



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 334 298**

(21) Número de solicitud: **200702694**

(51) Int. Cl.:

A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/42 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61F 2/28 (2006.01)

(12)

PATENTE DE INVENCIÓN

B1

(22) Fecha de presentación: **15.10.2007**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **08.03.2010**

Fecha de la concesión: **12.01.2011**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **24.01.2011**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente:
24.01.2011

(73) Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad de Málaga**

(72) Inventor/es: **Becerra Ratia, José;
Díaz Cuenca, Aránzazu y
Santos Ruiz, Leonor**

(74) Agente: **Pons Ariño, Ángel**

(54) Título: **Constructo útil para terapia de regeneración de tejidos, procedimiento de obtención y aplicaciones.**

(57) Resumen:

Constructo útil para terapia de regeneración de tejidos, procedimiento de obtención y aplicaciones. La presente invención consiste en un constructo, formado por un biomaterial compatible biológicamente, que sirve de soporte sobre el que se cultivan uno o más tipos de células vivas, de forma que se obtiene una estructura compleja tridimensional. El biomaterial soporte que se emplea para la elaboración del constructo de la invención, es del tipo sílice mesosestructurada (SBA-15) y/o bien se trata de un biomaterial compuesto formado por una matriz de sílice del tipo SBA-15 sobre el que se crecen nanopartículas de hidroxiapatito de calcio (HA). El constructo está particularmente indicado para su aplicación en las intervenciones reconstructivas de cirugía ortopédica y traumatología, en cirugía cervical y también en cirugía oral y maxilofacial, para su aplicación en terapias celulares destinadas a la regeneración tisular y a la curación de enfermedades del tejido esquelético (cartilaginoso y óseo).

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Constructo útil para terapia de regeneración de tejidos, procedimiento de obtención y aplicaciones.

5 Sector

La presente invención se enmarca dentro de áreas de conocimiento tales como la biología, la biotecnología, la ciencia de materiales, la farmacología, la medicina, la ingeniería o la nanotecnología entre otras. Sus aplicaciones van destinadas fundamentalmente a los sectores de la salud y la biomedicina, pudiéndose emplear en la mejora de tratamientos y terapias en medicina reconstructiva y medicina regenerativa, en el desarrollo de productos derivados de la ingeniería de tejidos como injertos, implantes o prótesis entre otros para animales, incluyendo dentro de estos al ser humano.

La presente invención está particularmente indicada para su aplicación en las intervenciones reconstructivas de cirugía ortopédica y traumatología, en cirugía cervical y también en cirugía oral y maxilofacial, para su aplicación en terapias celulares destinadas a la regeneración tisular y a la curación de enfermedades del tejido esquelético (cartilaginoso y óseo) y para su aplicación en la industria farmacéutica, en el estudio del perfil tóxico o terapéutico de moléculas o agentes biológicos susceptibles de ensayo como productos farmacéuticos entre otras muchas aplicaciones.

20 Estado de la técnica

La ingeniería de tejidos ó ingeniería tisular tiene como objetivo la construcción *ex vivo* de tejidos biológicos (artificiales) a partir de células, moléculas y materiales biocompatibles y su utilización médica. Se trata de un campo multidisciplinar que combina aspectos y conocimientos de medicina, farmacología, nanotecnología, ciencia de los materiales, ingeniería y biología. El término ingeniería tisular fue acuñado en 1988 por los participantes en la primera reunión patrocinada por la *National Science Foundation* (NSF) (M. S. Chapekar. *Tissue Engineering: Challenges and Opportunities*. *J Biomed Mater Res: Appl Biomater* 53 (2000) 617-620). En 1993 Langer y Vacanti (R. Langer, J. P. Vacanti. *Tissue Engineering*. *Science* 260 (5110) (1993) 920-926) resumieron los primeros avances en este campo definiendo la ingeniería de tejidos como: un “Campo interdisciplinario que engloba principios de ingeniería y de ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos que mantengan o restablezcan la función de los tejidos o de los órganos”. En 2001 El Comité Científico para Productos Medicinales y Dispositivos Médicos (SCMPMD) de la Comisión Europea DG SANCO estableció la siguiente definición: “Ingeniería de tejidos es la regeneración de tejidos biológicos mediante el uso de células con la ayuda de estructuras soporte y/o biomoléculas” (A.K. Bock, D. Ibarreta, E. Rodríguez-Cerezo. *Human tissue - engineered products - Today's markets and future prospects*. *Synthesis Report*. Report EUR 21000 EN. Seville: Institute for Prospective Technological Studies, 2003. Based on studies conducted by B. Hüsing, B. Bührlen, S. Gaisser, J. Senker, S. Mandi, C.J. Kirkpatrick). En la última década el desarrollo de la ingeniería tisular ha sido espectacular y la construcción de tejidos para su uso en medicina empieza a configurarse como una línea de investigación fundamental y una actividad industrial de primera magnitud. Como muestra de esto, cabe señalar que existen estudios que estiman que las cifras anuales de ventas a nivel mundial para los productos obtenidos mediante ingeniería de tejidos se sitúan en torno a los 60 millones de euros (A.K. Bock, D. Ibarreta, E. Rodríguez-Cerezo. *Human tissue - engineered products - Today's markets and future prospects*. *Synthesis Report*. Report EUR 21000 EN. Seville: Institute for Prospective Technological Studies, 2003. Based on studies conducted by B. Hüsing, B. Bührlen, S. Gaisser, J. Senker, S. Mandi, C.J. Kirkpatrick). En un informe más reciente, únicamente para el mercado estadounidense, se barajan cifras en torno a los 1,3 billones de dólares para 2007, (A.K. Bock, E.B. Rodriguez-Cerezo, B. Hüsing, B. Bührlen, M. Nusser. *Human tissue- engineered products: potential socio-economic impacts of a new european regulatory framework for authorisation, supervision and vigilance*. *Synthesis Report*. Report EUR 21838 EN. Seville: Institute for Prospective Technological Studies, 2005). A este desarrollo han contribuido entre otros factores las posibilidades científicas y tecnológicas derivadas de las células madre, tanto de origen embrionario, fetal como del adulto, ya que suponen un plus de posibilidades para la ingeniería tisular.

La ingeniería de tejidos marca una transición o un cambio de paradigma entre una medicina que sustituye o alivia los síntomas utilizando prótesis e implantes biocompatibles y mecánicamente estables (prótesis de articulaciones: cadera rodilla, hombro; dispositivos de fijación: tornillos, placas, agujas, cementos óseos, implantes dentales, marcapasos, válvulas, *stents* coronarios, catéteres, etc.) fabricados con materiales metálicos, cerámicos, poliméricos o materiales compuestos, y una medicina regenerativa que fomenta la capacidad del cuerpo de curarse a sí mismo mediante la utilización de implantes (constructos) en los que las células, autólogas o heterólogas, constituyen el elemento fundamental (J.P. Vacanti, R. Langer. *Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation*. *Lancet* 354 (suppl I) (1999) 32-34) (S.N. Parikh. *Bone graft substitutes: past, present, future*. *Journal of Postgraduate Medicine* 48(2) (2002)142-148) (M. Sittinger, D.W. Hutmacher, M. V. Risbud. *Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration*. *Current Opinion in Biotechnology* 15 (2004) 411-418). El desarrollo de estos nuevos implantes está sirviendo para paliar muchos de los problemas producidos por las prótesis y otros materiales que se usan actualmente como los problemas de estabilidad en la superficie debido a las interacciones de estos con los tejidos humanos y los fluidos fisiológicos con los que se encuentra en contacto la prótesis o el material. A veces no existe una congruencia biomecánica entre el implante y el tejido en el que se aplica, o se producen micropartículas por fricción y desgaste de los componentes de las prótesis en las articulaciones. Por otro lado las prótesis y otros materiales actuales, no poseen la capacidad de autoreparación o autoregeneración que tienen los tejidos naturales. Además, no existe la posibilidad de regular su respuesta biológica y biomecánica de acuerdo con los requerimientos del organismo en cada momento, pudiéndose producir infecciones, irritaciones crónicas.

ES 2 334 298 B1

cas, oclusiones y obstrucciones de los dispositivos vasculares o la necesidad de recurrir a terapias anticoagulantes (S.P. Hoerstrup, L. Lu, M.J. Lysaght, A.G. Mikos, D. Rein, F.J. Schoen, J.S. Temenoff, J.K. Tessmar, J.P. Vacanti. *Tissue engineering*. In: B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons, editors. *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine 2nd edition*. Elsevier Academic Press, San Diego, California; 2004. p. 709).

- 5 Como solución a los problemas que presentan las prótesis y demás materiales que se emplean, en la actualidad se trabaja en la síntesis de nuevos tejidos artificiales. Para construir estos nuevos tejidos artificiales, se utilizan tres componentes: células, materiales soporte (también denominados biomateriales, que hacen la función de la matriz extracelular, el medio en el que se encuentran las células, producido y controlado por ellas mismas) y señales moleculares (moléculas) de distinta naturaleza. Estos nuevos materiales se denominan constructos (son estructuras formadas por los tres componentes necesarios para configurar un tejido artificial y la arquitectura que adoptan en relación con su ubicación en el organismo) (A. Campos. Cuerpo, histología y medicina. De la descripción microscópica a la ingeniería tisular. Real Academia Nacional de Medicina. Documento publicado en el Diariomedico.com el 19 de Febrero de 2004). Para su elaboración se emplea la combinación de células por un lado y de un material soporte o matriz por otro.
- 10 15 Además pueden añadirse biomoléculas para modificar sus propiedades. Los materiales soporte son los denominados biomateriales, matrices, armazones, andamiajes tisulares o *scaffold*.

Como acaba de explicarse, para poder obtener un constructo en primer lugar necesitamos células. El desarrollo de la ingeniería tisular exige la elección y aplicación de uno o varios tipos celulares específicos que permitan el 20 aislamiento y manipulación de un número elevado de células. Estas células pueden provenir de cualquier animal, incluyendo al ser humano, y pueden ser autólogas o heterólogas. Por ejemplo para la elaboración de constructos *in vitro* con células humanas, en primer lugar se necesita la selección y multiplicación de células. Esta fase se desarrolla en placas de cultivo con un medio que incluye factores de crecimiento, vitaminas, etc., y suero bovino fetal o suero autólogo del propio paciente del que, a través de una pequeña biopsia, proceden las células. En segundo lugar, en el 25 proceso de ingeniería tisular para la elaboración de un constructo, se necesita que se produzca el asentamiento de las células sobre el biomaterial seleccionado. La relación entre la población celular y el biomaterial es decisiva para la diseminación tridimensional de las mismas y para la óptima y adecuada diferenciación de sus elementos. Esta relación depende en gran medida de las características del biomaterial empleado (M. Sittinger, J. Bujia, N. Rotter, D. Reitzel, W. W. Minuth, G. R. Burmester. *Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with 30 resorbable biomaterials and new cell culture techniques*. *Biomaterials* 17 (1996) 237-242) (J. M. Orban, K. G. Marra, J. O. Hollinger. *Composition options for tissue-engineered bone*. *Tissue Engineering* 8 (2002) 529-539) (S.P. Hoerstrup, L. Lu, M.J. Lysaght, A.G. Mikos, D. Rein, F.J. Schoen, J.S. Temenoff, J.K. Tessmar, J.P. Vacanti. *Tissue engineering*. In: B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons, editors. *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine 2nd edition*. Elsevier Academic Press, San Diego, California; 2004. p. 709) (M. N. Rahaman, J. J. Mao. 35 *Stem cell-based composite tissue constructs for regenerative medicine*. *Biotechnology and Bioengineering*, 91 (2005) 261-284).

Como se ha mencionado anteriormente, las células pueden provenir de cualquier animal, incluyendo al ser humano. La obtención de células autólogas mediante biopsia o aspiración de médula ósea y su reimplantación en el propio 40 paciente facilita que éstas sean aceptadas inmunológicamente. Hasta ahora la práctica clínica de ingeniería de cartílago se ha venido realizando con cultivos de condrocitos (células de cartílago maduras y diferenciadas) no seleccionadas. Sin embargo las investigaciones más recientes están considerando los beneficios de la utilización de poblaciones de condrocitos específicas obtenidas mediante separación de las diferentes zonas del cartílago después de la explantación (S. D. Waldman, M. D. Grynpas, R. M. Pilliar, R. A. Kandel. *The use of specific chondrocyte populations to modulate 45 the properties of tissue-engineered cartilage*. *J. Orthop. Res.* 21(1) (2003) 132-138) (G. P. Dowthwaite, J.C. Bishop, S. N. Redman, I. M. Khan, P. Rooney, D. J. R. Evans, L. Haughton, Z. Bayram, S. Boyer, B. Thomson, M. S. Wolfe and Charles W. Archer. *The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population*. *Journal of Cell Science* 117 (6) (2004) 889-897) (S.N. Redman, S.F. Oldfield, C.W. Archer. *Current strategies for articular cartilage repair*. *European Cells and Materials* 9 (2005) 23-32). Por otra parte, se han establecido cultivos de células osteogénicas a partir de 50 hueso trabecular, de la médula ósea y del periostio. Así se ha investigado la capacidad para la diferenciación osteogénica y utilización en la reparación de defectos óseos críticos en conejo de células de periostio cultivadas en fibras de ácido poli-glicólico-láctico (PLGA) (A. Redlich, C. Perka, O. Schultz, R. Spitzer, T. Háupl, G.-R. Burmester, M. Sittinger. *Bone engineering on the basis of periosteal cells cultured in polymer fleeces*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 10 (1999) 767-772). El primer implante sintético comercializado de tejido óseo (BioSeed B; Biotissue Technologies, Freiburg, Germany) se ha obtenido a partir de células autólogas de periostio y se encuentra disponible desde 55 2003 (D. W. Hutmacher, M. Sittinger. *Periosteal cells in bone tissue engineering*. *Tissue Engineering* 9 Suppl. 1 (2003) S45-64). Estos implantes están realizados sembrando células de periostio crecidas *in vitro*, sobre diferentes biomateriales y por razones que se desconocen (tipo y número de células, variedad del soporte, etc.) este procedimiento no ha progresado en la fase clínica. Tanto la disponibilidad como la capacidad proliferativa de condrocitos y osteocitos 60 autólogos, puede ser insuficiente ya que después de la biopsia o tras la disociación del tejido, sólo un número reducido de células están disponibles y por lo tanto su expansión se encuentra bastante reducida, con un número limitado de células para su siembra en el biomaterial. Aparte de esto, en ciertos procesos (por ejemplo osteoporosis) o en el caso de pacientes de edad avanzada la disponibilidad de células autólogas está muy limitada y en muchos casos no es posible disponer de ellas. Una alternativa, es la utilización de células madre, por su gran capacidad de proliferación y sus 65 posibilidades de diferenciación para regeneración de diversos tipos de tejidos. Hoy sabemos que durante el desarrollo embrionario, células de origen mesodérmico que dan lugar a los distintos tejidos mesenquimáticos (hueso, cartílago, músculo, tendones y ligamentos, tejido adiposo y otros conectivos, estroma medular), quedan indiferenciadas durante el periodo postnatal. A dichas células se les conoce como células madre mesenquimáticas (MSC, *mesenchymal stem*

