TCP poroso presenta potencial regenerativo que es histomorfométrica y biomecánicamente superior al portador solo. La presente investigación prepara el terreno para la aplicación clínica de la terapia de CMMs autólogas para el tratamiento de defectos ortopédicos en el ser humano.

El incremento progresivo de radiodensidad del hueso en cicatrización a las 8 semanas se corresponde con las observaciones histológicas de las extremidades procesadas. La inmunocitoquímica demuestra que las células asociadas a la cerámica a las 4 semanas son de origen humana, y que las células circundantes al implante proceden del huésped. A las 8 semanas y posteriormente, las CMMs del donante depositan hueso y eventualmente resulta reabsorbido y sustituido por hueso derivado de las células huésped mediante la secuencia normal de remodelado (24, 47). Resulta importante indicar que, durante el proceso de regeneración del defecto óseo, se forma hueso mediante una conversión directa de las células mesenquimales en osteoblastos, y no mediante una cascada endocondral. Esta observación concuerda con estudios anteriores de osteogénesis en implantes cargados con CMMs animales o humanas (32, 70, 54, 68). A medida que continúa el proceso regenerativo, los poros de la cerámica se llenan con una cantidad creciente de hueso, que se deposita sobre las paredes del implante o del hueso preexistente, y que es orientado por la vasculatura en crecimiento invasivo que proporciona una puerta para la entrada y el establecimiento de nuevos islotes de médula que contienen elementos hematopoyéticos y CMMs derivados del huésped.

La tasa de regeneración ósea es inferior a la observada en ratas eutímicas con implante de CMMs singénicas (68), sugiriendo que las ratas inmunocomprometidas no son huéspedes ideales para evaluar el potencial de formación de hueso de las CMMs humanas. Lo mencionado anteriormente puede deberse en parte a la naturaleza xenogénica del implante y a la mayor actividad de las células asesinas naturales, lo que podría ser un mecanismo compensatorio para que el animal se adapte a su deficiente inmunidad mediada por células T (123). Sin embargo, se formó una cantidad significativamente superior de hueso en el defecto que había recibido CMMs comparado con las extremidades que recibieron solo portador. El grado de unión huésped-implante fue superior en los implantes cargados de CMMs, lo que probablemente refleja la contribución combinada de CMMs implantadas y células derivadas del huésped.

La capacidad de las CMMs humanas de regenerar hueso en este modelo experimental es superior al compararla con otras investigaciones que han sometido a ensayo implantes tales como matrices de hueso desmineralizado, médula ósea, proteínas morfogenéticas óseas (BMP) purificadas o recombinantes, aloinjertos, cerámicas, fibrometales o matrices activadas por genes (129, 34, 147). Además de formar una cantidad sustancial de hueso histológicamente normal, los datos biomecánicos demuestran que la resistencia torsional y la rigidez a las 12 semanas eran ~40% las de las extremidades de control intactas, lo que es más del doble que las observadas con el portador sin células, y también el doble de la alcanzada en un estudio similar de reparación ósea que utilizó autoinjertos frescos en un modelo de defecto en hueso largo de primate (29).

Recientemente, se han implantado factores de crecimiento, tales como BMP recombinante humana en modelos de defecto óseo experimental, en un esfuerzo por estimular la reparación ósea (147, 78, 29). Aunque las BMPs recombinantes son capaces de inducir la cascada endocondral en los implantes ectópicos (146), su capacidad de dirigir reproduciblemente la formación de hueso en sitios ortotópicos ha resultado perjudicada por problemas asociados al diseño y selección de un portador apropiado. En contraste con los datos mecánicos que demuestran una regeneración ósea significativa en una cerámica cargada de CMMs, las BMPs administradas en el mismo portador de HA/TCP no incrementaron la resistencia del implante en comparación con el portador solo (126). La naturaleza frágil de esta cerámica, en combinación con su lenta reabsorción y estructura porosa compleja, podrían explicar por qué incluso en presencia de una formación significativa de hueso, la resistencia mecánica sigue siendo inferior que en las extremidades intactas. Además, el escudamiento frente a la carga que provoca el hueso nuevo, como resultado de que la placa de fijación soporta carga, también limita la resistencia del defecto bajo cicatrización. Los presentes inventores creen, tal como se ha sugerido anteriormente (16), que la utilización de un cilindro de HA/TCP osteosoportante podría no ser la matriz ideal para la sustitución de defectos diafisarios. Los esfuerzos dirigidos al diseño de un portador biomatriz óptimo para la administración de las CMMs es un área activa de investigación.

El implante de CMMs autólogas expandidas en cultivo ofrece la ventaja de administrar directamente la maquinaria celular responsable de la síntesis de hueso nuevo y de evitar las etapas que de otro modo resultarían lentas, que conducen a la reparación ósea. Incluso en pacientes con capacidad reducida de regenerar el tejido conectivo, presumiblemente debido a un título bajo de CMMs endógenas (72, 128, 144, 11), estas escasas CMMs podrían aislarse y expandirse en cultivo más de mil millones de veces sin pérdida de su potencial osteogénico (13), restaurando o incrementando de esta manera la capacidad del paciente de cicatrizar defectos de tejidos. Los estudios presentados en la presente memoria sugieren que las terapias celulares basadas en CMMs resultarán útiles para la reconstrucción de una diversidad de defectos de tejidos en el ser humano.

ES 2 329 953 T3

Ejemplo 4

Efecto del recubrimiento sobre la respuesta osteogénica de los cubos de HA/TCP cargados de CMMs

5 El presente experimento se llevó a cabo en un intento de establecer que los cubos de HA/TCP no recubiertos eran equivalentes a los cubos de HA/TCP recubiertos de fibronectina o de suero autólogo en la provisión de soporte para la osteogénesis mediada por CMMs.

Materiales y métodos

10 Los cubos de HA/TCP estándares recubiertos con fibronectina, suero autólogo al 1%, suero autólogo al 10%, o los que se dejaron sin recubrimiento, se cargaron con CMMs y se implantaron subcutáneamente en ratones atímicos. Los cubos se extrajeron seis semanas después del implante y se inspeccionaron para el nivel de osteogénesis mediante métodos de histología descalcificada. Los experimentos se llevaron a cabo con múltiples donantes humanos y caninos,
15 y en ratones se realizaron por duplicado.

Resultados y conclusión

20 Los cubos cargados de CMMs de todos los grupos de tratamiento mostraron una cantidad significativa de formación de hueso a las seis semanas. El recubrimiento de los cubos de HA/TCP con fibronectina o con suero no presentó ningún efecto sobre el nivel de osteogénesis mediada por CMMs dentro del cubo. Tal como se esperaba, los cubos de HA/TCP de control sin células no presentaron osteogénesis. Basándose en los resultados anteriormente indicados, se concluye que HA/TCP sin recubrimiento es un portador viable para la administración de CMMs para llevar a cabo la
25 reparación/aumento óseo.

Ejemplo 5

Comparación de materiales de injertación ósea utilizando un modelo de fusión espinal canina

30 Los datos informados en la presente memoria proporcionan información respecto al valor de la médula ósea fresca y de las células madre mesenquimales purificadas expandidas en cultivo como medio para mejorar los materiales de injertación existentes en aplicaciones de fusión espinal. Esta tecnología podría resultar en una mejora significativa de la eficacia de los materiales y procedimientos de injertación ósea. Además, la utilización de procedimientos de
35 injertación ósea que no requieren la obtención de injerto óseo autógeno reducirá significativamente la morbilidad de los procedimientos de injertación ósea.

Materiales y métodos

40 Se ha desarrollado el modelo canino de fusión espinal segmentaria posterior específicamente para la evaluación y comparación de los materiales de injertación de hueso en desarrollo que habían demostrado resultar eficaces en animales pequeños. El hueso canino es un modelo mejor del hueso humano que el de roedores (35), y evita muchas de las limitaciones asociadas a los modelos de defectos comentadas en la presente memoria. La utilización de un mayor volumen de injerto y de un sitio común para los procedimientos clínicos de injertación (la columna) son ventajas
45 significativas. El ensayo de tres materiales en cada animal permite controlar la variación entre animales y reduce el número de animales requerido. El modelo permite la realización de ensayos mecánicos en cada sitio de fusión sin que se produzcan artefactos derivados de la fijación interna. La puntuación de unión del área en sección transversal de la masa de fusión en el sitio de la fractura también ha demostrado ser un medio sensible para comparar los materiales entre sí. El análisis cuantitativo de las imágenes de TC de cada sitio de fusión antes de realizarse el ensayo destructivo
50 se desarrolló en respuesta a la primera revisión. De esta manera, ahora resulta posible el análisis cuantitativo del volumen de la masa de fusión, de la densidad electrónica media (la mineralización) y del área en sección transversal.

Mediante la utilización de dicho modelo, se ha demostrado que un compuesto de colágeno/cerámica (CC) constituido por colágeno fibrilar de tipo I de piel bovina y gránulos de 0,5 a 1,0 mm de diámetro de una cerámica bifásica
55 de fosfato cálcico (60% de hidroxiapatito y 40% de fosfato tricálcico) resulta ineficaz como material de injertación. La utilización aislada del mismo no resultó mejor que un defecto no injertado. La adición de un extracto de proteínas de matriz ósea o la adición de hueso autógeno mejoraron la eficacia ($p < 0,01$), pero el resultado siguió siendo inferior al del hueso autógeno puro ($p < 0,01$) (55). Se demostró también que la adición de dicho compuesto de colágeno/cerámica a hueso autógeno a modo de “expansor del injerto óseo” redujo significativamente el rendimiento del autoinjerto ($p < 0,01$) (58). Resulta interesante que las fusiones exitosas resultantes del compuesto CC presentaban
60 propiedades mecánicas similares a las fusiones resultantes del autoinjerto, indicando que los gránulos cerámicos no reabsorbidos residuales no presentaron ningún efecto adverso evidente sobre las propiedades de los materiales de la masa de fusión.