cells). Se cree que estas células pueden encontrarse como pobladoras habituales de diferentes tejidos los lugares más frecuentes citados en la bibliografía, a la vez que los más accesibles son los tejidos mesenquimáticos, el periorbitario, la grasa y la médula ósea (S.P. Bruder, A.A. Kurth, M. Shea, WC Hayes, N. Jaiswal, S. Kadiyala. Bone regeneration by implantation of purified, culture expanded human mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 16 (1998) 155-162).
 5 Las células madre con origen en la médula ósea tienen capacidad para auto-renovarse *in vitro* durante varias generaciones, manteniendo su capacidad multipotencial. Las MSCs son capaces de diferenciarse dando lugar a células de los distintos fenotipos osteoblastos, condrocitos, adipocitos, miocitos y tenocitos (J.J. Minguez, A. Erices, P. Conget. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.* 226(6) (2001) 507-520) (M.V. Risbud, M. Sittiger. Tissue TRENDS in Biotechnology 20(8) (2002) 351-356). Su engineering: advances in *in vitro* cartilage generation. diferenciación a los 10 distintos linajes celulares se puede controlar mediante manipulaciones relativamente simples en las condiciones de cultivo y administrando suplementos bioquímicos (A.I. Caplan. The mesengenic process. *Clinics in Plastic Surgery* 21 (1994) 429-435). Estas propiedades convierten a las células madre de médula ósea en excelentes candidatas para su utilización en la reparación de grandes defectos óseos. Su utilización se ha llevado a cabo en modelos animales previa implantación en un biomaterial (H. Ohgushi, V. M. Goldberg, A. I. Caplan. Heterotopic osteogenesis in porous 15 ceramics induced by marrow cells. *Journal of Orthopaedic Research* 7 (1989) 568-578) y también como tratamientos experimentales en niños con osteogénesis imperfecta (E. M. Horwitz, D. J. Prockop, L. A. Fitzpatrick, W. W. K. Koo, P. L. Gordon, M. Neel, M. Sussman, P. Orchard, J. C. Marx, R. E. Pyeritz, M. K. Brenner. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Medicine* 5 (1999) 309-313) (S.L. Gerson. Mesenchymal stem cells: No longer second class marrow citizens. *Nature Medicine* 20 20 5(3) (1999) 362-364).

Las células responden al medio ambiente extracelular detectando señales químicas o estímulos físicos que desencadenan la apropiada respuesta de las mismas mediante la activación de los distintos mecanismos moleculares y biológicos que conducen a la división, la migración, la diferenciación y la apoptosis. La mayor parte de la información que sobre señales moleculares se utiliza hoy en ingeniería tisular procede de estudios realizados con poblaciones aisladas en cultivos sobre los que se han aplicado distintos factores solubles. Se trata de los denominados factores de crecimiento (GF, *growth factors*), moléculas polipeptídicas que producen las células y cuya misión general es transmitir señales entre unas células y otras para modular su actividad (J. Becerra, J.A. Andrade, J.A. Santamaría, M. Cifuentes, E. Guerado. Regeneración ósea, terapia celular e ingeniería tisular. *Med Clin* 116 (2001) 23-34). El mecanismo por el cual pueden introducirse en el nuevo tejido con ciertas garantías es su incorporación en los biomateriales que sirven de soporte (R. Langer. New methods of drug delivery. *Science* 249 (1990) 1527-1533). Otros mecanismos que se están ensayando son la introducción de células capaces de separar el factor de crecimiento deseado o la inducción de su producción a través de terapia génica (S. Rafi, D. Lyden. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat. Med.* 9 (2003) 702-712). Entre los factores más utilizados 30 en ingeniería esquelética se encuentran las proteínas morfogénicas de hueso (BMP, *bone morphogenetic proteins*) y los TGF- β (*transforming growth factors*) que han mostrado potencial osteoinductor en varios modelos animales (D. A. Oakes, J. R. Lieberman. Osteoinductive Applications of Regional Gene Therapy. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 379S (2000) 5101-S112).

40 Los materiales utilizados para construir los materiales soporte, denominados biomateriales, matrices, armazones, andamiajes tisulares o *scaffold* en ingeniería tisular son de dos tipos: naturales y sintéticos. Los principales materiales de origen natural son compuestos que proceden fundamentalmente de matrices extracelulares naturales. Destacan entre ellos el colágeno, los glicosaminoglicanos, los alginatos, el quitosán o polipéptidos de distinta naturaleza (H. P. Wiesmann, N. Nazer, C. Klatt, T. Szwart, U. Meyer. Bone tissue engineering by primary osteoblast-like cells in a monolayer system and 3-dimensional collagen gel. *J Oral Maxillofac Surg* 61 (2003) 1455-1462) (L. A. Solchaga, E. Tognana, K. Penick, H. Baskaran, V.M. Goldberg, A. I. Caplan, J. F. Welter. A rapid seeding technique for the assembly of large cell/scaffold composite constructs. *Tissue Engineering* 12(7) (2006) 1851-1863) (F. Couet, N. Rajan, D. Mantovani. Macromolecular biomaterials for scaffold-based vascular tissue engineering. *Macromol. Biosci.* 7 (2007) 701-718). La versatilidad y biocompatibilidad del colágeno para usos médicos está ampliamente reconocida (F. DeLustro, J. Dasch, J. Keefe, L. Ellingsworth. Immune responses to allogeneic and xenogeneic implants of collagen and collagen derivatives. *Clinical Orthopaedics and Ralated Research* 260 (1990) 263-279). El quitosán es estructuralmente similar a los glucosaminoglicanos, tiene propiedades bactericidas y además lo degradan enzimas del cuerpo humano (A. Di Martino, M. Sittiger, M. V. Risbud. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* 26 (2005) 5983-5990). Actualmente se investiga la utilización de nuevas estructuras tridimensionales formadas a partir de proteínas de seda (Y. Wang, U-J. Kim, D.J. Blasioli, H-J. Kim, D.L. Kaplan. *In vitro* cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 26 (2005) 7082-7094). PuraMatrix™ (BD Biosciences, USA), es un nuevo producto hidrogel producido mediante autoensamblado de péptidos, y que ha dado buenos resultados en combinación con distintos medios de cultivo y biomoléculas (M. A. Bokhari, G. Akay, S. G. Zhang, M. A. Birch. Enhancement of osteoblast growth and differentiation 50 *in vitro* on a peptide hydrogel-polyHIPE polymer hybrid material. *Biomaterials* 26 (2005) 5198-5208). La principal ventaja en la utilización de los materiales de origen natural es que permiten una inmovilización homogénea de las células y biomoléculas. Aunque su principal inconveniente es que tienen una resistencia mecánica muy baja para su uso en la reparación de algunos tejidos, como por ejemplo el tejido esquelético (U. Meyer, H. P. Wiesmann. Bone and cartilage engineering. Springer-Verlag Berlin; 2006 p. 127). Una posible estrategia para mejorar su estabilidad biomecánica es utilizarlos en combinación con otros materiales poliméricos o cerámicos que les confieran una mayor rigidez 55 (M. Sittiger, J. Bujia, W.W. Minuth, C. Hammer, G.R. Burmester. Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture *Biomaterials* 15(6) (1994) 451-456).

Por otra parte se encuentran los materiales sintéticos utilizados. Entre otros destacan fundamentalmente los polímeros y las cerámicas bioactivas. Entre los polímeros sintéticos más utilizados están los poliésteres biodegradables, el ácido poliglicólico (PGA), el ácido poliláctico (PLA) y el co-polímero ácido-poli-co-glicólico-láctico (PLGA) (L. E. Freed, J. C. Marquis, A. Nohria, J. Emmanuel, A. G. Mikos, R. Langer. *Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers.* Journal of Biomedical Materials Research 27 (1993) 11-23) (M. Sittinger, D. Reitzel, M. Dauner, H. Hierlemann, C. Hammer, E. Kastenbauer, H. Planck, G. R. Burmester, J. Bujia. *Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes.* Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials) 33 (1996) 57-63) (D. A. Grande, C. Halberstadt, G. Naughton, R. Schwartz, and R. Manji. *Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts* Journal of Biomedical Materials Research 34 (1997) 211-220) (S.L. Ishaug-Riley, G.M. Crane, A. Gurlek, M.J. Miller, A.W. Yasko, M.J. Yaszemski, A.G. Mikos. *Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly (DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery.* J Biomed Mater Res 36 (1997) 1-8) (W. L. Murphy, D. H. Kohn, David J. Mooney *Growth of continuous bonelike mineral within porous poly (lactide-co-glycolide) scaffolds in vitro* J Biomed Mater Res 50 (2000) 50-58). Estos polímeros (poliésteres) presentan buenas propiedades para la adhesión y proliferación celular, sin embargo tienen una resistencia mecánica muy limitada que resulta insuficiente para su empleo como implantes en la reparación del sistema esquelético (S. Grad, L. Kupcsik, K. Gorna, S. Gogolewski, M. Alini. *The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations.* Biomaterials 24 (2003) 5163-5171) (S. Grad, L. Zhou, S. Gogolewski, M. Alini. *Chondrocytes seeded onto poly (L/DL-lactide) 80%/20% porous scaffolds: a biochemical evaluation.* J. Biomed. Mater. Res. 66A (2003) 571-579) (K. Gorna, S. Gogolewski. *Biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue repair and regeneration* J Biomed Mater Res 79A (2006) 128-138). Otra desventaja de estos materiales poliméricos es que se produce una elevación del pH local como resultado de su degradación que da lugar a un aumento de la cinética de degradación pudiendo resultar en una reacción inflamatoria (M. Vert, J. Mauduit, S. M. Li *Biodegradation of PLA/GA polymers:increasing complexity* Biomaterials 15 (1994) 1209-1213). Los soportes de poliuretano son una alternativa a los poliésteres para la aplicación *in vivo* ya que presentan una mayor estabilidad mecánica (S. Grad, L. Kupcsik, K. Gorna, S. Gogolewski, M. Alini. *The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations.* Biomaterials 24 (2003) 5163-5171) (K. Gorna, S. Gogolewski. *Biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue repair and regeneration.* J Biomed Mater Res 79A (2006) 128-138). Así por ejemplo, se han utilizado poliuretanos biodegradables (no-tóxicos) con buenos resultados como injertos sustitutivos de hueso trabecular en modelos animales (S. Gogolewski, K. Gorna. *Biodegradable polyurethane cancellous bone graft substitutes in the treatment of iliac crest defects.* J. Biomed. Mater. Res. 80A (2007) 94-101). El mayor problema que presentan tanto los poliésteres como los poliuretanos es que no retienen bien las proteínas y los demás productos de síntesis de la matriz extracelular producidos por las células. Se ha observado que en cultivos prolongados en el tiempo se produce una desdiferenciación de los condrocitos (S. Grad, L. Kupcsik, K. Gorna, S. Gogolewski, M. Alini. *The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations.* Biomaterials 24 (2003) 5163-5171) (S. Grad, L. Zhou, S. Gogolewski, M. Alini. *Chondrocytes seeded onto poly (L/DL-lactide) 80%/20% porous scaffolds: a biochemical evaluation.* J. Biomed. Mater. Res. 66A (2003) 571-579). Además estos polímeros sintéticos no son bioactivos de forma que no se enlanzan al hueso (O. Tsingkou, L.L. Hench, A.R. Boccaccini, J.M. Polak, M.M. Stevens. *Enhanced differentiation and mineralization of human fetal osteoblasts on PDLLA containing Bioglass® composite films in the absence of osteogenic supplements* J Biomed Mater Res 80A (2007) 837-851). Para mejorar su respuesta bioactiva se han desarrollado materiales biodegradables compuestos de polímero y de materiales cerámicos como hidroxiapatito, fosfato tricálcico o biovidrio (R.Y. Zhang, P.X. Ma *Porous poly (L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process* J. Biomed. Mater. Res. 45 (1999) 285-293) (K. Zhang, Y. Ma, L. F. Francis. *Porous polymer/bioactive glass composites for soft-to-hard tissue interfaces.* J Biomed Mater Res 61 (2002) 551-563) (K. Rezwan, Q.Z. Chen, J.J. Blaker, A. R. Boccaccini. *Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering.* Biomaterials 27 (2006) 3413-3431) (O. Tsingkou, L.L. Hench, A.R. Boccaccini, J.M. Polak, M.M. Stevens. *Enhanced differentiation and mineralization of human fetal osteoblasts on PDLLA containing Bioglass® composite films in the absence of osteogenic supplements* J Biomed Mater Res 80A (2007) 837-851).