65 Se evaluó el procesamiento de la médula ósea como medio para incrementar el rendimiento de los injertos en un estudio de fusión espinal, utilizando el compuesto de colágeno/cerámica de Collagen Corporation como sistema de administración de una proteína de matriz purificada, el factor osteoinductor (OIF). Esta matriz se encontraba mezclada 50:50 con hueso canceloso autógeno (AB), médula ósea recién aspirada (ABM) o células nucleadas de médula

ósea fresca que habían sido concentradas diez veces mediante centrifugación y aislamiento de sangre enriquecida en leucocitos (“buffy coat”, BMC). Por desgracia, tras completarse el estudio, se descubrió que el OIF no era una citoquina activa. Las preparaciones anteriores de OIF habían sido inductoras debido a la contaminación de las mismas con BMPs. Como resultado, la tasa de fusión total era baja. Sin embargo, se identificó una tendencia fuerte de mejora de los resultados a partir de la concentración de médula en la comparación entre ABM y BM ($p=0,06$, modelo de regresión logística con datos agrupados). Por desgracia, la capacidad de los presentes inventores de responder a esta importante pregunta se hallaba limitada por el pobre comportamiento de la línea base de la matriz. Lo expresado anteriormente subraya la importancia de seleccionar una matriz efectiva y fiable para la evaluación de los injertos de médula ósea en el presente proyecto. En la Tabla 5 se presenta la incidencia de puntuaciones de unión de 0 a 4 para cada material en el presente experimento.

TABLA 5

Puntuación de unión de fusión espinal para materiales de implante seleccionados

Materiales	Puntuación de unión						Puntuación total
	N	4	3	2	1	0	
AB+OIF/CC	11	2	1	1	2	5	15
BMC+OIF/CC	11	0	2	2	1	6	11
ABM+OIF/CC	11	0	2	0	0	9	6

Estos estudios demuestran que el modelo canino de fusión espinal segmentario posterior es una herramienta sensible y fiable para la comparación de materiales de injertación. Los sitios no injertados cicatrizaron pobremente, con una puntuación de unión baja. El injerto de hueso canceloso autógeno resultó muy efectivo, pero no cicatrizó todos los sitios de injertación. Este espectro de comportamientos para el hueso autógeno permiten evaluar los materiales que podrían comportarse tan bien o mejor que el hueso canceloso autógeno. Tanto la puntuación de unión como los ensayos mecánicos pueden utilizarse, y han sido utilizados, efectivamente para comparar materiales. La utilización del análisis de imágenes de TC de alta resolución añade una importante herramienta no destructiva de evaluación que es flexible, cuantitativa y reproducible. Este modelo establece un nuevo estándar para la evaluación de materiales de injertación ósea.

Modelo canino de fusión espinal segmentaria posterior

Los objetivos específicos del presente proyecto se refieren a la comparación de tres materiales de injertación: matriz cerámica granular cargada de células madre mesenquimales autógenas, matriz cerámica granular cargada de médula ósea fresca y matriz cerámica granular cargada de médula ósea fresca y células madre mesenquimales autógenas.

Se utilizaron doce perros “Beagle” macho (edad: 10 a 14 meses, 12 a 14 kg) para el experimento. Se llevaron a cabo fusiones localizadas en tres sitios de fusión espinal: L1-2, L3-4 y L5-6. Se fijó internamente cada sitio utilizando placas dobles inmovilizadoras de procesos espinosos contiguos, separadas por un segmento móvil. Se injertó cada animal con uno de los tres materiales bajo evaluación. Con el fin de limitar el potencial de sesgo quirúrgico y para garantizar la distribución de los materiales en cada uno de los tres sitios de injerto, se prepararon doce cartas, dos conjuntos de las seis posibles combinaciones de los tres materiales en los tres sitios, al inicio de cada experimento y se introdujeron en un sobre. A continuación, se realizaron asignaciones de sitio intraoperatoriamente mediante extracción ciega tras completar la preparación del sitio. Se aplicó fijación interna en cada segmento utilizando placas en cada uno de los procesos espinosos. No se realizó inmovilización externa. Todos los animales se eutanizaron doce semanas después de la operación y se obtuvieron radiografías Faxitron laterales de cada columna extirpada para evaluar la integridad de la fijación. Tras extraer las placas, se adquirieron imágenes de TC de alta resolución de todos los segmentos de L1 a L6 en cada columna. Los segmentos de fusión individuales se sometieron a ensayo mecánicamente hasta la fractura y se evaluaron físicamente para la unión. La comparación entre materiales se llevó a cabo basándose en la puntuación de unión, el análisis cuantitativo de imágenes de datos de TC y las propiedades mecánicas observadas en cada fusión.

Tres semanas antes de la fusión espinal, se sometió cada animal a aspiración de la médula ósea procedente de la cresta ilíaca izquierda utilizando técnicas estériles bajo sedación IV de corta duración. A continuación, estas muestras se transportaron para aislar y proliferar células madre mesenquimales.

El día de la cirugía, cada animal en el estudio se sometió a fusión espinal en tres niveles separados. Se proporcionaron células madre mesenquimales y se recolectó nuevamente médula ósea fresca, en esta ocasión procedente de la cresta ilíaca derecha. Seguidamente, cada compuesto de material se preparó intraoperatoriamente. Tras la preparación del lecho quirúrgico y la aplicación de fijación interna, se injertó un volumen de 2 cm³ de cada material en un nivel en cada animal. De esta manera, cada animal presentaba un sitio de fusión para cada uno de los materiales. Los materiales se distribuyeron de acuerdo con un protocolo de aleatorización para evitar el sesgo quirúrgico y para garantizar la distribución uniforme de los materiales en los sitios.

ES 2 329 953 T3

Aspiración inicial de médula ósea y preparación de las CMMs

Tras la preparación estéril de la piel, se realizó una pequeña incisión penetrante (3 mm) utilizando una cuchilla del nº 11. Se introdujo una aguja de aspiración de médula ósea Lee-Lok (Lee-Lok Inc., Minneapolis, MN) en la cavidad ósea. Se retiró el obturador. A continuación, se aspiró rápidamente un volumen de 2 cm³ de médula ósea en una jeringa de 10 cm³ que contenía 1 cm³ de solución salina heparinizada (1.000 unidades/ml). Se retiró la jeringa y se invirtió varias veces para garantizar la mezcla. Posteriormente se obtuvieron aspirados utilizando la misma técnica a través de la misma incisión en la piel y la misma ventana cortical, aunque redirigiendo la punta de la aguja hacia sitios intramedulares separados por lo menos 1 cm. Se mantuvo una presión sobre el sitio durante un periodo comprendido entre 3 y 5 minutos para garantizar la hemostasis. No resultó necesario el vendaje. No resultó necesaria la inmovilización ni la restricción post-operatorias.

Aislamiento y cultivo de CMMs

Se obtuvieron aspirados de médula de la cresta ilíaca (10 ml) a partir de perros de origen aleatorio de 15 a 25 kg bajo anestesia de Propofol (Dipriván al 1%, Stuart Pharm., DE). La médula se extrajo con una jeringa de 10 ml que contenía 7.500 unidades de heparina (Elkins-Simm, Cherry Hill, NJ) para evitar la coagulación. En el caso de algunos perros, se guardó la médula sobre hielo y se envió por correo nocturno a las instalaciones de cultivo celular. Se mezcló la médula con dos volúmenes de medio completo, consistente de FBS al 10% y antibióticos (100 U/ml de penicilina G, sulfato de estreptomina 100 µg/ml y anfotericina B 0,25 µg/ml) en DMEM con baja concentración de glucosa. La fracción de células nucleadas de la médula se enriqueció en CMMs basándose en la separación por densidades en un cojín de Percoll 1,063 g/cm³. Se añadieron en capas cuidadosamente doscientos millones de células nucleadas en 5 ml de medio sobre 20 ml de Percoll (Sigma, St. Louis, MO). Se consiguió la separación mediante centrifugación a 400 x g durante 20 minutos. A continuación, las células recogidas en la interfaz de medio-Percoll se lavó y se sembró en placas de Petri de 100 mm a una densidad de 1,6 x 10⁴ células/cm² en 7 ml de medio completo o en matraces de cultivo T-185 a una densidad de 5,4 x 10⁴ células/cm² en 32 ml de medio completo. Las células se incubaron a 37°C en un ambiente de 5% de CO₂ humidificado. El día 4 de cultivo, se separaron las células no adherentes conjuntamente con el medio de cultivo. Los cultivos se alimentaron dos veces por semana y se subcultivaron entre los días 10 y 13 liberando las células mediante exposición a tripsina al 0,05% y EDTA 0,53 mM durante 5 minutos. Las células se sembraron nuevamente a una densidad de 8 x 10³ células/cm² para todos los subcultivos posteriores. Para algunos experimentos, se llevó a cabo el subcultivo adicional al alcanzar las células la confluencia, típicamente 5 a 7 días después de la siembra.

Procedimiento quirúrgico de fusión espinal

Bajo anestesia endotraqueal general se realizó una incisión longitudinal en la línea media posterior desde T10 hasta L7. Se utilizó el corte por cauterización para delinear las puntas de los procesos espinosos L1 a L6 y se llevó a cabo la elevación subperiosteal de los músculos paraespinales. Se extirpó el ligamento interespinoso y el tejido interlaminares en los espacios L1-2, L3-4 y L5-6 conservando el ligamento flavum. Se utilizó una fresa dental para extirpar el cartílago de la carilla hasta el nivel del hueso subcondral y para llevar a cabo una descorticación superficial de las superficies laminares contiguas bajo irrigación continua de solución salina. Se evitó la entrada en el canal neural. Tras completar la preparación del sitio, se introdujo una gasa empapada en solución salina en cada sitio de fusión, se cubrió la herida y un asistente no quirúrgico seleccionó ciegamente una carta que contenía la asignación de material/sitio para el animal en cuestión.

Se trituró ligeramente material cerámico de hidroxiapatita/fosfato tricálcico (HA/TCP) poroso, suministrado por Zimmer Inc. En una combinación de 60/40, y se tamizó para seleccionar un tamaño de partícula comprendido entre 1,0 y 2,5 mm de diámetro. Tras la esterilización de los gránulos, se incubaron 15 millones de CMMs con 1 cm³ de cerámica durante 3 horas a 37°C bajo agitación cada 30 minutos. Tal como se ha indicado anteriormente, los grupos de implante consistían de: 1) gránulos de cerámica combinados con CMMs autólogos, 2) gránulos de cerámica combinados con CMMs autólogos y médula ósea fresca obtenida mediante aspiración, y 3) gránulos cerámicos combinados con médula ósea fresca sola.

Tras la preparación de todos los materiales de injertación, los materiales se introdujeron cuidadosamente en los sitios apropiados para los mismos. Se utilizó aproximadamente 1 cm³ de cada injerto para rellenar el área de las carillas extirpadas y el espacio interlaminares. El resto de cada injerto se depositó en capas sobre la superficie dorsal de las láminas contiguas.

A continuación, se aplicó la fijación en cada sitio. Se utilizó una fresa de 1 mm para realizar un orificio en la región central del proceso espinoso distal en cada sitio. Se colocaron unas placas de acero inoxidable 316L (0,125" x 0,4" x 1,4") en cada cara de los procesos espinosos contiguos y se fijaron al proceso espinoso caudal utilizando tornillo y tuerca de acero inoxidable (tamaño 2-56, 0,5" de longitud). La presencia de cuatro orificios simétricos en cada placa permiten la selección de entre tres longitudes potenciales de fijación para adaptarse a las variaciones de distancia interespinosa en los sitios individuales (0,75", 0,90" y 1,05"). La fijación al proceso espinoso craneal en cada nivel se consigue mediante taladrado a través del orificio apropiado en las placas, creando un orificio en el proceso espinoso y pasando un segundo tornillo y tuerca. Se apretaron ambos tornillos firmemente sin fracturar los procesos espinosos. Seguidamente se aplicó un segundo tornillo de ajuste en cada sitio para impedir el aflojamiento. A continuación, se cerró la herida espinal y el sitio donante de autoinjerto mediante suturas O-Dexon Plus en fascia profundas, suturas subcutáneas interrumpidas de 2-0 Dexon Plus y después grapas en la piel.

ES 2 329 953 T3

Tras la preparación estéril de la piel, se realizó una pequeña incisión penetrante (3 mm) utilizando una cuchilla del nº 11. Se introdujo una aguja de aspiración de médula ósea Lee-Lok (Lee-Lok Inc., Minneapolis, MN) en la cavidad ósea. Se retiró el obturador. A continuación, se aspiró rápidamente la médula ósea en una jeringa de 10 cm³ y se mezcló con la matriz de cerámica granular y se dejó reposar durante 10 a 15 minutos para permitir la formación de coágulo. Seguidamente se expulsó a presión el exceso de líquido con una esponja de gasa y se implantó un volumen de 2 cm³ de matriz impregnada con médula ósea fresca.

Cuidados de los animales

Los animales experimentales recibieron cuidados de acuerdo con los “Principles of Laboratory Care” y “The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”, publicación del NIH nº 85-23, 1985.

Cada animal recibió antibióticos profilácticamente de penicilina G, 500.000 unidades IM preoperatoriamente y ampicilina 250 mg po al día durante cinco días post-operatoriamente. Se utilizó acepromazina y tilenol para el dolor perioperatorio. No se aplicó inmovilización externa. Los animales se alojaron en jaulas durante tres días post-operatoriamente y después se trasladaron a cintas, donde realizaron ejercicios diariamente.

Medicación

Premedicación:	-Atropina (0,02 mg/libra) IM
	-Penicilina G, 1,2 millones de U IM
Sedación para el primer aspirado:	-Pentobarbital, 20 a 25 mg/kg IV
Inducción:	-Tiamilal Na (Surital), 6 a 8 mg/libra IV
Anestesia:	-Halotano en circuito cerrado y oxígeno
Post-operatoriamente:	-Penicilina G, 250 mg IM, qd x 5d
Distrés/dolor:	-Acepromazina, 2,2 mg/10 kg IV prn
Eutanasia:	-Pentobarbital, 50 mg IVP

Recogida de especímenes

Tras doce semanas, los animales se eutanzaron con una sobredosis de pentobarbital y se extirpó intacta la columna lumbar. Se obtuvieron radiografías Faxitron laterales para documentar la integridad de la fijación. Tras extraer las placas, se limpiaron meticulosamente de tejido blando los segmentos individuales, procurando no dañar la masa de fusión y con el fin de evitar la deshidratación del espécimen. A continuación, los segmentos se impregnaron con resina ortodóntica (Meer Dental Supply, Cleveland, OH) y se congelaron en bolsas de plástico de doble sellado a -20°C.

Análisis cuantitativo de imágenes de TC de los sitios de fusión

Se llevó a cabo la evaluación cuantitativa de la masa de fusión utilizando tomografía computerizada (TC) de rayos X helicoidal y técnicas de procesamiento de imágenes tridimensionales. Entre las mediciones cuantitativas en cada sitio de fusión se incluían: 1) volumen de masa de fusión, 2) área medida en el plano transaxial y permite identificar del disco, y 3) densidad de mineralización de la masa de fusión.

Se realizó el escaneo con un escáner Somatome Plus 40 CT (Siemens Medical Systems). El espécimen se colocó con el eje craneal-caudal perpendicularmente a la dirección de desplazamiento de la mesa. En esta orientación los espacios intervertebrales se encuentran orientados perpendicularmente al plano de escaneo. Lo expresado anteriormente reduce la probabilidad de omitir características de las no uniones presentes en el plano transaxial y permite identificar con mayor exactitud la línea media del espacio intervertebral. Los escaneos se realizaron a 120 kVp, 210 mA, modo helicoidal 1 segundo, 2 mm de colimación y velocidad de la mesa de 2 mm/s durante 30 segundos. Lo anterior produjo imágenes con un espesor de sección de 2 mm y área de píxel de 1 mm². A continuación, las imágenes se reconstruyeron utilizando el algoritmo óseo y un solapamiento entre imágenes de 1 mm. Lo expresado anteriormente proporciona la máxima resolución espacial posible que se encuentra disponible en tres dimensiones (es decir, un tamaño de vóxel de 1 mm³). Se situó un fantasma de densidad mineral ósea de Siemens debajo de cada espécimen para proporcionar una referencia para la cuantificación de la densidad de mineralización ósea.

Los valores de TC de hueso y de tejido blando son fácilmente diferenciables (TC de hueso: 150 a 1.000, TC de tejido blanco: 0 a 20). Por lo tanto, se llevó a cabo la segmentación tridimensional de las bases de datos de volumen reconstruido utilizando un algoritmo básico automatizado de umbral en cada sección bidimensional, seguido de un algoritmo de conectividad entre secciones. Tras segmentar la base de datos tridimensionales, se midió el volumen de la masa de fusión en una región de interés específica, definida por los marcadores anatómicos fiduciales. El usuario selecciona dos puntos que definen los puntos más dorsales de los forámenes neurales izquierdo y derecho en el nivel de interés y en un nivel superior y en un nivel inferior al sitio de interés. El usuario también identifica el punto medio del disco intervertebral. Las herramientas interactivas para manipular y visualizar las bases de datos 3-D se desarrollaron utilizando la biblioteca GL y el kit de herramientas Iris Inventor, disponibles en una estación de trabajo de Silicon Graphics.

El volumen de la masa de fusión se calculó sumando los vóxels segmentados (hueso) en el interior de la región de interés específica y multiplicando dicha suma por el volumen de vóxel apropiado (1 mm^3). El área de la masa de fusión se midió en el plano transversal central de la fusión sumando el número de píxels segmentados (hueso) en la sección central de la fusión y multiplicando la suma por el área de píxel apropiada (1 mm^2). Se calculó una densidad de mineralización media para la masa de fusión completa, refiriéndola a la densidad del fantasma. Se proporciona un mapa topográfico 2-D de la densidad mineral ósea en el plano transversal central del disco. El volumen original de hueso y la sección transversal ósea de la región de interés para cada segmento pueden estimarse midiendo la misma región en el segmento o segmentos normales contiguos. Lo anterior se utiliza para normalizar los datos de cada segmento de fusión.

El software para dicho análisis cuantitativo requiere cuatro módulos: segmentación 3-D, animación para la visualización de planos transversales y puntos marcadores fiduciales, cálculo de la región rectangular de interés y mediciones cuantitativas de la fusión ósea, y un módulo visualizador interactivo para visualizar los datos reconstruidos en 3-D.

Ensayos mecánicos

Previamente a los ensayos, se descongeló cada espécimen durante 24 horas a temperatura ambiente. Los ensayos se llevaron a cabo en un MTS TESTAR Bionix System utilizando un dispositivo adaptado de flexión en cuatro puntos. Tras tres ciclos sinusoidales de acondicionamiento, se recogieron no destructivamente datos de desplazamiento de carga en flexión-extensión y flexión izquierda-derecha. A continuación, se llevaron a cabo los ensayos de fractura en flexión derecha utilizando la función rampa a 8 mm/s . Se seleccionó la flexión como modo de fractura debido a que se ha encontrado en estudios anteriores (94) que la rigidez de flexión presenta la correlación máxima con el estado de unión. Se utilizaron cargas de desplazamiento de carga para derivar la rigidez, la carga máxima, el desplazamiento de fractura y la energía total de fractura.