Las cerámicas bioactivas basadas en fosfatos de calcio entre las que destacan el hidroxiapatito (HA) ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), el fosfato tricálcico (β -TCP) ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) y los vidrios bioactivos poseen una buena biocompatibilidad y osteointegración y a su vez son los materiales más parecidos al componente mineral del hueso. Existen en el mercado un gran número de productos que se emplean para la reconstrucción ósea en la práctica clínica: α -BSM/Biobon® (ETEXCorporation, Cambridge, MA), ActiFuset/Pore-Si® (ApaTech, Ltd., London, U.K), ApaPore® (ApaTech, Ltd), Bonesave™ (Stryker Orthobiologics, Montreux, Switzerland), ChronOs® (Synthes, West Chester, PA), Collagraft® (NeuColl, Campbell, CA), Conduiut™ TCP (Depuy Orthopaedics, Warsaw, IN), Endobon® (Biomet Merck, Darmstadt, Germany), Norian SRS® (Synthes), OsSatura™ (BCP, (Isotis OrthoBiologics, Irvine, CA), Osteoset® (Wright Medical, Arlington, TN), OsteoStim® (EBI Medical, Parsippany, NJ), Pro Osteon™ (Interpore Cross International, Irvine, CA), 45S5 Bioglas® y Novabone® (US Biomaterials, Alachua, FL) (L.L. Hench. *Bioceramics: from concept to clinic.* J. Am. Ceram. Soc. 74[7] (1991) 1487-1510) (L.L. Hench, J.M. Polak. *Third-generation biomedical materials.* Science 295 (2002) 1014-1017) (K. A. Hing. *Bioceramics bone graft substitutes: influence of porosity and chemistry.* Int. J. Appl. Ceram. Technol. 2(3) (2005) 184-199). Los vidrios bioactivos (L.L. Hench. *Bioceramics: from concept to clinic.* J. Am. Ceram. Soc. 74[7] (1991) 1487-1510) están basados en una estructura reticular de sílice con iones como el calcio, sodio y fósforo y se han aplicado en ingeniería tisular ósea y por estimular la actividad de algunos genes de los osteoblastos (L.L. Hench, J.M. Polak, I.D. Xynos, L.D.K. Buttery. *Bioactive materials to control cela cycle.* Mat. Res. Innovat. 3 (2000) 313-323) (I.D. Xynos, M.V.J. Hukkanen, J.J. Batten, L.D. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak. *Bioglass ®45S5*

stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation *in vitro*: implications and applications for bone tissue engineering. *Calcif. Tissue Int.* 67 (2000) 321-329) (I. Christodoulou, L.D.K. Butterly, P. Saravanapavan, G. Tai, L.L. Hench, J.M. Polak. Dose- and time-dependent effect of bioactive gel-glass ionic-dissolution products on human fetal osteoblast-specific gene expression. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 74B (2005) 529-537). El inconveniente de estos materiales cerámicos bioactivos es que son muy frágiles y carecen de la integridad estructural necesaria para aplicaciones que necesiten soportar una carga mecánica importante. Otro gran inconveniente es la escasa capacidad para reabsorberse con el paso del tiempo. Ya que al ser el hueso un tejido muy dinámico, cuya biología depende de su continua deposición y reabsorción equilibrada, el introducir materiales estáticos, no reabsorbibles, en su estructura dificulta su homeostasis.

De forma general, independientemente del origen natural o sintético de los biomateriales, se requiere que éstos posean cualidades similares a aquéllas del tejido que deben reparar y/o sustituir. Por ejemplo, en el caso de ingeniería tisular esquelética, el biomaterial debe poseer una elevada porosidad, una amplia superficie, y una morfología tridimensional específica que facilite la neoformación de tejido, incluida su vascularización. Además debe poseer resistencia estructural y ser biodegradable (M. Sittinger, D.W. Hutmacher, M. V. Risbud. *Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration. Current Opinion in Biotechnology* 15 (2004) 411-418).

No debemos olvidar que los biomateriales tienen como función servir de soporte a las células. Estas se adhieren a los componentes del biomaterial con los que tengan afinidad, a través de receptores transmembranales que, una vez activados, se asocian al citoesqueleto intracelular de actina (el “esqueleto” interno de la célula) y a otras moléculas estructurales, formando las denominadas adhesiones focales. Éstas no funcionan sólo como puntos de anclaje entre la célula y el biomaterial, sino también como centros de comunicación entre la célula y el medio que la rodea, pudiendo activar moléculas de señalización intracelular que activarán o reprimirán la expresión de genes, modulando con ello el comportamiento celular. De esta forma, puede decirse que procesos celulares como supervivencia, proliferación o diferenciación dependen en gran medida del medio donde se encuentran. Los biomateriales a emplear en ingeniería tisular deben imitar, en la medida de lo posible, las cualidades de la matriz extracelular por lo que no es posible utilizar cualquier material. Para empezar deben favorecer la adhesión celular, para lo cual deben ser capaces de interactuar con los receptores transmembranales que median la adhesión. Puesto que no todos los materiales biocompatibles (es decir, no nocivos para el organismo vivo) poseen esta cualidad, se han desarrollado numerosas estrategias para modificar la superficie de los mismos. Entre éstas se encuentran la modificación de parámetros físico- químicos (microrrugosidad, carga...), o el recubrimiento de la superficie con proteínas o péptidos propios de las moléculas que constituyen la matriz extracelular (normalmente colágeno, fibronectina, o péptidos correspondientes a dominios activos de estas moléculas). Además de favorecer la adhesión, los biomateriales deben favorecer las funciones celulares que permitirán reparar el tejido dañado: migración, proliferación, diferenciación. Junto a la capacidad para interaccionar con los mencionados receptores transmembranales de adhesión celular, en los últimos tiempos se ha comprobado la importancia de la tridimensionalidad en todas estas funciones.

El asentamiento de las células sobre el biomaterial seleccionado puede llevarse a cabo de un modo estático, por aplicación directa de la suspensión celular o soporte, o de una forma dinámica, por aplicación de la suspensión celular a un soporte en agitación, aplicando vacío, etc., con o sin intermediación de moléculas que favorezcan la adhesión. El biomaterial que se emplee, además de permitir la adhesión de las células, debe facilitar el desarrollo de un ambiente en el que las células puedan mantener su fenotipo y mantener la actividad sintética de las distintas proteínas y moléculas propias del estado diferenciado del tejido de que se trate. Esto es posible sólo si el material posee características físico-químicas y estructurales (o espaciales) que permitan, o incluso estimulen, en las células cultivadas en ellos, la activación de los adecuados procesos de señalización intracelular y comunicación intercelular, que conducirán a una respuesta diferenciadora y a la formación del nuevo tejido. En este sentido, cabe destacar que la ingeniería tisular tiende a la especificidad.

Un camino alternativo a los métodos de asentamiento de las células sobre un soporte sería aprovechar la capacidad natural de las células en cultivo para auto-ensamblarse a través de la matriz extracelular que ellas mismas producen al diferenciarse *in vitro* (W. Wu, F. Chen, X. Feng, Y. Liu, T. Mao. Engineering cartilage tissues with the shape of human nasal alar by using chondrocyte macroaggregate-Experiment study in rabbit model. *Journal of Biotechnology* 130 (2007) 75-84). Así ya se ha conseguido la elaboración de implantes de láminas de condrocitos completamente libres de biomaterial de soporte (K. Park, J. Huang, F. Azar, R. L. Jin, B.-H. Min, D.K. Han, K. Hasty. Scaffold-Free, Engineered Porcine Cartilage Construct for Cartilage Defect Repair—*In Vitro* and *In Vivo* Study. *Artificial Organs* 30(8) (2006) 586-596). Sin embargo, se ha observado que en este tipo de cultivos en monocapa, los condrocitos experimentan un proceso de desdiferenciación que da lugar a su transformación a fibroblastos (J. C. Hu, K. A. Athanasiou. A self-assembling process in articular cartilage tissue engineering. *Tissue engineering* 12(4) (2006) 969-979) (K.R. Brodkin, A.J. García, M.E. Levenston. Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials* 25 (2004) 5929-5938).

Toda una década de intensa investigación ha proporcionado resultados que avalan la eficacia de estos implantes celulares, refiriéndonos a cualquier terapia de ingeniería de tejidos que implique el uso de células para la regeneración de tejidos en sentido amplio lo que incluye por supuesto a los que se llevan a cabo mediante la elaboración de constructos, en la regeneración de tejidos como el epitelial, el óseo o el cartilaginoso entre otros (U. A. Stock and J. P. Vacanti. *Tissue engineering: current state and prospects. Annu. Rev. Med.* 52 (2001) 443-51) (A.H. Reddi. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue engineering* 6 (2000) 351-359).

ES 2 334 298 B1

- Aunque la investigación en la ingeniería de tejidos se nutre de los avances conseguidos en las áreas de biología, biotecnología, farmacología, medicina, ingeniería, nanotecnología y ciencia de materiales entre otras, su implementación en la práctica clínica está todavía en una fase muy inicial (E. Lavik, R. Langer. *Tissue engineering: current state and perspectives*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 65 (2004) 1-8) (U. Meyer, H. P. Wiesmann. *Bone and cartilage engineering*. Springer-Verlag Berlin; 2006 p. 127). Pocos productos han llegado hasta la fase de ensayos clínicos (fundamentalmente de tejidos de piel y cartílago) (U. A. Stock and J. P. Vacanti. *Tissue engineering: current state and prospects* Annu. Rev. Med. 52 (2001) 443-51) y son muy pocos los productos cuya comercialización ha sido aprobada (A.K. Bock, D. Ibarreta, E. Rodriguez-Cerezo. *Human tissue-engineered products -Today's markets and future prospects*. Synthesis Report. Report EUR 21000 EN. Seville: Institute for Prospective Technological Studies, 2003).
- Based on studies conducted by B. Hüsing, B. Bührlen, S. Gaisser, J. Senker, S. Mandi, C.J. Kirkpatrick) (A.K. Bock, E. Rodriguez-Cerezo, B. Hüsing, B. Bührlen, M. Nusser. *Human tissue-engineered products: potential socio-economic impacts of a new european regulatory framework for authorisation, supervision and vigilance*. Synthesis Report. Report EUR 21838 EN. Seville: Institute for Prospective Technological Studies, 2005).
- El transplante de condrocitos autólogos (ACT) y sus modificaciones para uso terapéutico son la aplicación más extendida en ingeniería tisular en los tejidos esqueléticos (conectivo, cartilaginoso y óseo) (P. Jobanputra, D. Parry, A. Fry-Smith, A. Burls. *Effectiveness of autologous chondrocyte transplantation for hyaline cartilage defects in knees: a rapid and systematic review*. Health Technol Assess 5 (11) (2001). Health and Technology Assessment (HTA) Programme Reports available at <http://www.ncchta.org/>) (S.W. O'Driscoll. *Precclinical cartilage repair: current status and future perspectives*. Clin. Orthop. Relat. Res. (391 Suppl) (2001) 5397-S401) (G. M. Hoben, K. A. Athanasiou. *Menniscal repair with fibrocartilage engineering*. Sports Med Arthrosc Rev 14 (2006) 129-137). El uso de condrocitos autólogos tuvo su origen en aplicaciones para lesiones de articulación de rodilla (A.K. Bock, D. Ibarreta, E.B. Rodriguez-Cerezo. *Human tissue - engineered products -Today's markets and future prospects*. Synthesis Report. Report EUR 21000 EN. Seville: Institute for Prospective Technological Studies, 2003. Based on studies conducted by B. Hüsing, B. Bührlen, S. Gaisser, J. Senker, S. Mandi, C.J. Kirkpatrick). Aunque actualmente existe una intensa investigación para extender su aplicación al resto de las articulaciones, lesiones intervertebrales y defectos del tejido cartilaginoso, en general. Inicialmente, y tras su expansión *in vitro* las células autólogas se trasfieren de nuevo al paciente. Las células se inyectan en la lesión del cartílago y se cubren, bien con una lámina de periostio que se sutura, bien poniendo las células inmersas en colágeno o ácido hialurónico, que por su naturaleza quedan adheridos al tejido o bien se ayuda la adhesión con pegamentos biocompatibles. Los nuevos avances en biomateriales han permitido el desarrollo de una nueva generación de productos en que los condrocitos pueden transferirse al lugar de la lesión estabilizados en una matriz tridimensional. Por ejemplo, el producto BioSeed®-C (*Biotissue Technologies, Freiburg, Germany*) constituye un injerto de cartílago sintético de segunda generación, que se basa en condrocitos autólogos embebidos un soporte tridimensional bioabsorbible (la bioabsorción es el proceso mediante el cual los materiales se degradan en el medio fisiológico y los productos de degradación eliminados o completamente metabolizados) (R. Sastre, S. De Aza, J. San Román Editores. *Biomateriales. CYTED Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo*. Litográfica Faenza, 2004) formado por dos componentes, gel y polímero (C. Ossendorf, C. Kaps, P. C Kreuz, G. R Burmester, M. Sittinger, C. Erggelet. *Treatment of posttraumatic and focal osteoarthritic cartilage defects of the knee with autologous polymer-based three-dimensional chondrocyte grafts: 2-year clinical results*. Arthritis Research & Therapy 9 (2007), :R41 (doi:10.1186/ar2180) Available online <http://arthritis-research.com/content/9/2/R41>). A pesar de estos avances la experiencia acumulada demuestra que el nuevo cartílago formado a partir del implante de condrocitos se integra defectuosamente en el tejido circundante, desprendiéndose con el paso del tiempo. La reparación/regeneración satisfactoria del cartílago es pues un asunto pendiente.
- La comercialización de implantes tisulares de hueso se encuentra en un estadio más preliminar. Así, la mayoría de los productos que existen en el mercado son combinaciones de biomateriales y factores de crecimiento (GF, *growth factors*) (S.N. Parikh. *Bone graft substitutes: past, present, future*. Journal of Postgraduate Medicine 48(2) (2002) 142-148) (M. Sittinger, D.W. Hutmacher, M. V. Risbud. *Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration*. Current Opinion in Biotechnology 15 (2004) 411-418) (A.J. Salgado, O.P. Countinho, R.L. Reis. *Bone tissue engineering: state of the art and future trends*. Macromol. Biosci. 4 (2004) 743-765). El producto OP-1® (*Stryker Biotech. MA, USA*) es un ejemplo que consiste en proteína morfogenética de hueso (BMP) humano recombinante (rhBMP-7) formulada en una matriz o soporte de colágeno tipo I purificada. Este material es de los productos comerciales más avanzados que hay para (para hueso se ha ido mas despacio en el desarrollo de productos que contengan células).
- Otro ejemplo es el desarrollado por BioTissueTechnologies (*Germany*), que fabrica el producto BioSeed®-Oral Bone para aplicaciones en cirugía de mandíbula. Osiris Therapeutics (*USA*) ha desarrollado Osteocel®, producto derivado de células mesequimales humanas (MSCs) de médula ósea.
- Por otro lado, la mayoría de los materiales empleados actualmente en cirugía ortopédica y, en general, en cirugía reconstructiva, no resultan adecuados para elaborar constructos ya que no permiten la adhesión o no favorecen la diferenciación celular. Tal es el caso, por ejemplo, de las prótesis de titanio o de las placas de fijación esquelética, ya sean metálicas o de polímeros bioabsorbibles. Los metales requieren de modificaciones importantes en su superficie para permitir tan sólo la adhesión celular, y los polímeros bioabsorbibles como por ejemplo PLGA, empleado en las placas de fijación BioSorbPDX™, permiten la adhesión y proliferación pero no favorecen la diferenciación celular ni el crecimiento en tres dimensiones (3D), fundamental para la formación de los tejidos (A. Bagno, C. Di Bello. *Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials*. J Mater Sci Mater Med. 15 (2004) 935-949) (L. Santos-Ruiz, D. J. Mowatt, A. Marguerie, D. Tukiainen, M. Kellomäki, P. Törmälä, E. Suokas, H. Arstila, N. Ashammakhi,

and P. Ferretti. Potential use of craniosynostotic osteoprogenitors and bioactive scaffolds for bone engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 1 (2007) 199-210).