Puntuación de unión

Inmediatamente después de los ensayos mecánicos, se examinaron las superficies del espécimen fracturado utilizando una sonda metálica. Mediante la comparación de ambas caras de la superficie de la fractura, se puntúa el grado de unión de cero a cuatro basándose en un sistema de cuadrícula regional (figura 11). Una puntuación de cuatro se define como una fusión completa de ambas carillas articulares y la lámina completa. Se añade medio punto para la unión en cualquier mitad de cada carilla articular o en cualquiera de los cuatro cuadrantes de las superficies laminares contiguas. Por lo tanto, las puntuaciones 0, 1, 2, 3 y 4 representan la unión de aproximadamente 0, 25, 50, 75 y 100 por ciento del área transversal del volumen injertado, respectivamente. La puntuación se realiza por consenso de dos observadores que examinan los especímenes simultáneamente y que son ciegos respecto al material injertado en cada sitio.

Análisis estadístico de los datos de puntuación de unión y de la TC de fusiones espinales

Se analizaron los datos de puntuaciones de unión y los generados en las TC para determinar si el resultado difería estadísticamente debido a efectos de sitio y/o de material. La base de datos se considera "incompleta" debido a que únicamente pudieron someterse a ensayo un material en cada sitio de un animal. Por lo tanto, tanto el sitio como el material son factores repetidos, aunque con observaciones faltantes. Con el fin de incluir el perfil de datos faltantes del diseño experimental, así como la posible correlación entre las observaciones en un mismo animal, se utilizó un modelo de regresión para datos de mediciones repetidas. Esta estrategia de modelado utiliza el enfoque de ecuación de estimación generalizada (GEE) descrito por Zeger *et al.* (150) y por Ou *et al.* (108). Debido a que las puntuaciones de unión para un perro dado son potencialmente no independientes, se utilizó una estructura de trabajo de la independencia de covarianza, así como una estimación robusta de la varianza, durante el ajuste del modelo. La estructura de covarianza no puede ignorarse sin que ello suponga un impacto sobre inferencias realizadas a partir de los coeficientes de regresión para los efectos de sitio y material. Se utilizaron pruebas t con estimaciones robustas de la varianza para las comparaciones específicas entre materiales y sitios, tal como describe Paik (112). La puntuación de unión sigue siendo el parámetro de resultado principal, sin embargo las propiedades de distribución de los datos de la TC determinarán finalmente la estrategia de modelado estadístico.

ES 2 329 953 T3

Análisis estadístico de los datos de ensayos mecánicos de fusiones espinales

Los parámetros mecánicos resultan fuertemente influidos por la puntuación de unión. Por lo tanto, se utilizaron los ensayos mecánicos en este modelo como parámetro de resultado secundario, principalmente como medio para comparar las propiedades del material del hueso formado en las fusiones completas (área transversal grande-puntuación de unión de entre 3,5 y 4,0) inducidas por diferentes materiales. El hecho de que se seleccionasen uniones completas permitió comparar fusiones que presentaban momentos de inercia similares. La complejidad de la geometría ósea en las fusiones parciales y la amplia variación local de la calidad del tejido blando no unido en el sitio de injertación impidió la realización de un análisis útil de las uniones parciales. La elección de dicha estrategia refleja la creencia práctica de que, a menos que la puntuación de unión sea elevada, las propiedades del material del hueso formado por un material de injertación dado no resultarán clínicamente importantes. Se utilizó la prueba t de Student para las comparaciones de primer orden. El análisis de datos apareados es el más apropiado, pero no resulta posible a menos que las tasas de unión de los dos materiales que deben compararse sean elevadas.

Resultados preliminares del estudio de fusiones espinales en perros grandes

Al incubar 15 millones de CMMS en 1 cm³ de cerámica granular, utilizando las técnicas para crear gránulos de cerámica cargados de CMMs descritos en la presente solicitud, se encontró que más del 95% de las CMMs proporcionadas eran adherentes al material cerámico tras un periodo de incubación de 3 horas a 37°C. El material cerámico-CMMs se ajustaba perfectamente en el interior del sitio del defecto quirúrgico creado, sin evidencia de migración alguna del material implantado incluso 12 semanas después de la operación. Las muestras, con o sin CMMs, que se combinaron con médula fresca en el momento de la implantación, formaron un coágulo blando que cubrió laxamente la cerámica. No se produjeron problemas técnicos durante la preparación ni durante la implantación de ninguna muestra. El análisis de las células derivadas de cada animal demostró el potencial osteogénico *in vitro* y la formación significativa de hueso en el ensayo estándar de implantación ectópica *in vivo*.

Se sacrificaron todos los animales 12 semanas después de la cirugía. Unas placas radiográficas simples demostraron la presencia de unión ósea en prácticamente la totalidad de los animales que recibieron implantes basados en CMMs. La reconstrucción tridimensional a partir de los escaneos de TC de 2 mm de espesor a intervalos de 1 mm a través del sitio quirúrgico ilustran una masa de fusión más grande en aquellas regiones que contienen implantes con CMMs en comparación con implantes que contienen únicamente médula fresca. Las puntuaciones de fusión de las muestras que contienen CMMs también eran más altas que aquellas que contenían únicamente médula ósea. Además, dichas puntuaciones de fusión también eran más altas que las alcanzadas en un estudio anterior utilizando muestras preparadas de manera similar que contenían BMP-2 humana recombinante.

Ejemplo 6

Reparación de defectos óseos utilizando médula ósea en una esponja que contenía colágeno absorbible

Los objetivos del presente estudio eran demostrar la eficacia de la médula ósea y/o de las células madre mesenquimales (CMMs) durante la cicatrización de los defectos óseos clínicamente significativos en un modelo animal establecido.

Materiales y métodos

En el estudio, se utilizaron ratas Fischer 344 (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) de aproximadamente 325 gramos de peso. Se creó en cada fémur un hueco femoral bilateral de 8 mm de longitud. Esta longitud se encuentra aproximadamente en el diámetro de la diáfisis media del fémur. Se aplicó una placa interna de fijación con cuatro alambres Kirschner. Se trataron separadamente los grupos de comparación con uno de los siguientes:

- (1) esponja estéril Gelfoam® (Upjohn-Kalamazoo, MI),
- (2) polvos estériles Gelfoam®,
- (3) coágulo sanguíneo periférico,
- (4) coágulo sanguíneo periférico más médula derivada de cuatro huesos,
- (5) esponja Gelfoam® que contiene médula derivada de cuatro huesos,
- (6) esponja Gelfoam® más cantidades variables de médula procedente de entre un hueso completo y medio hueso en presencia y en ausencia de sangre periférica fresca para proporcionar un coágulo.

ES 2 329 953 T3

En este sistema animal, la médula fresca de cuatro huesos rinde aproximadamente 150 millones de células, mientras que la médula de medio hueso rinde aproximadamente 20 millones de células nucleadas. Cada grupo estaba constituido por un mínimo de tres animales, la totalidad de los cuales se sacrificaron seis semanas después de la cirugía para obtener los resultados finales deseados. Algunos animales se sometieron a radiografías Faxitron de alta resolución en un punto intermedio tres semanas después del implante. En el punto temporal de las seis semanas, cuando se sacrificaron todos los animales, se extrajeron las extremidades, se radiografiaron y se prepararon para la evaluación histológica no descalcificada.

Las propiedades de manipulabilidad de la esponja Gelfoam[®], en combinación con médula fresca en presencia o en ausencia de coágulo sanguíneo periférico fresco, resultaron deseables y prácticamente equivalentes.

Resultados

La evaluación de las radiografías tras el sacrificio de los animales a las 6 semanas no reveló la presencia de hueso en la región del defecto en aquellos animales con implante de esponja Gelfoam[®] sola o en los animales con implante de médula fresca y un coágulo periférico. Se observó una formación mínima de espinas endostiales de hueso nuevo en los márgenes cortados del defecto, tal como en el caso del control histórico de no implante solo. Por el contrario, aquellos animales que recibieron esponja Gelfoam[®] más médula procedente de cuatro huesos o de un hueso, en ausencia o en presencia de coágulo periférico, mostraron una respuesta robusta de cicatrización osteogénica en la región del implante. Los animales con implante de esponja Gelfoam[®] y médula procedentes de medio hueso en presencia de coágulo periférico mostraron únicamente cantidades modestas de formación de hueso. Finalmente, los animales con implante de esponja Gelfoam[®] y médula procedentes de medio hueso en ausencia de coágulo periférico fresco mostraron una falta de hueso en la región del defecto. El análisis histológico de todos los especímenes confirma las observaciones realizadas basándose en radiografías de alta resolución. La formación de neocórtex en muestras de esponja Gelfoam[®] cargada de células medulares fue impresionante. La evaluación histológica también indica que no resultó retenido material residual de Gelfoam[®] en el sitio del implante a las seis semanas de la cirugía. Las muestras de esponja Gelfoam[®] cargadas de médula procedentes de un hueso mostraron islotes de elementos hematopoyéticos en desarrollo en el canal medular. Las interfaces huésped-implante aparentemente se encontraban intactas.

En resumen, la respuesta osteogénica significativa de la médula singénica en cada una de las ratas receptoras con implante de esponja Gelfoam[®] indica la conveniencia de dicha implantación combinada de células y matriz para la reparación de defectos óseos significativos.

Literatura citada

1. **Armitage JO, and Klassen LW.** Bone Marrow transplantation, New York, Churchill Livingstone, 1984: 1085-1111. (Koeple JA, ed. In: Laboratory Hematology).
2. **Ashton BA, Abdullah F, Cave J, et al.:** Characterization of cells with high alkaline phosphatase activity derived from human bone and marrow: preliminary assessment of their osteogenicity. *Bone* 6:313-9, 1985.
3. **Aurori BF, Weierman RJ, Lowell HA, Nadel CI, and Parsons JR.:** Pseudarthrosis after spinal fusion for scoliosis. A comparison of autogeneic and allogeneic bone grafts. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 199:153-158, 1985.
4. **Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, and Antosz ME.:** Mineralized bone nodules formed *in vitro* from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcified Tissue International* 38:143-54, 1986.
5. **Beresford, J.N.:** Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 240: 270-280, 1989.
6. **Bolander ME, and Balian G.:** The use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. Augmentation with extracted matrix proteins and a comparison with autologous grafts. *Journal of Bone & Joint Surgery American* 68:1264-74, 1986.
7. **Bos GD, Goldberg VM, Powell AE, Heiple KG, and Zika JM.:** The effect of histocompatibility matching on canine frozen bone allografts. *Journal of Bone & Joint Surgery American* 65:89-96, 1983.
8. **Bos GD, Goldberg VM, Zika JM, Heiple KG, and Powell AE.:** Immune responses of rats to frozen bone allografts. *Journal of Bone & Joint Surgery American* 65:239-246, 1983.
9. **Brandwein JM, Callum J, Rubinger M, Scott JG, and Keating A.:** An evaluation of outpatient bone marrow harvesting [see comments]. *Journal of Clinical Oncology* 7:648-50, 1989.
10. **Bruder, S.P., and Caplan, A.I. (1990)** *Bone* 11, 133-139.