Tal y como se ha descrito anteriormente, para obtener un constructo se necesita un biomaterial y células que
 5 se asienten sobre éste. Los biomateriales empleados deben tener como función primaria la viabilidad del tejido y deben por tanto por un lado hacer de soporte y guía para la adhesión, la proliferación y la diferenciación celular y por otro permitir y facilitar la migración de las células sobre o en el interior de su arquitectura tridimensional. A semejanza de la matriz extracelular de los tejidos naturales, que es el medio en que se encuentran las células, producido y controlado por ellas mismas, el biomaterial debe facilitar el desarrollo de un ambiente en el que las
 10 células puedan mantener su fenotipo si se trata de células ya maduras o promover (instruir) su diferenciación apropiada si son células madre o progenitoras. (Las células madre pueden diferenciarse en múltiples linajes y autorenovarse casi eternamente. Las células progenitoras sin embargo, conservan capacidad de replicación (menos que la madre) pero están ya comprometidas con un linaje concreto). Además el biomaterial debe mantener la actividad sintética de las células (L.G. Griffith, G. Naughton. *Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities*. Science 295
 15 (2002) 1009-1014) (L.L. Hench, J.M. Polak. *Third-generation biomedical materials*. Science 295 (2002) 1014-1017) (J.M. Polak, L.L. Hench, P. Kemp, editors. *Future strategies for tissue and organ replacement*. London: Imperial College Press, 2002). Para ello es necesario que el biomaterial sea no sólo biodegradable, sino también poroso, y que posea una amplia superficie, una morfología tridimensional específica según el tejido a construir y, si resulta necesario, resistencia estructural.

20 En este sentido, la sílice SBA-15, que pertenece al grupo de las cerámicas bioactivas, fue sintetizada inicialmente en la Universidad de California, Santa Barbara, por el grupo del Profesor Stucky (D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G.H. Fredrickson, B.F. Chmelka, G.D. Stucky. *Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores*. Science 279 (1998) 548-552). En el proceso de síntesis, oligómeros de sílicato presentes en
 25 disolución acuosa condensan entre sí alrededor de micelas de tensioactivo que actúan a modo de plantilla. La estructura mesoporosa final está constituida por sílice amorfa (SiO_2) ordenada según un empaquetamiento hexagonal de poros longitudinales que se identifica esencialmente por su patrón de difracción de rayos X característico.

Partiendo de este procedimiento y mediante la variación de este protocolo de síntesis (A. Díaz, T. López, J. Manjarrez, E. Basaldella, J.M. Matínez-Blanes, J.A. Odriozola. *Growth of hydroxyapatite in a biocompatible mesoporous silica*. *Acta Biomaterialia* 2 (2006) 173-179) se ha desarrollado un nuevo biomaterial en el que se ha conseguido que crezcan nanopartículas de hidroxiapatito de calcio en asociación con la matriz de sílice mesoestructurada.

La sílice mesoestructurada tipo SBA-15 pertenece a una familia de biomateriales sintéticos que poseen una distribución ordenada de poros, con un tamaño de poro muy homogéneo, cuyo valor promedio está comprendido en el rango 2-50 nm (D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G.H. Fredrickson, B.F. Chmelka, G.D. Stucky. *Triblock co-polymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores*. Science 279 (1998) 548-552). La sílice SBA-15 tiene una superficie específica muy elevada en el rango de los $600\text{-}1000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, valores muy superiores a los recogidos en la bibliografía para materiales como los vidrios bioactivos obtenidos mediante proceso sol-gel que
 35 presentan valores entorno a los $300 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ($58\text{S gel-glass} = 289 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ (J. Zong, D.C. Greenspan. *Processing and properties of sol-gel bioactive glasses*. *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)* 53 (2000) 694-701)). Estudios sobre la variación de superficie específica llevados a cabo con el producto NovaBone® (S. Katta. *Resorption of bioactive glasses*. Copyright NovaBone Products, LLC. (2007) <http://www.novabone.com/>) señalan valores en torno a los $125 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ después de su incubación en tapón TRIS durante 20 h). Hasta este momento estos biomateriales de sílice mesoestructurada se han utilizado fundamentalmente para su aplicación en procesos catalíticos y medioambientales. Sin embargo, son biomateriales muy prometedores para aplicaciones que requieran una alta superficie como la adsorción de moléculas y su impregnación con agentes terapéuticos, fármacos ó biomoléculas (factores de crecimiento antibióticos etc.) ya que permiten liberarlos de manera controlada y sostenida durante tiempos prolongados (H.P. Humphrey, P.A. Wright, N.P. Botting. *Enzyme immobilisation using SBA-15 mesoporous molecular sieves with functionalised surfaces*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 15 (2001) 81-92) (Y. Wang, F. Caruso. *Mesoporous silica spheres as supports for enzyme immobilization and encapsulation*. *Chem. Mater.* 17 (2005) 953-961) (P. Horcajada, A. Ramila, F. Gerard, M. Vallet-Regi. *Infuence of superficial organic modification of MCM-41 matrices on drug delivery rate*. *Solid State Sciences* 8(10) (2006) 1243-1249) aunque por el momento no se había demostrado su utilidad como soporte de células de mamífero y la elaboración de constructos.

55 Por todo ello, y a pesar de los avances conseguidos, existen todavía una serie de aspectos no resueltos y que resultan críticos para poder avanzar en las terapias regeneradoras mediante ingeniería de tejidos. En este sentido se necesitan constructos en los que se asegure una distribución de células homogénea y con una densidad celular elevada (L. A. Solchaga, E. Tognana, K. Penick, H. Baskaran, V. M. Goldberg, A. I. Caplan, J.F. Welter. *Rapid seeding technique for the assembly of large cell/scaffold composite constructs*. *Tissue Engineering* 12(7) (2006) 1851-1863), mejorar en las técnicas para conseguir un correcto asentamiento de las células sobre el material seleccionado, que se preserve el fenotipo celular, y que no se de lugar a la inhibición de la migración y de la comunicación celular (L. A. Solchaga, E. Tognana, K. Penick, H. Baskaran, V. M. Goldberg, A. I. Caplan, J.F. Welter. *Rapid Seeding Technique for the Assembly of Large Cell/Scaffold Composite Constructs*. *Tissue Engineering* 12(7) (2006) 1851-1863). (J. C. Hu, K. A. Athanasiou. *A Self-Assembling Process in Articular Cartilage Tissue Engineering*. *Tissue Engineering* 12(4) (2006) 969-979) (S. Shanbhag, S. Wang, N. A. Kotov. *Cell distribution profiles in three-dimensional scaffolds with inverted-colloidal-crystal geometry: modelling and experimental investigations*. *Small* 1(12) (2005) 1208-1214).

Breve descripción de la invención

La presente invención consiste en un constructo, formado por un biomaterial compatible biológicamente, que sirve de soporte sobre el que se cultivan uno o más tipos de células vivas, que pertenecen al siguiente grupo: osteoblastos, fibroblastos, condroblastos y células mesenquimales, de forma que se obtiene una estructura tridimensional.

El biomaterial soporte que se emplea para la elaboración del constructo de la invención, es del tipo sílice mesosetructurada (SBA-15) y/o bien se trata de un biomaterial compuesto formado por una matriz de sílice del tipo SBA-15 sobre el que se crecen nanopartículas de hidroxiapatito de calcio (HA). Estos biomateriales, pueden consolidarse en piezas con distintas características (molotitos con porosidad variable, estructuras celulares etc.) mediante técnicas de procesado. Las células, que se cultivan sobre estos soportes son células animales, incluyendo células humanas. Preferentemente estas células son células mesenquimales, incluyendo células diferenciadas, progenitores o células madre de origen tisular (del adulto), fetal o embrionarias que son capaces de proliferar y diferenciarse en linajes específicos, al ser tratadas con los factores y biomoléculas adecuadas. Estas células pueden provenir del propio paciente (antólogas) o de un donante (heterólogas) que puede ser de la misma especie (alógicas) o de otras especies (xenogénicas).

Este constructo puede doparse (modificarse) con biomoléculas y/o elementos químicos como el Mg, Mn, Zn o Sr entre otros, para mejorar sus propiedades biológicas, físicas, químicas, terapéuticas o de seguimiento radiológico. Puede funcionalizarse con variedad de moléculas orgánicas para modificar sus propiedades físicas, químicas y biológicas, preferentemente la capacidad de adsorción de dicho material. Pueden adsorberse en él moléculas con actividad biológica, naturales o sintéticas y/o agentes terapéuticos en la que al menos uno pertenece al grupo de los factores de crecimiento, factores de crecimiento angiogénicos, agentes antitrombogénicos, vasodilatadores agentes antimicrobianos, antibióticos, antimicóticos, antivirales, anticancerígenos, anti-inflamatorios, inmunosupresores, hormonas de crecimiento, hormonas, agentes radioterapéuticos, péptidos, proteínas, enzimas, componentes de la matriz extracelular naturales o sintéticos, agentes para terapia génica entre otros.

Este nuevo material, tienen muy diversas aplicaciones en el campo de la ingeniería de tejidos para regenerar, restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales, perdidas o deterioradas, de los propios tejidos orgánicos. Preferentemente puede colocarse y usarse interpuesto entre las prótesis artificiales y el tejido del huésped con objeto de contribuir eficazmente a la fijación biológica de dichas prótesis en animales, incluyendo al ser humano. Puede también emplearse en la reparación y regeneración de los tejidos musculoesqueléticos, por ejemplo, hueso y cartílago, incluidos los tejidos periodontales, en intervenciones y cirugías reparadoras, reconstructivas y regenerativas, cirugía ortopédica y traumatología, cirugía vertebral, cirugía oral y maxilofacial, cirugías correctoras, cirugía plástica y estética, en intervenciones para el tratamiento de artritis, osteoartritis, artritis reumatoidea, artrosis, osteoporosis, enfermedades raras (osteogénesis imperfecta, craneosintesis), pérdidas de hueso por fractura, pérdidas de tejido óseo u osteocartilaginoso por extirpación de tumores, en cirugías de mínima invasión como por ejemplo las técnicas de vertebroplastia y kyphoplastia que se utilizan en cirugía vertebral, cirugía para problemas de escoliosis, en la infiltración de hueso osteoporótico, en el tratamiento de anomalías periodontales y/o en tratamientos de terapia génica entre otras aplicaciones.

Otros usos de este constructo son: como vehículo para transportar, almacenar y liberar moléculas bioactivas y agente para la terapia génica *in situ* en tejidos animales, incluyendo los humanos, para reparar las lesiones tisulares, en animales incluyendo dentro de estos al ser humano, integrándose en el tejido receptor y adquiriendo la funcionalidad de éste, reparando y regenerando el tejido lesionado, en la elaboración de constructos tridimensionales de gran tamaño mediante la inducción de angiogénesis a través del co-cultivo con células endoteliales y/o terapia génica con factores de crecimiento angiogénicos, en la elaboración de constructos tridimensionales de gran tamaño mediante su implementación en bioreactores y/o dispositivos de cultivo celular, en la fabricación de cementos y material de relleno con componente celular, en la fabricación de implantes tisulares mediante técnicas de procesado como por ejemplo técnicas avanzadas de diseño y prototipado rápido, en la realización de estudios toxicológicos *in vitro* preferentemente en la industria farmacéutica, y/o en estudios de citotoxicidad de distintos agentes contaminantes ambientales y/o nanopartículas entre otros.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Micrografías FESEM del biomaterial SBA-15 esterilizado: partículas poliédricas, relativamente uniformes con dimensiones micrométricas de un tamaño aproximado de 1 micra de longitud y 0,5 micras de anchura (1b) que se disponen longitudinalmente en fibras a modo de eslabones en una cadena (1a); superficie de estas las partículas micrométricas donde se aprecian a modo de canales la disposición longitudinal de los mesoporos (1c).

Figura 2: Micrografías ópticas de campo claro de los cultivos con MC3T3-E1 (Figura 2a y 2b) junto con una imagen control correspondiente al biomaterial SBA-15 esterilizado sin células en la que se aprecian partículas sueltas y dispersas (Figura 2c). Las Figura 2a muestra una imagen en la que se observa una partícula de biomaterial SBA-15 elongada (parte central) completamente rodeada de células. En la parte derecha de la imagen y señalado con una flecha se aprecia la formación incipiente de un agregado (constructo) biomaterial + células.