ES 2 329 953 T3

11. **Bruder, S.P.; Fink, D.J.; and Caplan, A.I.:** Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J. Cell. Biochem.* 56:283-294, 1994.
12. **Bruder, S.P.; Eames, B.F.; and Haynesworth, S.E.:** Osteogenic induction of purified human mesenchymal stem cells *in vitro*: Quantitative assessment of the osteoblastic phenotype. *Trans. Ortho. Res. Soc.* 20:464, 1995.
13. **Bruder, S.P.; Jaiswal, N.; Haynesworth, S.E.:** Growth kinetics, self-renewal and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation, (1997) *J. Cell Biochem.* 64¹(2):278-294.
- 10 14. **Bruder, S.P., Lawrence, E.G., and Haynesworth, S.E. (1995)** *Trans. Ortho. Res. Soc.* 20, 8.
- 15 15. **Bucholz, R.W., Carlton, A., and Holmes, R.E. (1987)** *Orthop. Clin. North Am.* 18, 323-334.
16. **Bucholz RW, Carlton A, and Holmes R.:** Interporous hydroxyapatite as a bone graft substitute in tibial plateau fractures. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 240:53-62, 1989.
17. **Buckner CD, Clift RA, Sanders JE, et al.:** Marrow harvesting from normal donors. *Blood* 64:630-4, 1984.
- 20 18. **Burton CV, Kirkaldy WW, Yong HK, and Heithoff KB.:** Causes of failure of surgery on the lumbar spine. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 157:191-199, 1981.
19. **Burwell RG.-** The function of bone marrow in the incorporation of a bone graft. [Review]. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 200:125-141, 1985.
- 25 20. **Burwell RG.:** Studies in the transplantation of bone. 8. Treated composite homograft-autografts of cancellous bone: an analysis of inductive mechanisms in bone transplantation. *Journal of Bone & Joint Surgery British* 48: 532-66, 1966.
- 30 21. **Burwell RG.:** Studies in the transplantation of bone. 7. *Journal of Bone & Joint Surgery British* 46:110, 1964.
22. **Caplan, A.I.:** Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9:641-650, 1991.
- 35 23. **Caplan, A.I.; Fink, D.J.; Goto, T.; Linton, A.E.; Young, R.G.; Wakitani, S.; Goldberg, V.M.; and Haynesworth, S.E.:** Mesenchymal stem cells and tissue repair. In *The Anterior Cruciate Ligament: Current and Future Concepts*. D.W. Jackson, ed. *Raven Press, Ltd.*, New York. 405-417, 1993.
24. **Caplan, A.I., and Bruder, S.P. (1997)** in *Textbook of Tissue Engineering*, eds. Lanza, R., Langer, R., and Chick, W. (*R.G. Landes Company, Georgetown*), pp. 603-618.
- 40 25. **Caplan, A.I. and Pechak, D. (1987)** in *Bone and Mineral Research/5*, ed. Peck, W.A. (*Elsevier, New York*), pp. 117-183.
- 45 26. **Connolly, J.F.; Guse, R.; Lippiello, J.; and Dehne, R.:** Development of an osteogenic bone-marrow preparation. *J. Bone Joint Surg.* 71(5):684-691, 1989.
27. **Connolly, J.F.; Guse, R.; Tiedeman, J.; and Dehne, R.:** Autologous marrow injection a a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 266:259-270, 1991.
- 50 28. **Cook SD, Reynolds MC, Whitecloud TS, et al.:** Evaluation of hydroxylapatite graft materials in canine cervical spine fusions. *Spine* 11:305-9, 1986.
29. **Cook, S.D., Wolfe, M.W., Salkeld, S.L., and Rueger, D.C. (1995)** *J. Bone Joint Surg.* 77-A, 734-750.
- 55 30. **Cornell CN, Lane JM, Chapman M, et al.:** Multicenter trial of Collagraft as bone graft substitute. *Journal of Orthopaedic Trauma* 5:1-8, 1991.
31. **Dennis JE, and Caplan AI.:** Porous ceramic vehicles for rat-marrow-derived (*Rattus norvegicus*) osteogenic cell delivery: effects of pretreatment with fibronectin or laminin. *Journal of Oral Implantology* 19:106-15, 1993.
- 60 32. **Dennis, J.E.; Haynesworth, S.E.; Young, R.G.; and Caplan, A.I.:** Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: Effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant* 1:23-32, 1992.
- 65 33. **Egrise, D.; Martin, D.; Vienne, A.; Neve, P.; and Schoutens, A.:** The number of fibroblastic colonies formed from bone marrow is decreased and the *in vitro* proliferation rate of trabecular bone cells increased in aged rats. *Bone* 13:355-361, 1992.

ES 2 329 953 T3

34. **Einhorn, T. A.; Lane, J. M.; Burstein, A. H.; Kopman, C. R.; and Vigorita, V. J.:** The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. *J. Bone Joint Surg.* 66(2):274-279, 1984.
35. **Eitel F, Seller H, and Schweiberer L.-.** [Morphological examination of animal-experiment results: comparison with regeneration of the human bone-structure. 11. Research results (author's transl)]. [German]. *Unfallheilkunde* 84:255-64, 1981.
36. **Fang, J., Zhu, Y-Y., Smiley, E., Bonadio, J., Rouleau, J.P., Goldstein, S.A., McCauley, L.K., Davidson, B.L., and Roessler, B.J. (1996)** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5753-5758.
37. **Feighan, J.E.; Davy, D.; Prewett, A.; and Stevenson, S:** Induction of bone by a demineralized bone matrix gel: a study in a rat femoral defect model. *J. Orthop. Res.* 13:881-891, 1995.
38. **Flatley TJ, Lynch KL, and Benson M.:** Tissue response to implants of calcium phosphate ceramic in the rabbit spine. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 179:246-52, 1983.
39. **Friedenstein AJ.:** Precursor cells of mechanocytes. [Review]. *International Review of Cytology* 47:327-59, 1976.
40. **Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, and Keiliss Bi.:** Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. *Transplantation* 17:331-40, 1974.
41. **Friedenstein AJ, Piatetzky SI, and Petrakova KV.:** Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology & Experimental Morphology* 16:381-90, 1966.
42. **Friedlaender GE, Strong DM, and Sell KW.:** Studies on the antigenicity of bone. 11. Donor-specific anti-HLA antibodies in human recipients of freeze-dried allografts. *Journal of Bone & Joint Surgery American* 66:107-12, 1984.
43. **Gepstein R, Weiss RE, and Hallel T.:** Bridging large defects in bone by demineralized bone matrix in the form of a powder. A radiographic, histological, and radioisotope-uptake study in rats. *Journal of Bone & Joint Surgery American* 69:984-92, 1987.
44. **Gerhart, T.N.; Kirker-Head, K.; Kriz, M.J.; Holtrop, M.E.; Hennig, G.E.; Hipp, J.; Schelling, S.H.; and Wang, E.:** Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 293:317-326, 1993.
45. **Glowacki, J.; Kaban, L.B.; Murray, J.E.; Folkman, J.; and Mulliken, J.B.:** Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects. *Lancet* 1:959-968, 1981.
46. **Glowacki J, and Multiken JB.:** Demineralized bone implants. [Review]. *Clinics in Plastic Surgery* 12:233-41, 1985.
47. **Goshima, J.; Goldberg, V.M.; and Caplan, A.I.:** The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 269:274-283, 1991.
48. **Grande, D.A., Southerland, S.S., Manji, R., Pate, D.W., Schwartz, S.E., and Lucas, P.A. (1995)** *Tissue Engin.* 1(4), 345-353.
49. **Grundel, R.E.; Chapman, M.W.; Yee, T.; and Moore, D.C.:** Autogeneic bone marrow and porous biphasic calcium phosphate ceramic for segmental bone defects in the canine ulna. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 266:244-258, 1991.
50. **Harakas NK.:** Demineralized bone-matrix-induced osteogenesis. [Review]. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 188:239-251, 1984.
51. **Haynesworth, S.E., Baber, M.A., and Caplan, A.I. (1995)** *Trans. Ortho. Res. Soc.* 20, 7.
52. **Haynesworth, S.E., Baber, M.A., and Caplan, A.I. (1996)** *J. Cell Physiol.* 166(3), 585-592.
53. **Haynesworth SE, Baber MA, and Caplan AI.:** Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 13:69-80, 1992.
54. **Haynesworth, S.E.; Goshima, J.; Goldberg, V.M.; and Caplan, A.I.:** Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone.* 13:81-88, 1992.
55. **Healey JH, Zimmerman PA, McDonnell JM, and Lane JM.:** Percutaneous bone marrow grafting of delayed union and nonunion in cancer patients. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 256:280-285, 1990.