Figura 3: Micrografías FESEM del biomaterial compuesto HA-SBA-15 esterilizado en autoclave (c y d) que se compara con el biomaterial sin esterilizar (a y b). Las Figuras 3a y 3c muestran las partículas de sílice micrométrica decoradas por cúmulos de nanopartículas de HA con cierta heterogeneidad de tamaño.

ES 2 334 298 B1

Figura 4: Micrografías ópticas correspondientes a cultivos de BM-MSC de 14 días utilizando el biomaterial HA-SBA-15 esterilizado con radiación UVA. La Figura 4a es una imagen de campo claro que muestra agregados globulares (3D) biomaterial-células (constructos) con tamaños por encima de 200 micras de diámetro. La Figura 4b es una imagen de epifluorescencia utilizando un marcador vital Cell Tacker Green que confirma la viabilidad de las células en los constructos. Finalmente en la Figura 4c se presenta la superposición de las Figuras 4a y 4b a modo de referencia para la localización de la señal fluorescente que confirma la presencia de células viables en los constructos.

Figura 5: Micrografías de epifluorescencia de un constructo elaborado con el biomaterial HA-SBA-15 esterilizado con etanol y células BM-MSC. La Figura 5a es una imagen de epifluorescencia utilizando el marcador vital que confirma la viabilidad de las células en el constructo. La Figura 5b muestra inmunorreactividad al anticuerpo B4-78, que reconoce específicamente la fosfatasa alcalina, confirmándose así el inicio de un proceso celular de diferenciación osteogénica iniciado en el centro del constructo, tal como confirma el hecho de que la inmunorreactividad sea mayor en la parte central del constructo. La zona positiva a la fosfatasa alcalina aparece delimitada con trazo discontinuo en la Figura 5c que presenta una superposición de las micrografías 5a y 5b.

15 Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención es un nuevo constructo constituido por células y biomateriales formando estructuras tridimensionales complejas y compatibles biológicamente con los tejidos animales incluyendo los humanos.

Este nuevo constructo, comprende un biomaterial capaz de albergar células animales, preferentemente son células mesenquimales incluyendo células diferenciadas, progenitores o células madre de origen tisular (del adulto), y células madre no humanas de origen fetal o embrionario.

La presente invención se basa en que se ha observado que este biomaterial de soporte permite, sorprendentemente, que las células dispuestas en un cultivo se adhieran a él, se mantengan viables durante largos períodos de tiempo y se diferencien en fenotipos celulares de interés, lográndose así la obtención de un constructo que puede ser objeto de implante para la reconstrucción de tejidos. La presencia y viabilidad de las células en los constructos se comprueba mediante observación en microscopio de campo claro y mediante marcaje con un colorante vital fluorescente y observación en microscopio con luz epifluorescente (ver Ejemplos). La aparición de una marca verde fluorescente confirma la presencia de células vivas, pues sólo éstas pueden incorporar y metabolizar el colorante para tornarlo fluorescente. Por último, se comprueba también el inicio de un proceso de diferenciación celular mediante la detección específica, por técnica inmunoquímica, de moléculas implicadas en dicho proceso.

En el constructo objeto de la invención, las células que preferentemente pertenecen al siguiente grupo: osteoblastos, fibroblastos, condroblastos y células mesenquimales, sembradas sobre los biomateriales son viables, ya que incorporan marcadores vitales, y capaces de proliferar y diferenciarse en linajes específicos en respuesta a los estímulos adecuados (factores de crecimiento, citoquinas, moléculas inductoras, etc). La diferenciación se manifiesta por su capacidad para sintetizar matriz extracelular y demás moléculas (intra- y extra-celulares) específicas del tejido a reparar. El hecho de que se den en los constructos todas estas actividades celulares indica la existencia de interacciones célula-material que no son posibles en cualquier tipo de material, aún cuando se trate de materiales biocompatibles.

Las cualidades de los constructos que acaban de describirse (formados mediante la combinación de las células y los biomateriales SBA-15 y el HA-SBA-15, ver Ejemplo 1 y 2, respectivamente) los hacen extraordinariamente interesantes y prometedores para aplicaciones como terapia celular o ingeniería tisular ya que sus propiedades permiten que puedan transferirse a lesiones tisulares con objeto de que se integren en el tejido receptor y adquieran la funcionalidad de éste, reparando y regenerando el tejido lesionado en animales incluyendo dentro de estos al ser humano o bien colocándose interpuestos entre las prótesis artificiales y el tejido del huésped con objeto de contribuir eficazmente a la fijación biológica de dichas prótesis.

La caracterización llevada a cabo en la presente invención del biomaterial utilizado en la fabricación del constructo de la invención permite afirmar que, en comparación con los materiales que se han empleado hasta el momento como soporte en ingeniería tisular, presenta unas propiedades superficiales muy interesantes ya que a su alta superficie se une su textura nanométrica lo que les convierte en candidatos idóneos para el desarrollo de constructos. La estructura nanométrica está constituida por la red de microporos (poros con dimensiones inferiores a los 2 nm) en la matriz de sílice, los canales de nanoporos (mesoporos con diámetros entre (10-13 nm) y las nanopartículas de HA para el biomaterial compuesto con dimensiones en torno a los 60 nm. Estas estructuras nanoporosas interconectadas se han establecido como un factor crítico que favorece las cinéticas de redisolución y de intercambio de iones en la interfase con el medio fisiológico, factor que se ha demostrado como fundamental para el proceso de integración tisular (oseointegración) (J.M. Polak, L.L. Hench, P. Kemp, editors. Future strategies for tissue and organ replacement. London: Imperial College Press, 2002). Además, la composición de estos biomateriales ya sea el biomaterial de sílice (SiO_2) o el biomaterial compuesto ($\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$) corresponden a formulaciones que se han establecido como altamente bioactivas (L.L. Hench, D.L. Wheeler, D.C. Greenspan. Molecular control of bioactivity in sol-gel glasses. J Sol-Gel Sci Technol 13 (1998) 245-250) (P. Saravanapavan, J.R. Jones, R.S. Pryce, L.L. Hench. Bioactivity of gel-glass powders in the CaO-SiO_2 system: a comparison with ternary ($\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$) and quaternary glasses ($\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Na}_2\text{O}$). J Biomed Mater Res 66A (2003) 110-119) solucionando muchos de los problemas que se presentan al utilizar otros biomateriales en la práctica clínica.

Además, gracias a todas las características descritas anteriormente, los biomateriales SBA-15 y HA-SBA-15 pueden interactuar con las células vivas a través de moléculas de adhesión, resultando en el “anclaje” de la célula al biomaterial. Además, las cualidades de tridimensionalidad, porosidad, etc, unidas a las características superficiales, crean un ambiente propicio a la migración (gracias a la cual las células colonizan el biomaterial), y a la diferenciación (gracias a la cual las células especifican su linaje, sintetizan matriz extracelular y se integran en el tejido circundante).

Para la elaboración de los constructos de la invención, los biomateriales que se emplean son sílice mesoestructurada (tipo SBA-15) y/o un biomaterial compuesto constituido por una matriz de sílice tipo SBA-15 sobre la que se crecen nanopartículas de hidroxiapatito de calcio (HA-SBA-15).

Por tanto, un aspecto de la presente invención lo constituye un constructo útil para terapia de regeneración tejido, en adelante constructo de la invención, que comprende uno o más tipos de células vivas cultivadas formando estructuras tridimensionales complejas en un biomaterial (soporte), del tipo sílice mesoestructurada (SBA-15).

Una realización particular lo constituye el constructo de la invención donde el biomaterial consiste en un biomaterial compuesto formado por una matriz de sílice del tipo SBA-15 sobre el que se crecen nanopartículas de hidroxiapatito de calcio (HA-SBA-15).

Otra realización particular lo constituye el constructo de la invención donde el biomaterial consiste en una mezcla de SBA-15 y HA-SBA-15.

Otra realización particular lo constituye el constructo de la invención donde los biomateriales empleados pueden consolidarse en piezas con distintas características (molotitos con porosidad variable, estructuras celulares etc.) mediante técnicas de procesado.

Además el esqueleto inorgánico formado por la sílice de estos biomateriales dispone de grupos silanoles (A. Díaz, T. López, J. Manjarrez, E. Basaldella, J.M. Matínez-Blanes, J.A. Odriozola. Growth of hydroxyapatite in a biocompatible mesoporous silica. Acta Biomaterialia 2 (2006) 173-179) que se pueden funcionalizar con variedad de moléculas orgánicas para modificar sus propiedades físicas, químicas y biológicas como por ejemplo la adsorción que combinada con la bioactividad favorece la proliferación y diferenciación celular.

Otra realización particular lo constituye el constructo de la invención donde el biomaterial soporte está dopado (modificado) con biomoléculas y/o elementos químicos (Mg, Mn, Zn o Sr entre otros) para mejorar sus propiedades biológicas, físicas, químicas, terapéuticas o de seguimiento radiológico.

Otra realización particular lo constituye el constructo de la invención donde el biomaterial soporte está funcionalizado con moléculas orgánicas para modificar sus propiedades físicas, químicas y biológicas, preferentemente la capacidad de adsorción de dicho material.

Otra realización particular lo constituye el constructo de la invención donde el biomaterial soporte presenta la adsorción de moléculas con actividad biológica, naturales o sintéticas y/o agentes terapéuticos en el que al menos uno pertenece al grupo de los factores de crecimiento, factores de crecimiento angiogénicos, agentes antitrombogénicos, vasodilatadores agentes antimicrobianos, antibióticos, antimicóticos, antivirales, anticancerígenos, anti-inflamatorios, inmunosupresores, hormonas de crecimiento, hormonas, agentes radioterapéuticos, péptidos, proteínas, enzimas, componentes de la matriz extracelular naturales o sintéticos, agentes para terapia génica entre otros.

Por otro lado, las células que pueden emplearse en la elaboración del constructor de la invención comprenden diversos tipos celulares animales, incluyendo células humanas. El tipo celular a emplear dependerá de la aplicación final del constructo, pudiéndose utilizar células diferenciadas propias del tejido a reparar o, preferentemente, células progenitoras o células madre, que pueden ser amplificadas con facilidad, y que se diferenciarán en las células específicas del tejido a reparar, adquiriendo las funciones propias de dicho tejido. Además el constructo puede estar constituido por un único tipo celular o una mezcla de varios tipos celulares. Todas estas células pueden proceder del propio paciente (autólogas), o de un donante (heterólogas), el cual puede ser de la misma especie (alogénicas) o incluso de otras especies (xenogénicas). La limitación para poder emplear uno u otro tipo de células es simplemente que el sistema inmune del receptor sea capaz de aceptarlo, con o sin ayuda de inmunosupresores (la ayuda de inmunosupresores es necesaria incluso dentro de la misma especie, en la inmensa mayoría de los casos). Aunque hoy día se tiende a reducir todo lo posible la necesidad de traspasar barreras específicas.

Así, otra realización particular lo constituye el constructo de la invención donde las células vivas que se emplean son células animales, preferentemente células mesenquimales, incluyendo células diferenciadas, progenitores o células madre de origen tisular (del adulto), o células madre no humanas de origen fetal o embrionario.

Otra realización particular lo constituye el constructo de la invención donde las células vivas provienen del propio paciente (autólogas) o de un donante (heterólogas) que puede ser de la misma especie (alogénicas) o de otra especie (xenogénicas).

Otra realización particular lo constituye el constructo de la invención donde las células vivas empleadas son capaces de proliferar y diferenciarse en linajes específicos, al ser tratadas con los factores y biomoléculas adecuadas.

ES 2 334 298 B1

Para obtener constructos de diferentes tipos celulares los distintos tipos pueden co-cultivarse desde el principio o bien pueden añadirse de forma sucesiva. El cultivo mixto es especialmente interesante para promover la vascularización de los implantes, un proceso que es vital para la supervivencia del constructo dentro del organismo y su integración en el tejido circundante. Así, por ejemplo, en un constructo formado por células osteoprogenitoras destinadas a la reparación ósea puede ser suplementado con células endoteliales que promoverán la formación de vasos sanguíneos en el hueso en reparación.

Una vez seleccionado el tipo celular que va a ser empleado el siguiente paso es conseguir que su proliferación y su comportamiento se dirijan hacia el fin deseado. Para ello se puede manipular el microambiente extracelular (aplicando factores de crecimiento, variando parámetro físico-químicos del biomaterial) (J. Becerra, J.A. Andrade, J.A. Santa-maría, M. Cifuentes, E. Guerardo. Regeneración ósea, terapia celular e ingeniería tisular. *Med Clin* 116 (2001) 23-25) (A. Spradling, D. Drummond-Barbosa, T Kai. Stem cells find their niche. *Nature* 414 (2001) 157-162) o manipular el mapa genético de dichas células mediante terapias génicas (M.A. Surani. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 414 (2001) 122-128). La utilización final de las células en ingeniería tisular va a exigir evaluar su viabilidad, el mantenimiento de su fenotipo (no se produce desdiferenciación ni transdiferenciación) evaluar la capacidad de las mismas para asociarse al biomaterial y al resto del tejido en construcción y por último la capacidad de mantener su actividad funcional en el interior del organismo.

Otra realización particular lo constituye el constructo de la invención donde el constructo comprende, como cultivo complementario a las células propiamente reparadoras, células endoteliales y/o factores de crecimiento angiogénicos, capaces de inducir angiogénesis y desarrollar constructos de gran tamaño y tridimensionales.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso del biomaterial tipo sílice mesoestructurada (SBA-15) y/o del biomaterial compuesto formado por una matriz de sílice del tipo SBA-15 sobre el que se crecen nanopartículas de hidroxiapatito de calcio (HA-SBA-15) como soporte en la elaboración del constructo de la invención. Como se ha comentado anteriormente la fabricación de estos dos biomateriales forma parte del estado de la técnica y la construcción del constructo puede ser llevado a cabo por un experto en la materia con la información suministrada en la presente invención.

En cuanto a las aplicaciones del constructo de la invención, son muy diversas. En el campo de la ingeniería de tejidos pueden emplearse para regenerar, restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales, perdidas o deterioradas, de los propios tejidos orgánicos. Preferentemente y conjuntamente con otras medidas terapéuticas, pueden colocarse y usarse interpuestos entre las prótesis artificiales y el tejido del huésped con objeto de contribuir eficazmente a la fijación biológica de dichas prótesis en animales, incluyendo al ser humano, pueden transferirse a lesiones titulares con objeto de que se integren en el tejido receptor y adquieran la funcionalidad de éste, reparando y regenerando el tejido en animales, incluyendo al ser humano, pueden también emplearse en la reparación y regeneración de los tejidos musculoesqueléticos, por ejemplo, hueso y cartílago, incluidos los tejidos periodontales, en intervenciones y cirugías reparadoras, reconstructivas y regenerativas, cirugía ortopédica y traumatología, cirugía vertebral, cirugía oral y maxilofacial, cirugías correctoras, cirugía plástica y estética, en intervenciones para el tratamiento de artritis, osteoartritis, artritis reumatoidea, artrosis, osteoporosis, enfermedades raras (osteogénesis imperfecta, craneosintesis), pérdidas de hueso por fractura, pérdidas de tejido óseo o osteocartilaginoso por extirpación de tumores, en cirugías de mínima invasión como por ejemplo las técnicas de vertebroplastia y kyphoplastia que se utilizan en cirugía vertebral, cirugía para problemas de escoliosis, en la infiltración de hueso osteoporótico, en el tratamiento de anomalías peridontales y/o en tratamientos de terapia génica entre otras aplicaciones.

Otros usos de este constructo son: como vehículos para transportar, almacenar y liberar moléculas bioactivas y agentes para la terapia génica *in situ* en tejidos animales, incluyendo los humanos, para reparar las lesiones tisulares, en animales incluyendo dentro de estos al ser humano, integrándose en el tejido receptor y adquiriendo la funcionalidad de éste, reparando y regenerando el tejido lesionado, en la elaboración de constructos tridimensionales de gran tamaño mediante la inducción de angiogénesis a través del co-cultivo con células endoteliales y/o terapia génica con factores de crecimiento angiogénicos, en la elaboración de constructos tridimensionales de gran tamaño mediante su implementación en bioreactores y/o dispositivos de cultivo celular, en la fabricación de cementos y material de relleno con componente celular, en la fabricación de implantes tisulares mediante técnicas avanzadas de diseño y prototipado rápido, en la realización de estudios toxicológicos *in vitro* preferentemente en la industria farmacéutica, y/o en estudios de citotoxicidad de distintos agentes contaminantes ambientales y/o nanopartículas entre otros.

Ejemplos de realización de la invención

Ejemplo 1

Elaboración de un constructo utilizando células osteoprogenitoras de ratón MC3T3-E1 y el biomaterial SBA-15

Las células que se emplean son células osteoprogenitoras de ratón (línea MC3T3-E1, American Type Culture Collection, ATCC). Estas células se cultivan en medio a-MEM suplementado con 10% de suero FCS (Fetal Calf Serum), 1% de la solución antibiótica/antimicótica (10,000 I.U. penicilina, 10,000 ug/mL estreptomicina, 25 ug/mL anfotericina B) y 2 mM de glutamina.

ES 2 334 298 B1

- El biomaterial que se emplea es el SBA-15 (sílice mesoporosa). Su síntesis se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito por Zhao y col. (D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G.H. Fredrickson, B.F. Chmelka, G.D. Stucky. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. *Science* 279 (1998), 548) y antes de su utilización se esteriliza en autoclave mediante el siguiente procedimiento: se colocan 2 mg del biomaterial en una placa de Petri y se someten a un ciclo húmedo standard (121°C y 103 KPa). Una vez esterilizado se procede a la caracterización de sus propiedades estructurales y texturales mediante las técnicas de difracción de rayos X (DRX), medidas de adsorción de nitrógeno y microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).
- Las medidas de difracción de rayos X (DRX) se efectúan con un difractómetro Philips X'Pert. Se emplea la radiación $K\alpha$ del cobre ($\lambda=1,54187$ Å) y unas condiciones de operación de 40 kV y 40 mA. Las medidas de bajo ángulo se llevan a cabo con un paso de 0, 004°, un tiempo de exposición de 10s y un detector sensible a la posición con longitud 0,5179 (2θ).
- Para calcular la porosidad del biomaterial se obtienen las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno a su temperatura normal de ebullición (77K). Las medidas se efectúan en un equipo ASAP2020 después de desgasificar las muestras a 523K durante 12 h. La superficie específica se obtiene aplicando el modelo BET en el rango de presiones P/P_0 entre 0,05 y 0,2. El volumen total de poros, V_t , se calcula a partir del volumen de nitrógeno adsorbido para un valor de $P/P_0 = 0,99$ (F. Rouquerol, J. Rouquerol, K. Sing. Adsorption by powders and porous solids: principles, methodology and applications. London: Academic Press, 1999) (M. Kruk, M. Jaroniec, M., C.H. Ko, R. Ryoo. Characterisation of the porous structure of SBA-15. *Chem Mater* 12 (2000) 1961). El volumen de microporos, V_m se evalúa a partir de las curvas t y la ecuación de Harkins-Jura (J.H. DeBoer, B.C. Lippens, B.G. Linsen, J.C.P. Broekhoff, A. Van den Heuvel, T.J. Osinga. The t-curve of multimolecular N_2 -adsorption. *J Colloid and Interface Sci* 21 (1966) 405) (M. Kruk, M. Jaroniec, A. Sayari. Application of large pore MCM-41 molecular sieves to improve pore size analysis using nitrogen adsorption measurements. *Langmuir* 13 (1997) 6267). La distribución de tamaño de poro se calcula en base a las ramas de adsorción mediante el método Barret-Joyner-Halenda (BJH) (F. Rouquerol, J. Rouquerol, K. Sing. Adsorption by powders and porous solids: principles, methodology and applications. London: Academic Press, 1999) (M. Kruk, M. Jaroniec, A. Sayari. Application of large pore MCM-41 molecular sieves to improve pore size analysis using nitrogen adsorption measurements. *Langmuir* 13 (1997) 6267) (E.P. Barrett, L.G. Joyner, P.P. Halenda. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. 1. Computations from nitrogen isotherms. *J Am Chem Soc* 73(1) (1951) 373). El tamaño de mesoporo, w_p , se define como el máximo de la distribución de volumen de poros. El espesor de la pared, b_p , se determina sustrayendo, w_p de la distancia entre los centros de dos poros adyacentes ó parámetro de celda unidad, a . El parámetro de celda unidad se calcula a partir de la distancia interplanar, d_{100} , mediante la siguiente fórmula: $a = 2d_{100}3^{-1/2}$.
- Las imágenes de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) se obtienen con un microscopio HITACHI S5200 usando un voltaje de 1 kV.
- La DRX determina los parámetros estructurales de la organización mesoporosa (distancias interplanares d y parámetro de celda unidad, a) y la adsorción de nitrógeno mide los parámetros texturales (superficie específica, S_{BET} , volumen de poros y su distribución de tamaños) que caracteriza la extensión y uniformidad de los mesoporos.
- Los parámetros estructurales obtenidos mediante DRX son los siguientes: distancia interplanar (100), $d_{100} = 9,7$ nm; relación de intensidades correspondientes a las distancias interplanares (110)/(100), $d_{110/100} = 0,03$; relación de intensidades correspondientes a las distancias interplanares (200)/(110), $d_{200/110} = 0,78$; parámetro de celda unidad, $a = 10,7$.
- Los parámetros texturales que se obtienen mediante adsorción de nitrógeno son los siguientes: superficie específica $S_{BET} = 503 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$; volumen de poros total = $0,77 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$; volumen de microporos $V_m = 0,03 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ tamaño de los mesoporos estimada a partir de los máximos BJH de adsorción, $w_p = 7,6$ nm; espesor de las paredes (grosor del esqueleto) de sílice, $b_p = 3,1$ nm. Tanto la difracción de rayos X como las medidas realizadas mediante adsorción de nitrógeno del biomaterial esterilizado (SBA-15) confirman una sílice amorfa organizada en una estructura mesoporosa (mesoestructura) constituida por una disposición hexagonal de poros longitudinales (2D) con simetría (grupo espacial) $P6mm$.
- Las imágenes FESEM del biomaterial SBA-15 esterilizado se presentan en la Figura 1. El biomaterial está formado por partículas poliédricas, relativamente uniformes con dimensiones micrométricas de un tamaño aproximado de 1 micra de longitud y 0,5 micras de anchura que se disponen longitudinalmente en fibras a modo de eslabones en una cadena (Figura 1b). La Figura 1c muestra en detalle la superficie de estas partículas micrométricas donde se aprecian a modo de canales la disposición longitudinal de los mesoporos. Como se aprecia en la micrografía (Figura 1c) las distancias entre poros adyacentes se corresponde muy bien con los valores de las distancias interplanares (100) obtenidas mediante DRX. A nivel más macroscópico estas partículas micrométricas se apelmazan formando unidades de mayor tamaño como se aprecia en la Figura 1a.
- Para la elaboración del constructo SBA-15_MC3T3-E1 se ponen en contacto las células con el biomaterial que acaba de caracterizarse en placas de 24 pocillos mediante el siguiente procedimiento: el biomaterial SBA-15 se extiende en el fondo de los pocillos cubriendo completamente su superficie. En condiciones de esterilidad, se siembra 1

ES 2 334 298 B1

mL de suspensión de células (10.000 células) sobre la capa de biomaterial mediante una pipeta y se cultivan durante 16 días. El cambio de medio se efectúa cada 4 días.

La Figura 2 presenta micrografías ópticas de campo claro de los cultivos (Figura 2a y 2b) junto con una imagen control correspondiente al biomaterial sin células en la que se aprecian partículas sueltas y dispersas (Figura 2c). Las Figura 2a muestra una imagen en la que se observa una partícula de biomaterial elongada (parte central) completamente rodeada de células. En la parte derecha de la imagen y señalado con una flecha se aprecia la formación incipiente de un agregado (constructo) biomaterial + células. Los agregados partículas de biomaterial + células iniciales “constructos germin” evolucionan ensamblándose en agregados globulares biomaterial-células de mayor tamaño a medida que avanza el tiempo de cultivo. En la Figura 2b se aprecian agregados de aproximadamente 50 micras de diámetro tras 9 días de cultivo.

Ejemplo 2

Elaboración de un constructo utilizando células madre mesenquimales procedentes de la médula ósea (BM-MSC) y el biomaterial HA-SEA-15

Para la elaboración de este constructo se emplean células madre mesenquimales humanas aisladas a partir de pequeños fragmentos de hueso esponjoso (BM-MSC) obtenidas, con el consentimiento de los pacientes, durante intervenciones quirúrgicas rutinarias de fémur. Las MSC se seleccionan de entre todos los tipos celulares presentes en la médula ósea del hueso esponjoso en función a su adherencia al plástico. Las células seleccionadas se cultivan en medio DMEM enriquecido con 10% de suero FCS (Fetal Calf Serum), 1% de la solución antibiótica/antimicótica (10,000 I.U. penicilina, 10,000 µg/mL estreptomicina, 25 ug/mL anfotericina B) y 2 mM de glutamina. Los cultivos primarios se dejan crecer hasta una confluencia del 80%, se despegan mediante digestión con tripsina-EDTA y se resiembran a una concentración de 5,000 células cm⁻² para continuar con el proceso de expansión hasta obtener la cantidad de células deseada. Las células utilizadas para la siembra corresponden, a su cuarta división.

El biomaterial compuesto HA-SBA-15 empleado en la elaboración de este constructo consiste en partículas de HA nanométricas sobre una matriz de sílice mesoestructurada tipo SBA-15. La síntesis se lleva a cabo en dos etapas. La primera consiste en la preparación de sílice mesoestructurada dopada con calcio sobre la que se crecen en una segunda etapa partículas de HA de dimensiones nanométricas (A. Díaz, T. López, J. Manjarrez, E. Basaldella, J.M. Martínez-Blanes, J.A. Odriozola. Growth of hydroxyapatite in a biocompatible mesoporous ordered silica. Acta Biomaterialia 2 (2006), 173). El biomaterial HA-SBA-15 se esteriliza utilizando tres métodos diferentes. Autoclave (A): 2 mg se colocan en un plato Petri y se someten a un ciclo húmedo estándar (121°C y 103 KPa), exposición a radiación UVA (U) : 2 mg de biomaterial se extienden sobre la superficie de una placa Petri y se exponen durante 3 horas a radiación UVA ($\lambda = 260$ nm), y lavado con etanol (E): 2 mg de biomaterial se someten a un lavado con etanol (5 ml de etanol al 70%) en distintas etapas y bajo condiciones estériles de flujo laminar. Según la nomenclatura empleada, el método de esterilización puede identificarse por las letras A (Autoclave), U (exposición a la radiación UVA) ó E (lavado con etanol) añadido la final del nombre del biomaterial. Por ejemplo: HA-SBA-15-A indica el biomaterial esterilizado en autoclave.

Los biomateriales esterilizados se caracterizan mediante las técnicas de difracción de rayos X (DRX), adsorción de nitrógeno y microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) de forma similar a los procesos descritos para el Ejemplo 1. Además de esta caracterización, para este biomaterial se realiza una estimación del tamaño medio de cristalito de hidroxiapatito (HA) mediante DRX a partir del pico de difracción correspondiente al plano (002) con un paso de 0,004 y 600 s de exposición. El cálculo se efectúa aplicando la ecuación de Scherrer con las correcciones correspondientes (S.N. Danilchenko, O.G. Kukharenko, C. Moseke, I.Y. Protsenko, L.F. Sukhodub, B. Sulkio-Cleff. Determination of the bone mineral crystallite size and lattice strain from diffraction line broadening. Cryst Res Technol 37 (2002) 1234) (H.P. Klug, L.E. Alexander. X-ray diffraction procedures for polycrystalline and amorphous materials. New York: John Wiley and Sons, 2nd edition, 1974).