56. **Heckman JD, Boyan BD, Aufdemorte TB, and Abbott JT.**: The use of bone morphogenetic protein in the treatment of non-union in a canine model. *Journal of Bone & Joint Surgery American* 73:750-64, 1991.
57. **Holmes RE, Bucholz RW, and Mooney V.**: Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in diaphyseal defects: a histometric study. *Journal of Orthopaedic Research* 5:114-21, 1987.
58. **Holocek, J.; Lennon, D.L., Haynesworth, S.E.; Marshak, D.R.; and Caplan, A.I.**: *Unpublished data*.
59. **Huang S, and Terstappen LW.**: Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells [retraction of Huang S, Terstappen LW. In: *Nature* 1992 diciembre 24-31;360 (6406):745-9]. *Nature* 368:1994.
60. **Huang S, and Terstappen LW.**: Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells [see comments] [retracted by Huang S, Terstappen LW. In: *Nature* 1994 abril 14;368(6472):664]. *Nature* 360:745-9, 1992.
61. **Hunt, T.R.; Schwappach, J.R.; and Anderson, H.C.**: Healing of a segmental defect in the rat femur with use of an extract from a cultured human osteosarcoma cell-line (Saos-2). *J. Bone Joint Surg.* 78(1):41-48, 1996.
62. **Ishida H, Bellows CG, Aubin JE, and Heersche JN.**: Characterization of the 1,25-(OH)₂D₃-induced inhibition of bone nodule formation in long-term cultures of fetal rat calvaria cells. *Endocrinology* 132:61-6, 1993.
63. **Jaiswal, N. and Bruder, S.P.** *Trans. O.R.S.*: 524, 1997.
64. **Jaiswal, N.; Haynesworth, S.E.; Caplan, A.I.; and Bruder, S.P.**: Osteogenic differentiation of purified, culture-reexpanded human mesenchymal stem cells *in vitro*, (1997) *J. Cell Biochem.* 64^L(2):295-312.
65. **Johnson KA, Howlett CR, Bellenger CR, and Armati GP.**: Osteogenesis by canine and rabbit bone marrow in diffusion chambers. *Calcified Tissue International* 42:113-8, 1988.
66. **Johnstone, B.; Yoo, J.U.; Barry, F.P.**: *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal cells. *Trans. Ortho. Res. Soc.* 21: 65, 1996.
67. **Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, and Bolander ME.**: Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *Journal of Cell Biology* 110:2195-207, 1990.
68. **Kadiyala, S., Jaiswal, N., and Bruder, S.P.** (1997) *Tissue. Engin.* 3, (in press).
69. **Kadiyala, S., Kraus, K.H., and Bruder, S.P.** (1996) *Trans. Tissue. Engin. Soc.* 1, 20.
70. **Kadiyala, S., Young, R.G., Thiede, M.A., and Bruder, S.P.** (1997) *Cell Transplant.* 6, (in press).
71. **Kahanovitz N, and Arnoczky SP.**: The efficacy of direct current electrical stimulation to enhance canine spinal fusions. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 251:295-299, 1990.
72. **Kahn, A.; Gibbons, R.; Perkins, S.; and Gazit, D.**: Age-related bone loss: A hypothesis and initial assessment in mice. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 313:69-75, 1995.
73. **Lane JM, and Sandhu HS.**: Current approaches to experimental bone grafting. *Orthopedic Clinics of North America* 18:213-25, 1987.
74. **Lane, J. M.; Yasko, A.; Tomin, E.; Bostrom, M.; Rosen, V.; and Wozney, J.**: Orthopaedic application of BMP-2 in fracture healing. In *First International Conference on Bone Morphogenic Proteins*, Baltimore, MD, June 8-11 (abstract), 1994.
75. **Laurie, S.W.S.; Kaban, L.B.; Mulliken, J.B.; and Murray, J.E.**: Donor-site morbidity after harvesting rib and iliac bone. *Plast. Reconstr. Surg.* 73(6):933-938, 1984.
76. Leads from the MMWR. Transmission of HIV through bone transplantation: Case report and public health recommendations. *JAMA.* 260:2487-2488, 1988.
77. **LeBoy, P.S.; Beresford, J.; Devlin, C.; and Owen, M.**: Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures. *J. Cell Physiol.* 146:370-378, 1991.
78. **Lee, S.C., Shea, M., Battle, M.A., Kozitza, K., Ron, E., Turek, T., Schaub, R.G., and Hayes, W.C.** (1994) *J. Biomed. Mater. Res.* 28, 1149-1156.

ES 2 329 953 T3

79. **Lennon, D.P.; Haynesworth, S.E.; Young, R.G.; Dennis, J.E.; and Caplan, A.I.:** A chemically defined medium supports *in vitro* proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* 219:211-222, 1995.
- 5 80. **Lennon, D.P.; Haynesworth, S.E.; Bruder, S.P.; Jaiswal, N.; and Caplan, A.I.:** Human and animal mesenchymal progenitor cells from bone marrow: Identification of serum for optimal selection and proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 32(10):602-611, 1996.
81. **Lian JB, and Stein GS.:** Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. [Review]. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 3:269-305, 1992.
- 10 82. **Liang, C.T.; Barnes, J.; Seedor, J.G.; Quartuccio, H.A.; Bolander, M.; Jeffrey, J.J.; and Rodan, G.A.:** Impaired bone activity in aged rats: Alterations at the cellular and molecular levels. *Bone*. 13:435-441, 1992.
- 15 83. **Liebergall, M.; Young, R. G.; Ozawa, N.; Reese, J.; Davy, D. T.; Goldberg, V. M.; and Caplan, A. I.:** The effects of cellular manipulation and TGF- β in a composite bone graft. In: Bone Formation and Repair. Brighton, C., Friedlander, G., and Lane, J. (eds), *American Academy of Orthopaedic Surgeons*, Rosemont, Il, 367-378, 1994.
- 20 84. **Lindholm TS, Ragni P, and Lindholm TC.:** Response of bone marrow stroma cells to demineralized cortical bone matrix in experimental spinal fusion in rabbits. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 150:296-302, 1988.
85. **Lindholm TS, and Urist MR.:** A quantitative analysis of new bone formation by induction in composite grafts of bone marrow and bone matrix. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 150:288-300, 1980.
- 25 86. **Lovell TP, Dawson EG, Nilsson OS, and Urist MR.:** Augmentation of spinal fusion with bone morphogenetic protein in dogs. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 243:266-274, 1989.
- 30 87. **Majumdar, M.K.; Haynesworth, S.E.; Thiede, M.A.; Marshak, D.R.; Caplan, A.I.; and Gerson, S.L.:** Culture-expanded human mesenchymal stem cells (MSCs) express cytokines and support hematopoiesis *in vitro*. *Blood* 86 (10):494a (1995).
88. **Malaval, L.; Modrowski, D.; Ashwani, G.; and Aubin, J.E.:** Cellular expression of bone-related proteins during *in vitro* osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J. Cell Physiol.* 158:555-572, 1994.
- 35 89. **Maniatopolous, C.; Sodek, J.; and Melcher, A.H.:** Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tiss. Res.* 254:317-330, 1988.
- 40 90. **McDavid PT, Boone M2, Kafrawy AH, and Mitchell DF.:** Effect of autogenous marrow and calcitonin on reactions to a ceramic. *Journal of Dental Research*, 58:147883, 1979.
91. **Moore DC, Chapman MW, and Manske D.:** The evaluation of a biphasic calcium phosphate ceramic for use in grafting long-bone diaphyseal defects. *Journal of Orthopaedic Research* 5:356-65, 1987.
- 45 92. **Mosca, J.D., Majumdar, M.K., Hardy, W.B., Pittenger, M.F., and Thiede, M.A. (1997)** *Blood* 88(10), 186a.
93. **Mulliken JB, Kaban LB, and Glowacki J.:** Induced osteogenesis-the biological principle and clinical applications. *Journal of Surgical Research* 37:487-96, 1984.
- 50 94. **Muschler GF, Huber B, Ullman T, et al.:** Evaluation of bone-grafting materials in a new canine segmental spinal fusion model. *Journal of Orthopaedic Research* 11:514-24, 1993.
95. **Muschler GF, Hyodo A, Manning T, Kambic H, and Easley K.:** Evaluation of human bone morphogenetic protein 2 in a canine spinal fusion model. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 308:229-240, 1994.
- 55 96. **Muschler GF, Lane JM, and Dawson EG.:** The biology of spinal fusion. New York: *Springer-Verlag*, 1990:9-21. (Cotler JM, Cotler HB, ed. Science and techniques).
- 60 97. **Muschler GF, Negami S, Kambic H, and Easley K.:** The evaluation of collagen and ceramic composites as bone graft materials in a canine posterior segmental spinal fusion model. *Submitted to Clinical Orthopaedics & Related Research*.
98. **Muscolo DL, Caletti E, Schajowicz F, Araujo ES, and Makino A.:** Tissue-typing in human massive allografts of frozen bone, *Journal of Bone & Joint Surgery American* 69:583-95, 1987.
- 65 99. **Muthukumaran N, and Reddi AH.:** Bone matrix-induced local bone induction. [Review]. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 200:159-64, 1985.