La DRX determina los parámetros estructurales de la organización mesoporosa (distancias interplanares d, parámetro de celda unidad, a) y permite la caracterización de las fases cristalinas presentes. En este caso se detecta únicamente HA (JCPDS 9-432) como única fase cristalina. La adsorción de nitrógeno mide los parámetros texturales (superficie específica, SET, volumen de poros y su distribución de tamaños) que caracteriza la extensión y uniformidad de los mesoporos. Los parámetros estructurales y texturales obtenidos para el biomaterial tras ser sometido a los tres métodos de esterilización se presentan en la Tabla 1 y 2, donde aparecen respectivamente los valores obtenidos.

ES 2 334 298 B1

TABLA 1

Caracterización estructural y determinación de tamaño de cristalito por DRX

Biomaterial	d_{100}^a (nm)	d_{110}^b / d_{100}^a	d_{200}^c / d_{110}^b	Tamaño de cristalito promedio, L (nm) calculado con la Ecuación de Scherrer
HA-SBA-15	10.9	0,10	0,43	58
HA-SBA-15-A	10.8	0,07	0,41	52
HA-SBA-15-U	10.8	0,14	0,39	63
HA-SBA-15-E	10.7	0,13	0,39	60

^a d valores de la reflexión (100)^b d valores de la reflexión (110)^c d valores de la reflexión (200)

TABLA 2

Caracterización de la superficie por adsorción de nitrógeno

Biomaterial	S_{BET} ($\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$)	V_t ($\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$)	V_m ($\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$)	w_p^a (nm)	a^b (nm)	b_p^c (nm)
HA-SBA-15	250	0,87	0,02	12,4	12,6	0,2
HA-SBA-15-A	259	0,91	0,02	12,7	12,5	---
HA-SBA-15-U	263	0,90	0,02	12,9	12,5	---
HA-SBA-15-E	269	0,94	0,02	12,8	12,4	---

^a Diámetro de los mesoporos estimado a partir de los máximos BJH de la isoterma de adsorción^b Parámetro de celda unidad ($a = 2d_{100} 3^{-1/2}$).^c Espesor de las paredes del esqueleto de sílice calculada por sustracción del diámetro de mesoporo, w_p , al parámetro de celda unidad, a .

Los parámetros medidos confirman que se mantiene la mesoestructura inicial de la matriz de sílice a pesar del crecimiento de los nanocrystalines de HA. Se observan algunas variaciones estructurales menores en los parámetros medidos. Sin embargo, la variación en la superficie específica es muy importante con una disminución en torno al 50% respecto a la matriz de sílice SBA-15 de partida.

ES 2 334 298 B1

Las imágenes FESEM del biomaterial compuesto HA-SBA-15 esterilizado en autoclave se comparan con las obtenidas para el biomaterial sin esterilizar en la Figura 3. Las Figuras 3a y 3c muestran las partículas de sílice micrométrica decoradas por cúmulos de partículas de HA con cierta heterogeneidad de tamaño. El tamaño de partícula determinado a partir de micrografías FESEM oscila entre los 50 y los 150 nm (Figuras 3b y 3d). Estos valores son algo superiores a los valores de $L = 52$ nm estimados mediante DRX. Esta discrepancia puede explicarse ya que la anchura de la línea de difracción depende del tamaño de los cristalitos individuales, mientras que las medidas realizadas a partir de las micrografías FESEM son sensibles al tamaño global de la partícula.

Para la elaboración del constructo de la invención HA-SBA-15_BM-MSC se ponen en contacto las células con el biomaterial en placas de 24 pocillos mediante el siguiente procedimiento: El biomaterial HA-SBA-15 se extiende en el fondo de los pocillos cubriendo completamente su superficie. Se siembra 1 mL de suspensión de células (10.000 células) sobre la capa de biomaterial mediante una pipeta y se cultivan durante 16 días. El cambio de medio se efectúa cada 4 días.

Para comprobar la viabilidad celular y facilitar su observación las células se marcan mediante tinción con el fluorocromo Cell Tacker Green (Molecular Probes, Invitrogen) a concentración 1 μ M. Las observaciones se realizan con microscopios Leica y Nikon ambos equipados con un sistema de luz epifluorescente.

La Figura 4 presenta micrografías ópticas correspondientes a cultivos de 14 días utilizando el biomaterial esterilizado con radiación UVA. La Figura 4a es una imagen de campo claro que muestra agregados globulares (3D) biomaterial-células (constructos) con tamaños por encima de 200 micras de diámetro. La Figura 4b es una imagen de epifluorescencia utilizando un marcador de vitalidad Cell Tacker Green que confirma la viabilidad de las células en los constructos. Finalmente en la Figura 4c se presenta la superposición de la Figuras 4a y 4b a modo de referencia para la localización de la señal fluorescente que confirma la presencia de células viables en los constructos.

La diferenciación de las células se analiza mediante detección inmunocitoquímica de fosfatasa alcalina, un marcador temprano de osteogénesis. Para la detección inmunocitoquímica de fosfatasa alcalina se emplea el anticuerpo monoclonal B4-78 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa) diluido en proporción 1:100 en tampón PBS (Phosphate-Buffered Saline) con un contenido de 0,5% de BSA (Bovine Serum Albumin) y 0,1% de Triton X-100. Las células ya marcadas con *Cell Tacker Green* se fijan durante 20 minutos a -20°C en una mezcla 2:2:1 metanol:acetona:agua. Se lavan con PBS y se incuban durante la noche con el anticuerpo. Posteriormente, se lavan tres veces con PBS y se incuban 60 minutos en TRITC-labelled anti-mouse IgG, en una dilución 1:100 en PBS conteniendo 0,5% BSA y 0,1% Triton X-100. Después de cinco lavados en PBS se guardan refrigeradas en oscuridad hasta llevar a cabo las observaciones y la captura de imágenes con un microscopio Nikon.

La Figura 5 muestra micrografías de epifluorescencia de un constructo elaborado con el biomaterial HA-SBA-15 esterilizado con etanol. La Figura 5a es una imagen de epifluorescencia utilizando el marcador confirma la viabilidad de las células en el constructo. La Figura 5b muestra inmunorreactividad al anticuerpo B4-78, que reconoce específicamente la fosfatasa alcalina, confirmándose así el inicio de un proceso celular de diferenciación osteogénica iniciado en el centro del constructo, tal como confirma el hecho de que la inmunorreactividad sea mayor en la parte central del constructo. La zona positiva a la fosfatasa alcalina aparece delimitada con trazo discontinuo en la Figura 5c que presenta una superposición de las micrografías representadas en las Figuras 5a y 5b.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Constructo útil para terapia de regeneración de tejido **caracterizado** porque comprende uno o más tipos de células vivas cultivadas formando estructuras tridimensionales complejas en un biomaterial, del tipo sílice mesoestructurada, SBA-15.
- 10 2. Constructo según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el biomaterial consiste en un biomaterial compuesto formado por una matriz de sílice del tipo SBA-15 sobre el que se crecen nanopartículas de hidroxiapatito de calcio, HA-SBA-15.
- 15 3. Constructo según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el biomaterial consiste en una mezcla de SBA-15 y HA-SBA-15.
- 20 4. Constructo según las reivindicaciones 1 a la 3 **caracterizado** porque las células vivas que se emplean son células animales, como células mesenquimales, incluyendo células diferenciadas, progenitores o células madre de origen tisular del adulto, o células madre no humanas de origen fetal o embrionario.
- 25 5. Constructo según las reivindicaciones 1 a la 4 **caracterizado** porque las células vivas provienen del propio paciente, autólogas, o de un donante, heterólogas, que puede ser de la misma especie, alogénicas, o de otra especie, xenogénicas.
- 30 6. Constructo según las reivindicaciones 1 a la 5 **caracterizado** porque las células vivas empleadas son capaces de proliferar y diferenciarse en linajes específicos, al ser tratadas con los factores y biomoléculas adecuadas.
- 25 7. Constructo según las reivindicaciones 1 a la 5 **caracterizado** porque las células vivas empleadas pertenecen al siguiente grupo: osteoblastos, fibroblastos, condroblastos y células mesenquimales.
- 35 8. Constructo según las reivindicaciones 1 a la 7 **caracterizado** porque el biomaterial está dopado con biomoléculas y/o elementos químicos como Mg, Mn, Zn o Sr, entre otros, para mejorar sus propiedades biológicas, físicas, químicas, terapéuticas o de seguimiento radiológico.
- 40 9. Constructo según las reivindicaciones 1 a la 8 **caracterizado** porque el biomaterial está funcionalizado con moléculas orgánicas para modificar sus propiedades físicas, químicas y biológicas, como la capacidad de adsorción de dicho material.
- 45 10. Constructo según las reivindicaciones 1 a la 9 **caracterizado** porque el biomaterial presenta la adsorción de moléculas con actividad biológica, naturales o sintéticas y/o agentes terapéuticos en la que al menos uno pertenece al grupo de los factores de crecimiento, factores de crecimiento angiogénicos, agentes antitrombogénicos, vasodilatadores agentes antimicrobianos, antibióticos, antimicóticos, antivirales, anticancerígenos, anti-inflamatorios, inmunosupresores, hormonas de crecimiento, hormonas, agentes radioterapéuticos, péptidos, proteínas, enzimas, componentes de la matriz extracelular naturales o sintéticos, agentes para terapia génica entre otros.
- 50 11. Constructo según las reivindicaciones 1 a la 10 **caracterizado** porque el constructo comprende, como cultivo complementario a las células propiamente reparadoras, células endoteliales y/o factores de crecimiento angiogénicos, capaces de inducir angiogénesis y desarrollar constructos de gran tamaño y tridimensionales.
- 55 12. Uso del biomaterial tipo sílice mesoestructurada, SBA-15, y/o del biomaterial compuesto formado por una matriz de sílice del tipo SBA-15 sobre el que se crecen nanopartículas de hidroxiapatito de calcio, HA-SBA-15, como soporte en la elaboración de un constructo según las reivindicaciones 1 a la 11.
- 50 13. Uso del biomaterial según la reivindicación 12 **caracterizado** porque la elaboración del constructo se lleva a cabo en un bioreactores u otro dispositivo de cultivo celular.
- 55 14. Uso del constructo según las reivindicaciones 1 a la 11 en la elaboración de un implante tisular útil para la regeneración y reparación de tejidos en animales, incluidos los seres humanos.
- 60 15. Uso del constructo según la reivindicación 14 **caracterizado** porque se utilizan conjuntamente con otras medidas terapéuticas, como material de interposición entre prótesis artificiales y el tejido del huésped a regenerar.
- 65 16. Uso del constructo según las reivindicaciones 14 y 15 **caracterizado** porque el tejido a reparar pertenece al siguiente grupo: tejidos musculoesqueléticos como hueso y cartílago, incluidos los tejidos periodontales, y porque se usan en intervenciones y cirugías reparadoras, reconstructivas y regenerativas, cirugía ortopédica y traumatología, cirugía vertebral, cirugía oral y maxilofacial, cirugías correctoras, cirugía plástica y estética, en intervenciones para el tratamiento de artritis, osteoartritis, artritis reumatoidea, artrosis, osteoporosis, enfermedades raras como osteogénesis imperfecta o craneosintesis, pérdidas de hueso por fractura, pérdidas de tejido óseo o osteocartilaginoso por extirpación de tumores; en cirugías de mínima invasión, como las técnicas de vertebroplastia y kyphoplastia, que se utilizan en cirugía vertebral; cirugía para problemas de escoliosis, en la infiltración de hueso osteoporótico; en el tratamiento de anomalías periodontales y/o en tratamientos de terapia génica entre otras aplicaciones.

ES 2 334 298 B1

17. Uso del constructo según las reivindicaciones 1 a la 11 en la elaboración de un vehículo para transportar, almacenar y liberar moléculas bioactivas y/o agentes para la terapia génica *in situ* en tejidos animales incluyendo los humanos.
- 5 18. Uso del constructo según las reivindicaciones 1 a la 11 en un procedimiento de análisis toxicológico *in vitro* en la industria farmacéutica.
- 10 19. Uso del constructo según las reivindicaciones 1 a la 11 en un procedimiento de estudio terapéutico *in vitro* en la industria farmacéutica.
- 15 20. Uso del constructo según las reivindicaciones 1 a la 11 en un procedimiento de análisis de citotoxicidad de distintos agentes contaminantes ambientales y/o nanopartículas entre otros.
- 20 21. Uso del constructo según las reivindicaciones 1 a la 11 **caracterizado** porque los biomateriales pueden consolidarse en piezas con distintas características, como molotitos con porosidad variable o estructuras celulares, mediante técnicas de procesado.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