100. **Nade S, Armstrong L, McCartney E, and Baggaley B.**: Osteogenesis after bone and bone marrow transplantation. The ability of ceramic materials to sustain osteogenesis from transplanted bone marrow cells: preliminary studies. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 181:255-63, 1983.
- 5 101. **Nade S, and Burwell RG.**: Decalcified bone as a substrate for osteogenesis. An appraisal of the interrelation of bone and marrow in combined grafts. *Journal of Bone & Joint Surgery British* 59:189-96, 1977.
102. **Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP, Haynesworth SE, Lennon DP, and Caplan AI.**: *in vitro* differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Experimental Cell Research* 195:492-503, 1991.
- 10 103. **Niedzwiedzki, T.; Dabrowski, Z.; Miszta, H.; and Pawlikowski, M.**: Bone healing after bone marrow stromal cell transplantation to the bone defect. *Biomaterials* 14:115-121, 1993.
104. **Nilsson OS, Urist MR, Dawson EG, Schmalzried TP, and Finerman GA.**: Bone repair induced by bone morphogenetic protein in ulnar defects in dogs. *Journal of Bone & Joint Surgery British* 68:635-42, 1986.
- 15 105. **Ohgushi, H.; Goldberg, V.M.; and Caplan, A. I.**: Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic: Experiments in rats. *Acta. Orthop. Scand.* 60:334-339, 1989.
- 20 106. **Ohgushi H, Goldberg VM, and Caplan AI.**: Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *Journal of Orthopaedic Research* 7:568-78, 1989.
107. **Oikarinen J.**: Experimental spinal fusion with decalcified bone matrix and deep-frozen allogeneic bone in rabbits. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 162:210-218, 1982.
- 25 108. **Ou Y, Piedmonte MR, and Medendorp SV.**: Latent variable models for clustered ordinal data. *Submitted to Biometrics*.
109. **Owen, M.**: Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. In Bone and Mineral/3. W.A. Peck, ed. *Elsevier*, Amsterdam, 1-25, 1985.
- 30 110. **Owen, M.**: Marrow stromal stem cells. *J. Cell Sci. Suppl.* 10:63-76, 1988.
111. **Owen M, and Friedenstein AJ.**: Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. [Review]. *Ciba Foundation Symposium* 136:42-60, 1988.
- 35 112. **Paik D.-.** Repeated measurement analysis for non-normal data in small samples. *Commun Statist Simulation* 17:1155-1171, 1988.
- 40 113. **Paley, D.; Young, M.C.; Wiley, A.M.; Fornasier, V.L.; and Jackson, R.W.**: Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bone defects. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 208:300-311, 1986.
114. **Pelker RR, McKay JJ, Troiano N, Panjabi MM, and Friedlaender GE.**: Allograft incorporation- a biomechanical evaluation in a rat model. *Journal of Orthopaedic Research* 7:585-9, 1989.
- 45 115. **Pereira, R. F.; Halford, K. W.; O'Hara, M. D.; Leeper, D. B.; Sokolov, B. P.; Pollard, M. D.; Bagasra, O.; and Prockop, D. J.**: Culture adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:4857-4861, 1988.
- 50 116. **Pittenger, M.F., Mackay, A.M., and Beck, S.C.** (1996) *Mol. Biol. Cell.* 7, 582a.
117. **Preiffer CA.-.** Development of bone from transplanted marrow in mice. *Anat Rec* 102:225, 1948.
118. **Quarto, R.; Thomas, D.; and Liang, T.**: Bone progenitor cell deficits and the age-associated decline in bone repair capacity. *Calcif. Tissue Int.* 56:123-129, 1995.
- 55 119. **Ragni P, Lindholm TS, and Lindholm TC.**: Vertebral fusion dynamics in the thoracic and lumbar spine induced by allogenic demineralized bone matrix combined with autogenous bone marrow. An experimental study in rabbits. *Italian Journal of Orthopaedics & Traumatology* 13:241-51, 1987.
- 60 120. **Rejda BV, Peelen JG, and de GK.**: Tri-calcium phosphate as a bone substitute. *Journal of Bioengineering* 1:93-7, 1977.
121. **Saito, T.; Dennis, J.E.; Lennon, D.P.; Young, R.G.; and Caplan, A.I.**: Myogenic expression of mesenchymal stem cells within myotubes of mdx mice *in vitro* and *in vivo*. *Tissue. Engin.* 1(4):327-343, 1995.
- 65 122. **Salama R, and Weissman SL.**: The clinical use of combined xenografts of bone and autologous red marrow. A preliminary report. *Journal of Bone & Joint Surgery British* 60:111-5, 1978.

ES 2 329 953 T3

123. **Schuurman, H.-J., Hougen, H.P., and van Loveren, H.** (1992) *ILAR Journal*. 34(1-2), 3-12.
124. **Simmons DJ, Ellsasser JC, Cummins H, and Lesker P.**: The bone inductive potential of a composite bone allograft-marrow autograft in rabbits. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 97:237-47, 1973.
- 5 125. **Stabler CL, Eismont FJ, Brown MD, Green BA, and Malinin Ti.**: Failure of posterior cervical fusions using cadaveric bone graft in children. *Journal of Bone & Joint Surgery American* 67:371-5, 1985.
- 10 126. **Stevenson, S.; Cunningham, N.; Toth, J.; Davy, D.; and Reddi, A. H.**: The effect of osteogenin (a bone morphogenic protein) on the formation of bone in orthotopic segmental defects in rats. *J. Bone Joint Surg.* 76(11): 1676-1687. 1994.
- 15 127. **Stevenson S, Hohn RB, and Templeton JW.**: Effects of tissue antigen matching on the healing of fresh cancellous bone allografts in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 44:201-6, 1983.
128. **Tabuchi, C.; Simmon, D.J.; Fausto, A.; Russell, J.; Binderman, I.; and Avioli, L.**: Bone deficit in ovariectomized rats. *J. Clin. Invest.* 78:637-642, 1986.
- 20 129. **Takagi, K.; and Urist, M. R.**: The role of bone marrow in bone morphogenic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 171:224-231, 1982.
130. **Thomas ED, and Storb R.**: Technique for human marrow grafting. *Blood* 36:507-15, 1970.
- 25 131. **Thomas I, Kirkaidy WW, Singh S, and Paine KW.**: Experimental spinal fusion in guinea pigs and dogs: the effect of immobilization. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 112:363-375, 1975.
132. **Tiedeman, J.J.; Connolly, J.F.; Strates, B.S.; and Lippiello, L.**: Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 268:294-302, 1991.
- 30 133. **Tiedeman, J.J.; Hurman, W.W.; Connolly, J.F.; and Strates, B.S.**: Healing of a large nonossifying fibroma after grafting with bone matrix and marrow. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 265:302-305, 1991.
134. **Tomford WW, Starkweather RJ, and Goldman MH.**: A study of the clinical incidence of infection in the use of banked allograft bone. *Journal of Bone & Joint Surgery American* 63:244-8, 1981.
- 35 135. **Tsuji, T.; Hughhes, F.J.; McCulloch, C.A.; and Melchher, A.H.**: Effect of donor age on osteogenic cells of rat bone marrow *in vitro*. *Mech. Ageing Dev.* 51:121-132, 1990.
- 40 136. **Tuli SM, and Singh AD.**: The osteoninductive property of decalcified bone matrix. An experimental study., *Journal of Bone & Joint Surgery British* 60:116-23, 1978.
137. **Turksen K, and Aubin JE.**: Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells. *Journal of Cell Biology* 114:37384, 1991.
- 45 138. **Urist, M.R.**: Bone: Formation by autoinduction. *Science* 150:893-899, 1965.
139. **Urist MR, and Dawson E.**: Intertransverse process fusion with the aid of chemosterilized autolyzed antigenextracted allogeneic (AAA) bone. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 154:97-113, 1981.
- 50 140. **Urist MR, DeLange RJ, and Finerman GA.**: Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 220: 680-6, 1983.
141. **Villanueva JE, and Nimni ME.**: Promotion of calvarial cell osteogenesis by endothelial cells. *Journal of Bone & Mineral Research* 5:733-9, 1990.
- 55 142. **Wakitani, S.; Gotto, T.; Pineda, S. J.; Young, R. G.; Mansour, J. M.; Caplan, A. I.; and Goldberg, V. M.**: Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage *J. Bone Joint Surg.* 76A:579-592, 1994.
- 60 143. **Wakitani, S.; Saito, T.; and Caplan, A.I.**: Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle & Nerve* 18:1417-1426, 1995.
144. **Werntz, J.R.; Lane, J.M.; Burstein, A.H.; Justin, R.; Klein, R.; and Tomin, E.**: Qualitative and quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow. *J. Orthop. Res.* 14:85-93, 1996.
- 65 145. **Wolff, D.; Goldberg, V. M.; and Stevenson, S.**: Histomorphometric analysis of the repair of a segmental diaphyseal defect with ceramic and titanium fibermetal implants: Effects of bone marrow. *J. Orthop. Res.* 12:439-446, 1994.

ES 2 329 953 T3

146. **Wozney, J.M.; Rosen, V.; Celeste, A.J.; Mitsock, L.M.; Whitters, M.J.; Kriz, R.W.; Hewick, R.M.; and Wang, E.A.:** Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science*. 242:1528-1534, 1988.

5 147. **Yasko, A. W.; Lane, J. M.; Fellingner, E. J.; Rosen, V.; Wozney, J. M.; and Wang, E. A.:** The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenic protein (rhBMP-2). *J. Bone Joint Surg.* 74(5): 659-671, 1992.

148. **Young, R.G., Butler, D.L., Weber, W., Gordon, S.L., and Fink, D.J. (1997)** *Trans. Ortho. Res. Soc.* 22, 249.

10 149. **Younger, E.M.; and Chapman, M.W.:** Morbidity at bone graft donor sites. *J. Orthop. Trauma.* 3:192-195, 1989.

15 150. **Zeger SL, Liang KY, and Albert PS.:** Models for longitudinal data: a generalized estimating equation approach [published erratum appears in *Biometrics* 1989 May; 45(1):347]. *Biometrics* 44:1049-60, 1988.

151. **Zerwekh JE, Kourosch S, Scheinberg R, et al.:** Fibrillar collagen-biphasic calcium phosphate composite as a bone graft substitute for spinal fusion. *Journal of Orthopaedic Research* 10:562-72, 1992.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Composición para su utilización en el aumento de la formación de hueso, que comprende un biopolímero reabsorbible seleccionado de entre el grupo constituido por gelatina, celulosa y colágeno en combinación con células madre mesenquimales aisladas, en la que el biopolímero reabsorbible es una esponja, tira, película o malla de un implante tridimensional estructuralmente estable en forma de cubo, cilindro o bloque o conformado en una forma anatómica, y con la condición de que las células madre mesenquimales no sean células madre embrionarias humanas.

10 2. Composición según la reivindicación 1, en la que el biopolímero reabsorbible se encuentra en forma particulada.

3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la gelatina es una gelatina derivada de piel bovina.

15 4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende además por lo menos un factor bioactivo que induce o acelera la diferenciación de dichas células madre mesenquimales en el linaje osteogénico.

5. Composición según la reivindicación 4, en la que las células se ponen en contacto con el factor bioactivo *ex vivo*.

20 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 4 ó 5, en la que las células se ponen en contacto con el factor bioactivo cuando se encuentran en contacto con el biopolímero reabsorbible.

25 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que el factor bioactivo es un glucocorticoide sintético o una proteína morfogénica ósea.

8. Composición según la reivindicación 7, en la que el glucocorticoide sintético es dexametasona.

30 9. Composición según la reivindicación 7, en la que la proteína morfogénica ósea se encuentra en un portador líquido o semisólido apto para la inyección intramuscular, intravenosa, intramedular o intraarticular.

10. Composición según las reivindicaciones 7 ó 9, en la que la proteína morfogénica ósea se selecciona de entre el grupo constituido por BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6 y BMP-7.

35 11. Utilización de una composición farmacéutica según las reivindicaciones 1 a 11, para la preparación de un medicamento destinado a incrementar la formación ósea en un individuo que necesita la misma.

40 12. Utilización según la reivindicación 11, en la que el medicamento está destinado a la administración de la composición farmacéutica en una cantidad que incrementa de la formación de hueso.

45

50

55

60

65

70

FIG. 1A

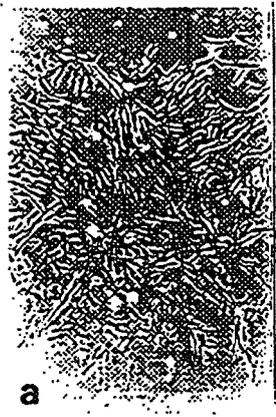


FIG. 1B

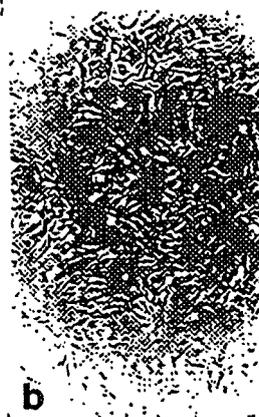


FIG. 1C



FIG. 1D



FIG. 2



FIG. 3A

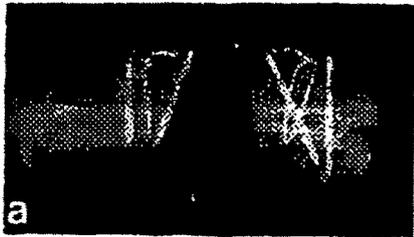


FIG. 3B

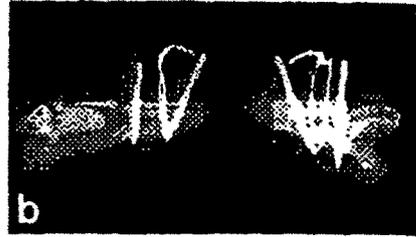


FIG. 3C



FIG. 3D

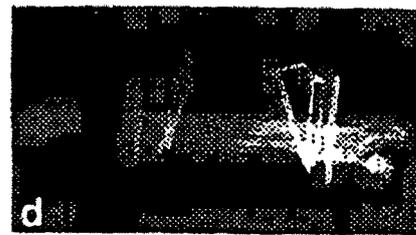


FIG. 3E

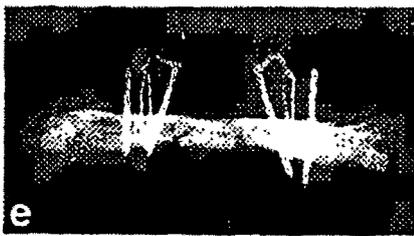


FIG. 3F



FIG. 3G



FIG. 3H



FIG. 4A



FIG. 4B



FIG. 4C



FIG. 4D



FIG. 4E



FIG. 4F



FIG. 5A

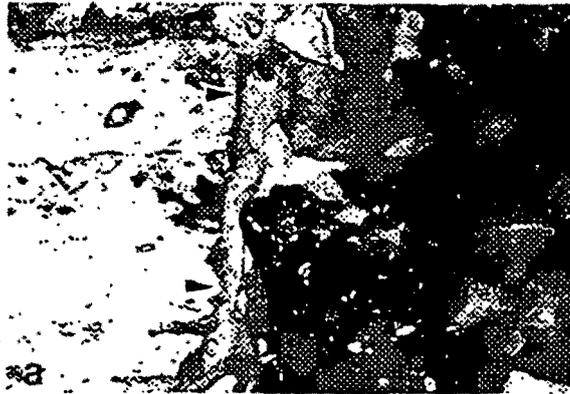


FIG. 5B

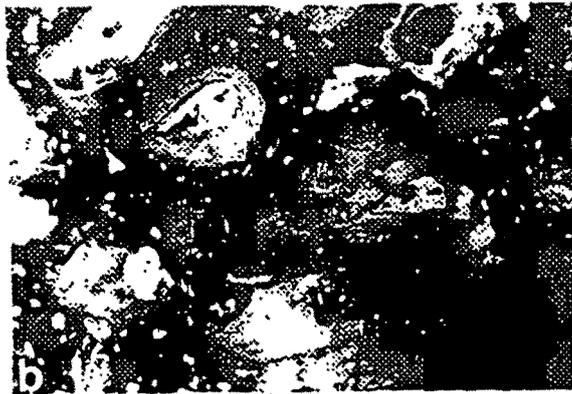


FIG. 6

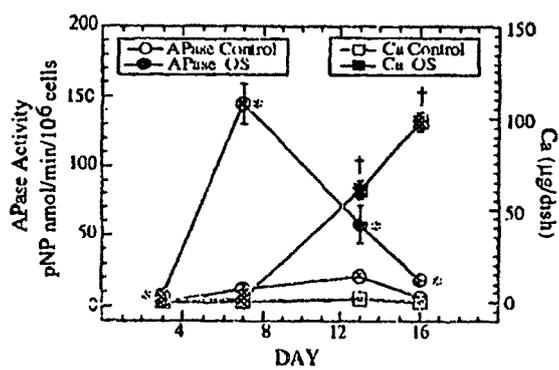
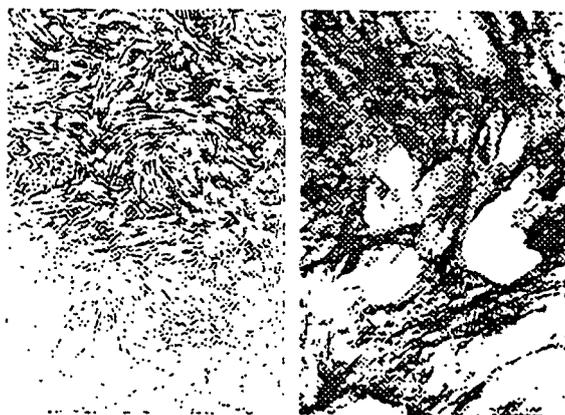


FIG. 7

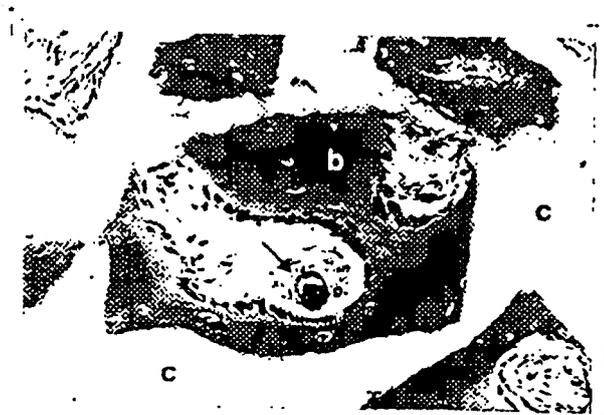


FIG. 8A



FIG. 8B



FIG. 8C



FIG. 9A



FIG. 9B



FIG. 9C



FIG. 9D



FIG. 9E



FIG. 9F

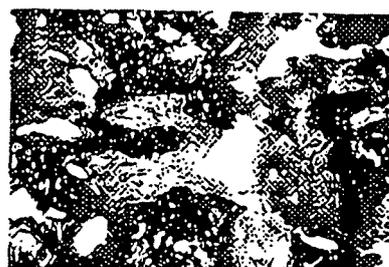


FIG. 10A

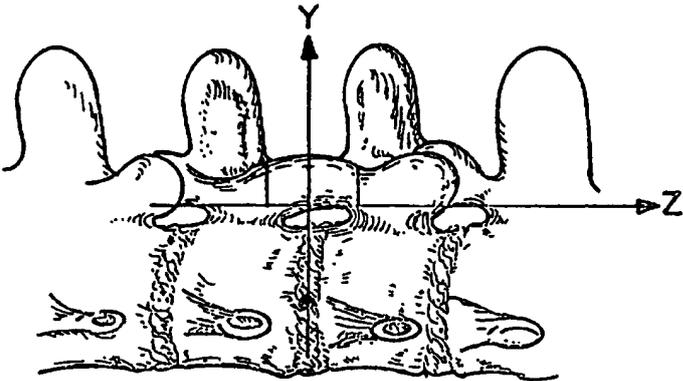


FIG. 10B

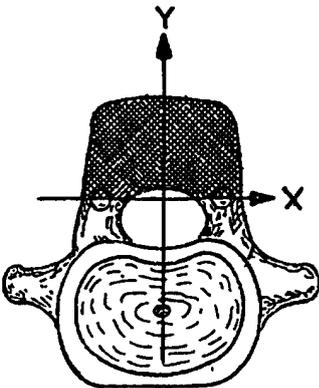
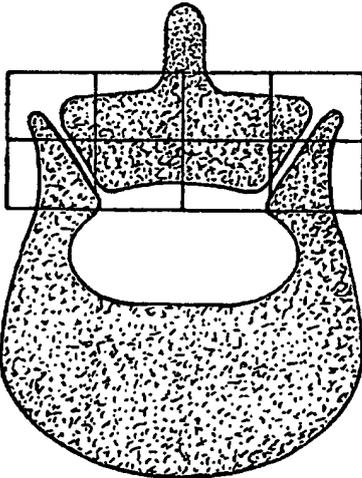


FIG. 11

POSTERIOR



ANTERIOR