ES 2 334 298 B1

Figura 1: Micrografías FESEM del biomaterial SBA-15 esterilizado

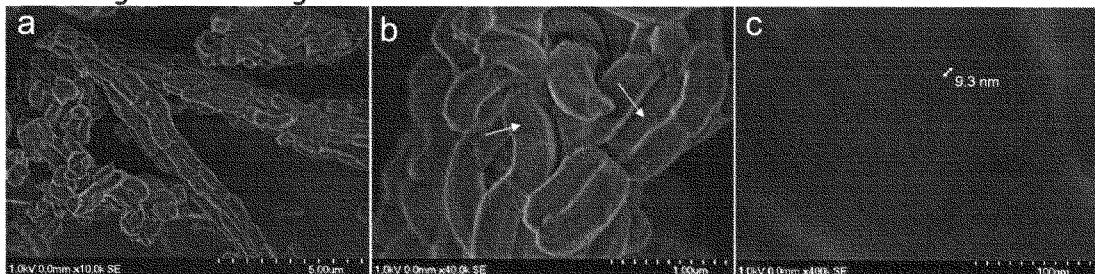


Figura 2: Micrografías ópticas de campo claro de los cultivos con MC3T3-E1

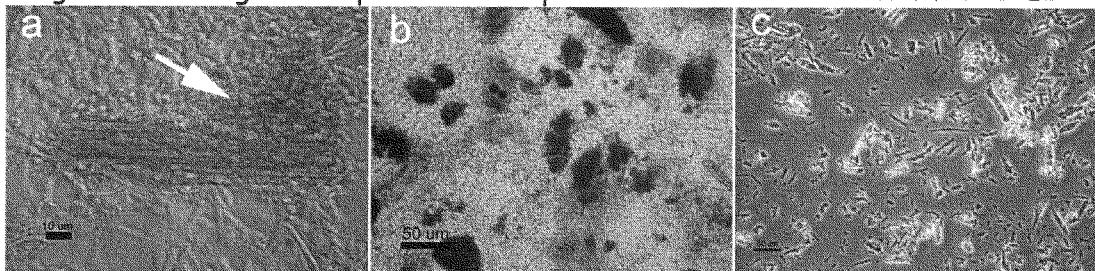
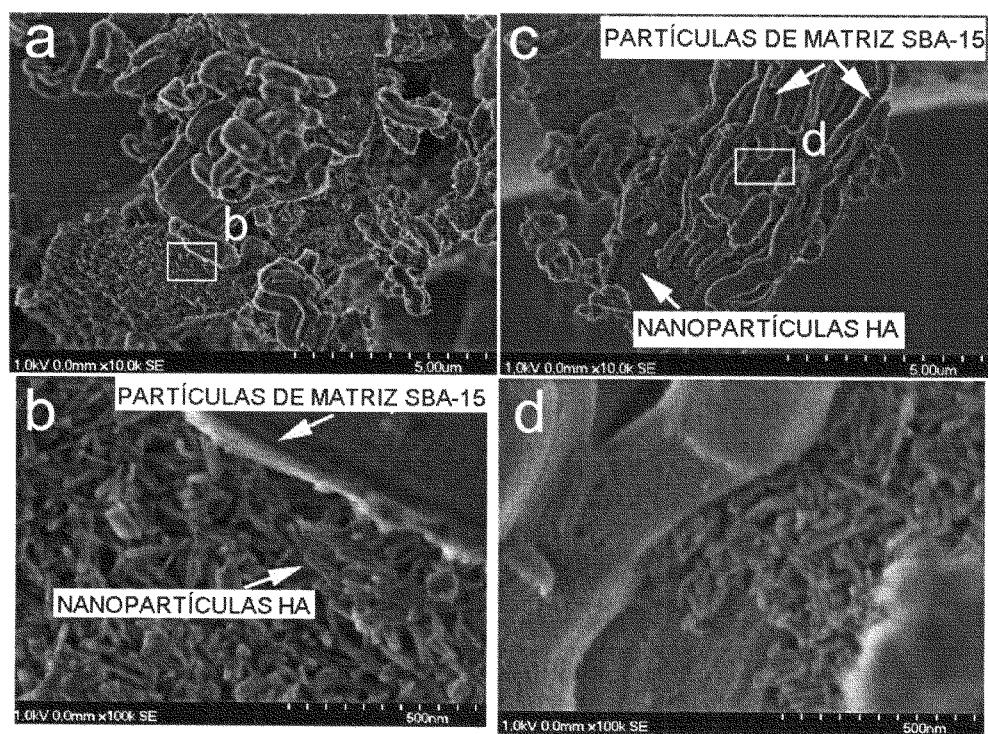
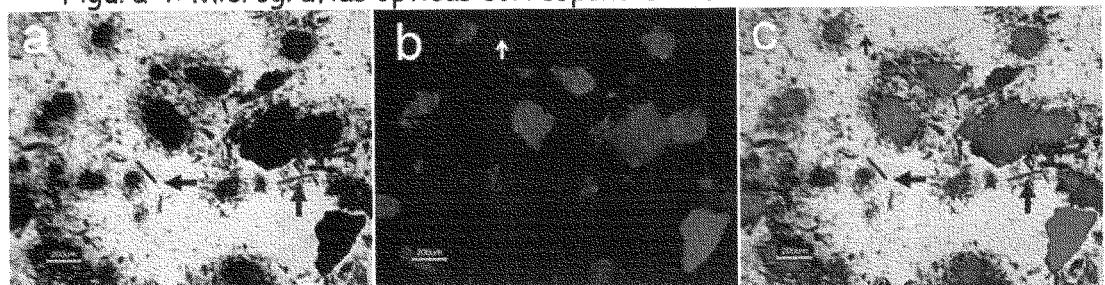


Figura 3: Micrografias FESEM del biomaterial compuesto HA-SBA-15



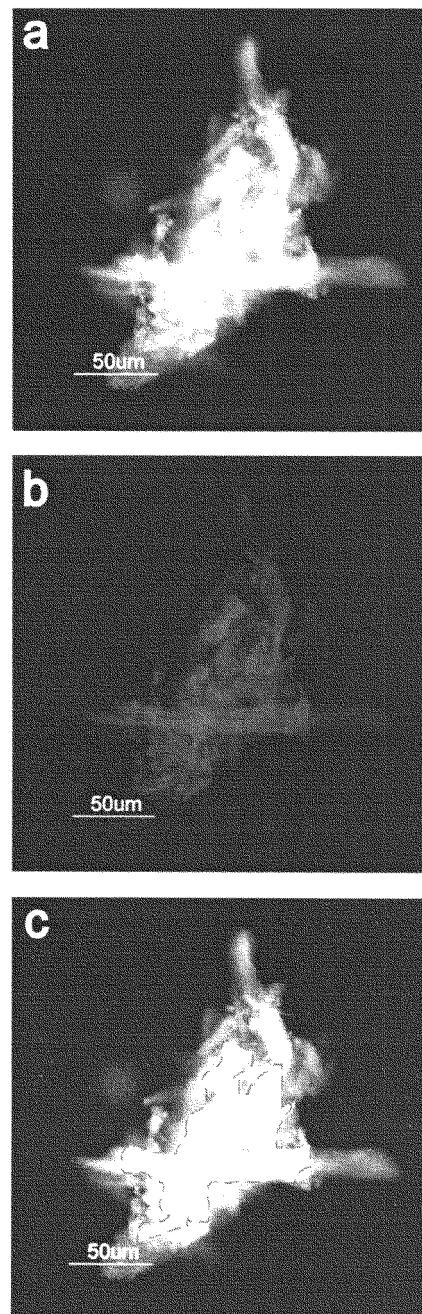
ES 2 334 298 B1

Figura 4: Micrografías ópticas correspondientes a cultivos de BM-MSC



ES 2 334 298 B1

Figura 5: Micrografías de epifluorescencia





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- (11) ES 2 334 298
(21) Nº de solicitud: 200702694
(22) Fecha de presentación de la solicitud: 15.10.2007
(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	THIAN, E.S., et al. Silicon-substituted hydroxyapatite: The next generation of bioactive coatings. Materials Science and Engineering C. 07-02-2007. Vol. 27, nº 2, páginas 251-256. ISSN 0928-4931. Ver todo el documento.	1-21
X	NAIR, M.B., et al. A triphasic ceramic-coated porous hydroxyapatite for tissue engineering application. Acta biomaterialia. 27-07-2007 (on line). Vol. 4, nº 1, páginas 173-181. ISSN 1742-7061 (Print). Ver todo el documento.	1-21
Y	DÍAZ, A., et al. Growth of hydroxyapatite in a biocompatible mesoporous ordered silica. Acta biomaterialia. Marzo-2006. Vol. 2, nº 2, páginas 173-179. ISSN 1742-7061 (Print). Ver todo el documento, especialmente resumen y páginas 174 y 178.	1-21
Y	MASTROGIACOMO, M., et al. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. Biomaterials. Junio-2006. Vol. 27, nº 17, páginas 3230-3237. ISSN 0142-9612 (Print). Ver todo el documento.	1-21
Y	ANDERSSON, J., et al. Sol-gel synthesis of a multifunctional, hierarchically porous silica/apatite composite. Biomaterials. Diciembre-2005. Vol. 26, nº 34, páginas 6827-6835. ISSN 0142-9612 (Print). Ver todo el documento, especialmente resumen y páginas 6828, 6832 y 6833.	1-21
Y	TROJANI, C., et al. Ectopic bone formation using an injectable biphasic calcium phosphate/Si-HPMC hydrogel composite loaded with undifferentiated bone marrow stromal cells. Junio-2006. Biomaterials. Vol. 27, nº 17, páginas 3256-3264. ISSN 0142-9612 (Print). Ver todo el documento.	1-21

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

O: referido a divulgación no escrita

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

A: refleja el estado de la técnica

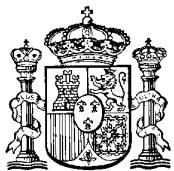
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 22.02.2010	Examinador B. Pérez Esteban	Página 1/6
--	--------------------------------	---------------



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- (11) ES 2 334 298
(21) N° de solicitud: 200702694
(22) Fecha de presentación de la solicitud: 15.10.2007
(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KR 20050075663 A (KOREA INST CERAMIC ENG & TECHNOLOGY) 21.07.2005, (resumen) WPI / Thomson [en línea] [recuperado el 19.02.2010]. Recuperado de: EPOQUENET, EPO, DW200659, nº de acceso 2006-574800 [59].	1-21
A	CANCEDDA, R., et al. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology. Marzo-2003. Vol. 22, nº 1, páginas 81-91. ISSN 0945-053X (Print). Ver todo el documento.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 22.02.2010	Examinador B. Pérez Esteban	Página 2/6
--	--------------------------------	---------------

INFORME DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

Nº de solicitud: 200702694

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD**A61L 27/12** (2006.01)**A61L 27/42** (2006.01)**A61L 27/38** (2006.01)**A61F 2/28** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61L, A61F

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP

OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 200702694

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.02.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones Reivindicaciones	1-21	SÍ NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones Reivindicaciones	1-21	SÍ NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	THIAN, E.S., et al.	07-02-2007
D02	NAIR, M.B., et al.	27-07-2007
D03	DÍAZ, A., et al.	Marzo-2006
D04	MASTROGIACOMO, M., et al.	Junio-2006
D05	ANDERSSON, J., et al.	Dic-2005
D06	TROJANI, C., et al.	Junio-2006
D07	KR 20050075663 A	21-07-2005
D08	CANCEDDA, R., et al.	Marzo-2003

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe y reivindica una estructura tridimensional formada por un material biocompatible sobre el que se cultivan células vivas. Se trata de un material es del tipo sílice mesoestructurada (SBA-15), que puede estar o no cubierto de nanopartículas de hidroxiapatito de calcio. Esta estructura es útil en terapia de regeneración de tejidos, como soporte para la elaboración de implantes, y como vehículo para liberación de fármacos u otros compuestos terapéuticos.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue la estructura exacta que se reivindica, por lo que la invención se considera nueva según el artículo 6 de la Ley de Patentes.

Sin embargo, en numerosos documentos se describen estructuras muy semejantes a la de la solicitud, que anticiparían la invención, de modo que ésta no cumpliría el requisito de actividad inventiva requerido por el artículo 8 de la Ley de Patentes.

Así, por ejemplo, el documento D01 se refiere a un biomaterial formado por sílice mesoestructurada recubierta de hidroxiapatito sobre el que se cultivan células (osteoblastos) y se observa su crecimiento sobre el soporte que, por tanto, sería adecuado para terapias de regeneración ósea. Aunque los experimentos se han realizado *in vitro*, se considera que no supondría un esfuerzo inventivo para el experto en la materia la elaboración de la estructura de la solicitud a partir de la información divulgada en D01, su utilización en experimentos *in vivo*, y su empleo para los distintos usos reivindicados. Por consiguiente, este documento afecta la actividad inventiva de la presente solicitud.

En el documento D02 encontramos igualmente una estructura formada por hidroxiapatito y sílice mesoestructurada. En este caso se cultivan células madre mesenquimales de médula ósea sobre la estructura inorgánica y se observa la viabilidad, proliferación y morfología de las células cultivadas, apreciándose crecimiento celular a lo largo del biomaterial. Como D01, también el documento D02 anticipa la actividad inventiva de la solicitud.

El documento D03 divulga las estructuras reivindicadas en la solicitud (sílice mesoestructurada sobre la que se crecen o no cristales de hidroxiapatito), aunque en este caso no se realiza cultivo celular. Una vez establecida la compatibilidad biológica de las dos matrices inorgánicas, el experto en la materia sólo necesitaría cultivar sobre ellas las células e implantar las estructuras resultantes en animales, para llegar a la invención objeto de la presente solicitud. Esta información se encontraría en el documento D04, en el que se describe el crecimiento de células de médula ósea sobre una matriz biocerámica, que se implanta posteriormente en ratones inmunodeprimidos, y se observa la generación de hueso a partir de las células mesenquimales implantadas. En consecuencia, sería evidente para el experto en la materia la combinación de los documentos D03 y D04 para obtener la estructura de la solicitud, que, por tanto, no cumpliría el requisito de actividad inventiva a la luz de lo divulgado en estos dos documentos.

OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 200702694

Hoja adicional

El mismo argumento puede aplicarse para la combinación de los documentos D05 y D06, que también afectarían la actividad inventiva de la solicitud. En el primero encontraríamos la estructura de sílice mesoporosa sobre cristales de hidroxiapatito y su uso como soporte para liberación controlada de fármacos. En el segundo se crecen células mesenquimales de médula ósea sobre un biomaterial y se inyecta en ratones, observándose que la inclusión de células en el implante favorece la formación de hueso frente a los implantes libres de células. La combinación D05 y D06 llevaría de manera evidente al experto en la materia a la estructura reivindicada en la solicitud, que, por consiguiente, no tendría actividad inventiva.

El documento D07 se refiere también a un sistema de liberación de fármacos que consiste en una cerámica (que podría ser hidroxiapatito, entre otras) recubierta de sílice mesoporosa. Puesto que en el resumen divulgado no se incluye el crecimiento celular en la matriz, se considera D07 como un mero documento del estado de la técnica, sin que afecte la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud.

Finalmente, el documento D08 es una revisión general de sistemas de regeneración de tejido óseo y cartilaginoso en la que se analizan las posibles matrices biocompatible y las células más apropiadas para esta terapia tisular. Este documento no afectaría la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud.