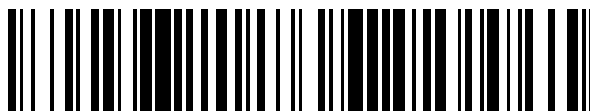


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 841 735**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.09.2013 PCT/GB2013/052312**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14037713**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2013 E 13762211 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2020 EP 2892576**

54 Título: **Implantes óseos compuestos**

30 Prioridad:

04.09.2012 GB 201215725

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

09.07.2021

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF LEEDS (100.0%)
Leeds, Yorkshire LS2 9JT, GB**

72 Inventor/es:

**INGHAM, EILEEN;
JONES, GEMMA;
FERMOR, HAZEL;
FISHER, JOHN y
HASAN, JAHID**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 841 735 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Implantes óseos compuestos

- 5 Esta invención se refiere a injertos osteocondrales e implantes de hueso-tejido conectivo-hueso compuestos naturales o nativos para la sustitución y/o reparación de, por ejemplo y en particular sin limitación, una articulación hueso-menisco-hueso dañada o defectuosa o una unión hueso-ligamento-hueso o lesión osteocondral, métodos para preparar los compuestos hueso-tejido conectivo-hueso y usos de los mismos. La invención también proporciona matrices hueso-tejido conectivo-hueso compuestas naturales o nativas y matrices osteocondrales o andamios que sustancialmente se
- 10 descelularizan para un trasplante o implantación subsecuente.

Antecedentes

- 15 La articulación de la rodilla es la articulación más grande y compleja en el cuerpo humano. Debido a su estructura anatómica, es susceptible a lesiones y daños por desgaste y desgarre. Los meniscos residen dentro de esta articulación y juegan un papel vital en la estabilidad de la articulación, la absorción de impactos y la transmisión de carga. Por lo tanto, la lesión de los meniscos conduce a una biomecánica articular alterada y, acoplado con la incapacidad de curar debido a su avascularidad, esto conduce a su vez a la degeneración subsecuente de los tejidos circundantes característicos de la osteoartritis (OA). Hay aproximadamente un millón de procedimientos relacionados con el menisco cada año solo en los
- 20 Estados Unidos, y las opciones de tratamiento actuales solo retrasan la aparición de la OA y no proporcionan una cura. Por lo tanto, es necesario un reemplazo de menisco para detener la progresión de la OA y restaurar la biomecánica articular nativa. El tratamiento depende de la gravedad de un desgarro y la edad y el estado de salud del paciente, los tratamientos típicos incluyen una meniscectomía total donde se elimina todo el menisco, una meniscectomía parcial donde el cirujano elimina la menor cantidad posible de menisco y todos los fragmentos de menisco inestable se eliminan con los
- 25 bordes restantes del menisco alisados para que no haya extremos deshilachados. Alternativamente, el desgarro puede repararse mediante suturas o similares, sin embargo, no todos los desgarros pueden repararse de esta manera e incluso si pudieran, este método puede causar lesiones al tejido circundante o crear tejido blando fibroso inferior formado en desgarros externos que cicatrizan. Otra opción adicional es que el menisco pueda reemplazarse totalmente, por ejemplo, por un implante de menisco de colágeno compuesto de colágeno I o alguna otra matriz no organizada o por una prótesis de articulación de rodilla. Se han investigado muchas vías en la búsqueda de un reemplazo de menisco, desde fuentes de tejido autógeno, alogénico y xenogénico, hasta estrategias de ingeniería de tejidos más recientes. Una limitación de los aloinjertos es su disponibilidad de tejido, el potencial de transmisión de enfermedades, la calidad general del tejido y la posibilidad de rechazo del tejido. Una limitación del tejido xenogénico es cómo lograr la biocompatibilidad y el tejido inmunológicamente inerte.

- 35 El menisco comprende cuatro poblaciones de células diferentes y distintas; (i) las células endoteliales residen en la vasculatura (ii) las células fusiformes pueblan la región superficial; (iii) las células redondeadas se encuentran en la región similar a la hialina y; (iv) las células similares a los fibroblastos se encuentran en lo profundo de la región central, la presencia de células profundamente incrustadas es una de las razones por las que históricamente la descelularización de fuentes de tejido alogénicos y xenogénicos ha demostrado ser difícil de lograr. El documento WO 2008/059244 describe un método de descelularización del tejido del menisco.

- 45 Woods T y otros: "Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft", BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 26, no. 35, 1 de diciembre de 2005 (2005-12-01), páginas 7339-7349 describe injertos de hueso-ligamento-hueso descelularizados que mantienen adecuadas propiedades mecánicas y bioquímicas.

- 50 Los ligamentos conectan los huesos con otros huesos para formar una articulación, algunos ligamentos limitan la movilidad de las articulaciones, o impiden ciertos movimientos completamente. Los ligamentos son mecano-sensibles, mecánicamente fuertes y viscoelásticos. Los ligamentos se alargan gradualmente cuando están bajo tensión y vuelven a su forma original cuando se elimina la tensión. Sin embargo, no pueden retener su forma original cuando se estiran más allá de cierto punto o durante un período de tiempo prolongado. Esta es una de las razones por las que las articulaciones dislocadas deben colocarse lo más rápido posible: si los ligamentos se alargan demasiado, entonces la articulación se debilitará y se volverá propensa a dislocaciones futuras. Las lesiones de ligamentos son relativamente comunes tanto en humanos como en animales, por ejemplo, en el 2005 un estudio estimó que se gastaron \$ 1,32 billones en los Estados Unidos en el tratamiento del ligamento cruzado craneal de los perros. En los seres humanos, las lesiones de ligamentos son más comunes en la articulación de la rodilla, que frecuentemente afecta los ligamentos cruzados. Las lesiones de ligamentos pueden dividirse en dos tipos, lesiones agudas y crónicas. Las roturas son la forma aguda más común y a menudo ocurren en entornos deportivos. La división o desprendimiento completo de un ligamento provoca la pérdida
- 55 inmediata de su función, que es permanente a menos que se repare. La lesión de ligamento crónica se manifiesta por dolor e inflamación. Los ligamentos son tejido conectivo blando que se componen de: conjuntos de fibras de colágeno paralelas muy compactas; fibroblastos de ligamentos que son las células dominantes responsables por la homeostasis y reparación de ligamentos y; células madre que juegan un papel vital en el mantenimiento y la reparación. Por tanto, es esencial en cualquier proceso de descelularización que se conserven la histoarquitectura y las propiedades biomecánicas de estos complejos tejidos.
- 60

- La composición de la matriz ósea es aproximadamente un tercio de materia orgánica y dos tercios de materia inorgánica. La materia orgánica, sintetizada por los osteoblastos, es colágeno y proteínas como proteoglicanos y glicoproteínas. Otras células presentes en el hueso son los osteocitos, los osteoclastos y las células del revestimiento óseo. La otra materia inorgánica es generalmente sales de fosfato de calcio cristalizado y carbonato de calcio, y algunos otros minerales. La matriz ósea es un compuesto, lo que significa que tiene características de materia inorgánica dura y fuerte y cierta flexibilidad y se da del colágeno.
- Un problema importante asociado con cualquier implante que comprende un compuesto o mezcla de diferentes materiales biológicos naturales, cada uno teniendo diferentes propiedades y funciones, es que un tratamiento de descelularización particular puede ser efectivo para un tipo de tejido del compuesto/mezcla pero puede ser perjudicial para otro tipo de tejido que resulta en un producto compuesto en general dañado que no es apto para su uso. El problema se agrava de acuerdo con el número de tipos de tejidos diferentes en el implante compuesto. Por ejemplo, dado que el hueso en sí es un material compuesto, cualquier implante que comprende hueso más otro tipo de tejido, por ejemplo ligamento, menisco y/o entesis (un tejido similar a un cartílago que se encuentra donde el menisco o ligamento se une al hueso) es efectivamente de tres o más tipos de tejidos diferentes, cada uno requiriendo tratamientos específicos de descelularización que no dañan o alteran las características de cualquiera de los otros tipos de tejidos.
- Las lesiones osteocondrales pueden causar dolor y falta de movimiento en las articulaciones, pero también a menudo resultan en el aumento del desgaste del cartílago y la degradación de la articulación sinovial a un estado osteoartítico. Pueden emplearse varias intervenciones quirúrgicas para reparar el daño inicial del cartílago y prevenir la progresión de la enfermedad a osteoartritis. Sin embargo, estos tratamientos a menudo son ineficaces, proporcionando un material de reparación mecánicamente inferior, escasez de integración con los tejidos circundantes del huésped o tienen problemas asociados con la morbilidad del sitio donante. Los andamios para ingeniería tisular hechos de materiales sintéticos o naturales están en desarrollo y evitan los problemas de morbilidad del sitio donante, pero a menudo aún no proporcionan la misma función mecánica que el cartílago natural. Un injerto osteocondral compuesto acelular, natural, xenogénico, con la misma composición y estructura debe tener la misma función biomecánica que el cartílago natural. Al retirar las células, dichos injertos deberían ser biocompatibles. Al retener el hueso subcondral, los injertos compuestos deben integrarse bien con los tejidos circundantes del huésped. No se requiere un sitio donante y los injertos deberían eventualmente ser regenerados por las células huésped.
- Una matriz de tejido osteocondral o de reemplazo de hueso-tejido conectivo-hueso compuesto descelularizado natural que sea inmunológicamente inerte y esencialmente desprovista de cualquier célula ofrecería un beneficio inmediato a los pacientes y a la profesión médica.
- En particular, un reemplazo óseo y de menisco "estándar" abordaría las necesidades sociales y económicas de la población que envejece con lesiones de menisco, permitiendo altos niveles de actividad, capacidad de trabajo y calidad de vida. De manera similar, un reemplazo de ligamento, implante osteocondral o de reparación también sería de gran valor para los pacientes de lesiones agudas y crónicas de ligamentos y huesos por igual. En particular, un implante de hueso-tendón rotuliano-hueso sería de inmenso beneficio para los pacientes de lesiones de ligamento cruzado anterior de la articulación de la rodilla.
- Breve resumen de la descripción
- De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un producto que comprende un material de trasplante óseo multicompuesto natural descelularizado caracterizado por la ausencia (100 %) o ausencia sustancial (90 %) de células en todo el producto multicompuesto.
- La referencia en la presente descripción a un "material de trasplante óseo multicompuesto" es un material de trasplante que se forma de hueso y al menos otro tejido biológico distinto, tal como un tejido conectivo o cartílago, y es un compuesto hueso-tejido conectivo-hueso o un compuesto osteocondral.
- Preferentemente, el producto hueso-tejido conectivo-hueso descelularizado retiene su histoarquitectura original, composición de colágeno estructural y propiedades biomecánicas en comparación con un tejido compuesto equivalente celularizado fresco nativo. Los productos de la presente invención se han caracterizado histológica, estructural e inmunohistológicamente para ser de equivalencia comparable del tejido natural/nativo. Los resultados han mostrado que los productos descelularizados de la invención también retienen colágeno y que no se desnaturalizan durante los métodos de descelularización de la presente invención, además, la evaluación inmunohistoquímica mostró retención de los principales componentes de la matriz extracelular (ECM) pero pérdida de los glucosaminoglucanos (GAG), colágeno IV y colágeno VI.
- El producto multicompuesto de hueso descelularizado se caracteriza por un contenido de ADN genómico total (ADNg) de todo el tejido en el producto multicompuesto de entre 0 y 10 % del tejido nativo, con mayor preferencia por un contenido de ADNg de 0 a 7,5 % del tejido nativo y con mayor preferencia todavía un contenido de ADNg de 0 a 5 %. Los resultados han mostrado que, por ejemplo, el tejido de menisco aislado puede procesarse dentro del 2,5 al 5,0 % de un contenido de ADNg en comparación con el tejido de menisco nativo, mientras que para el tejido óseo aislado esto es alrededor del 5 al 10 % en comparación con el tejido nativo.

Preferentemente, el producto descelularizado es inmunológicamente inerte.

Preferentemente, el producto de trasplante óseo multicompuesto descelularizado se deriva del tejido alogénico o xenogénico. Preferentemente, el tejido xenogénico es porcino.

5

Preferentemente, el tejido conectivo se selecciona del grupo que comprende ligamentos y menisco.

10

Preferentemente, el menisco es tejido de menisco medial. El producto hueso-menisco medial-hueso incluye tejido de unión o entesis en cualquier extremo del menisco que une el menisco a cada bloque de hueso terminal (Figura 8B). Por tanto, el producto hueso-menisco medial-hueso de la presente invención incluye tejido de entesis y, por tanto, es un material multicompuesto.

15

En el caso del tejido conectivo que comprende un ligamento, el ligamento se selecciona del grupo que comprende ligamentos de cabeza y cuello, ligamentos de muñeca y dedos, ligamentos de rodilla, ligamentos de tórax, ligamentos de pie y ligamentos de pelvis.

20

Los ligamentos de cabeza y cuello pueden seleccionarse del grupo que comprende ligamento cricotiroides, ligamento periodontal y ligamento suspensorio del cristalino. Los ligamentos de muñeca pueden seleccionarse del grupo que comprende ligamento radiocarpiano palmar, ligamento radiocarpiano dorsal, ligamento colateral cubital y ligamento colateral radial. El ligamento de tórax puede ser los ligamentos suspensorios de la mama. Los ligamentos de rodilla pueden seleccionarse del grupo que comprende ligamento cruzado anterior (ACL), ligamento colateral lateral (LCL), ligamento cruzado posterior (PCL), ligamento colateral medial (MCL), ligamento cruzado craneal (CRCL) - equivalente cuadrúpedo de ACL, ligamento cruzado caudal (CACL) - equivalente cuadrúpedo de PCL y ligamento rotuliano. Los ligamentos pélvicos pueden seleccionarse del grupo que comprende ligamento sacroilíaco anterior, ligamento sacroilíaco posterior, ligamento sacrotuberoso, ligamento sacroespinoso, ligamento púbico inferior, ligamento púbico superior y ligamento suspensorio del pene.

25

Preferentemente, el ligamento es un ligamento de rodilla y más particularmente es un tendón rotuliano. Al igual que con el producto hueso-menisco medial-hueso, el producto hueso-tendón-hueso también incluirá tejido de entesis y, de nuevo, es por tanto un material multicompuesto.

30

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para preparar una matriz de tejido multicompuesto de hueso de donante descelularizado para su subsecuente implantación en un huésped, en donde el material de trasplante óseo multicompuesto es un compuesto hueso-tejido conectivo-hueso o un compuesto osteocondral caracterizado por la ausencia o ausencia sustancial de células en todo el compuesto, que comprende las etapas de:

35

- (i) congelar y descongelar la matriz de tejido multicompuesto;
- (ii) someter bloques de hueso a un chorro de fluido;
- (iii) ultrasonidos de la matriz de tejido compuesto;
- (iv) en el caso de la matriz de tejido multicompuesto comprende una estructura de hueso-tejido conectivo-hueso, que separa los fascículos en una región de entesis;
- (v) incubar la matriz de tejido multicompuesto en un tampón hipotónico;
- (vi) incubar la matriz de tejido multicompuesto en una solución hipotónica que comprende un detergente aniónico;
- (vii) incubar el tejido multicompuesto en una solución que comprende al menos una enzima nucleasa;
- (viii) lavar la matriz de tejido multicompuesto;
- (ix) incubar la matriz de tejido multicompuesto con un agente oxidante y;
- (x) lavado adicional de la matriz de tejido multicompuesto; y

40

en donde la ausencia sustancial está entre el 90 % y hasta el 100 % de eliminación de células de todas las partes del producto de trasplante multicompuesto.

45

50

El proceso de congelación/descongelación comprende preferentemente congelar la matriz de tejido compuesto, por ejemplo, entre -10 a -85 °C, típicamente a -20 °C para tejido hueso-menisco-hueso y a -85 °C para tejido hueso-tendón rotuliano-hueso. Esto se lleva a cabo al principio en material humedecido con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y luego se descongelan los compuestos hasta aproximadamente la temperatura ambiente.

55

El/Los bloque(s) de hueso de la matriz de tejido compuesto se somete/someten a chorros de fluido presurizados (etapa ii), siendo el fluido agua o solución salina tamponada con fosfato (PBS). Este proceso se conoce como "irrigación" y se usa para eliminar la médula ósea y las células sanguíneas, especialmente de los bloques de hueso esponjoso. Típicamente, se usan entre 250-600 mL de fluido para la irrigación de cada bloque de hueso.

60

Preferentemente, la energía ultrasónica (US) se aplica mediante un baño de sonicación a una solución en la que se sumerge la matriz de tejido multicompuesto. Típicamente, la solución que rodea la matriz de tejido multicompuesto es una solución tamponada, tal como una solución salina tamponada con fosfato.

En la etapa (iv) en el caso de la matriz de tejido multicompuesto comprende una estructura hueso-tejido conectivo-hueso, los fascículos en la región de entesis se separan mediante el uso de un bisturí y sin cortar ninguna de las fibras creando espacio entre los fascículos para mejorar la difusión subsecuente de soluciones de lavado

65

En la etapa (v), la incubación de la matriz de tejido multicompuesto en una solución hipotónica comprende una primera incubación de congelación-descongelación. La congelación se mantiene por entre 2-24 horas y subsecuentemente se descongela el tejido por aproximadamente 2, 3 o 4 horas hasta que alcanza la temperatura ambiente o en el caso de la descongelación hueso-menisco-hueso es a 40-45 °C. Este proceso se lleva a cabo al menos una vez y preferentemente dos o tres veces en ausencia de un tampón hipotónico y se repite de nuevo al menos una vez y preferentemente dos veces cuando el tejido se sumerge en el tampón hipotónico. El tampón hipotónico comprende una solución de Tris de 10 mM en condiciones ligeramente alcalinas (pH 8,0 a 8,2 por ejemplo) que incluye 10 KIU/mL de aprotonina. Se apreciará que la congelación/descongelación en la presencia y ausencia de un tampón hipotónico puede invertirse y opcionalmente alternarse. Después de las condiciones de congelación/descongelación, la matriz de tejido compuesto se incuba entonces en la solución de lavado hipotónica a aproximadamente 40-45 °C.

Una solución hipotónica es aquella en la que la concentración de electrolito está más abajo que en las células. En esta situación, la presión osmótica conduce a la migración de agua a las células, en un intento de igualar la concentración de electrolitos dentro y fuera de las paredes de las células.

En la etapa (vi), la matriz de tejido multicompuesto se incuba con un detergente aniónico como el dodecilsulfato de sodio (SDS). Preferentemente, esto está presente en la solución de lavado hipotónica en una concentración en el intervalo de 0,03-0,3 % (v/v) y con mayor preferencia todavía está presente en aproximadamente 0,10 a 0,15 % (v/v). Después de la incubación con SDS, la matriz de tejido compuesto se lava en PBS que incluye 10 KIU/mL de aprotonina a pH 7,2 -7,4 por múltiples ciclos (4-8) por 6-72 horas.

En la etapa (vii), la matriz de tejido multicompuesto se incuba entonces con enzimas nucleasas para digerir cualquier materia nucleica restante que se ha mostrado que actúa como sitios de calcificación.

Una solución de incubación de nucleasa típica pero no limitante, 50 mM de solución de Tris a pH 7,5-7,7, 10 mM de $MgCl_2$, albúmina de suero bovino (50 $\mu g/mL$) con ARNasa (1 U. l mL^{-1}) y ADNasa (50 U/mL).

El tejido se incuba preferentemente por aproximadamente 2, 3 o 4 horas, típicamente a aproximadamente 37 °C con la solución de nucleasa mientras se agita suavemente. Esto se repite, preferentemente por tres ciclos.

Después de la incubación con la solución de nucleasa, el tejido además se incuba preferentemente por aproximadamente 12-48 horas y típicamente 24 horas en una solución hipertónica que comprende Tris en solución (0,05 M) a pH 7,5-7,7 más 1,5 M de NaCl a aproximadamente 40-45 °C o una temperatura más baja que la que puede provocar la desnaturalización de las proteínas del colágeno. Seguido por un lavado de PBS como se describió anteriormente.

En la etapa (ix) la matriz de tejido compuesto se incuba con un agente oxidante, preferentemente el agente oxidante es ácido peroxiacético ($C_2H_4O_3$) también conocido como ácido peracético y comúnmente abreviado a PAA.

Preferentemente, la concentración de PAA está en el intervalo de 0,01 - 0,5 % v/v y con mayor preferencia todavía es aproximadamente 0,1 % de PAA (v/v).

Las etapas finales (x) de la preparación de los compuestos hueso-tejido conectivo-hueso descelularizados comprenden lavados prolongados en PBS (como se describió anteriormente).

El método también puede incluir además una etapa de incubar opcionalmente la matriz de tejido compuesto con un agente oxidante y;

Una etapa adicional de la opción a los métodos de la invención incluye la preparación para el almacenamiento entre -10 a -85 °C, típicamente a -20 °C para tejido hueso-menisco-hueso y a -85 °C para tejido hueso-tendón rotuliano-hueso. El almacenamiento es típicamente en material humedecido con PBS. Los compuestos hueso-tendón rotuliano-hueso también pueden almacenarse a 4 °C.

Se apreciará a lo largo de la descripción de los métodos de la presente invención que los tiempos, temperaturas y concentraciones indicadas se dan sólo como ejemplos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

En la presente descripción se describe un producto de trasplante producido por los métodos de la presente invención.

En la presente descripción se describe un material de trasplante osteocondral o hueso-tejido conectivo-hueso multicompuesto natural descelularizado que se puede obtener por el método de la presente invención para su uso como un implante.

Se apreciará que cualquier característica atribuida a un aspecto de la invención es igualmente aplicable a todos y cada uno de los otros aspectos de la invención *mutatis mutandis*.

Breve descripción de las figuras

Las modalidades de la invención se describen además de aquí en adelante con referencia a las figuras acompañantes, en las que:

- 5 La Figura 1 muestra una representación de la articulación de la rodilla.
- La Figura 2 muestra un proceso de descelularización típico para un implante de hueso-menisco medial-hueso.
- La Figura 3 muestra la tinción histoquímica con hematoxilina y eosina para diferentes secciones de menisco fresco y descelularizado.
- 10 La Figura 4 muestra la tinción histoquímica de tetracromo de McNeal modificada de diferentes secciones de hueso incrustado en resina fijado con formalina de muestras de unión frescas y descelularizadas.
- 15 La Figura 5 muestra una serie de ensayos bioquímicos realizados en secciones de menisco y hueso frescos y descelularizados. La Figura 5A muestra los ADN ng/mg de peso en seco, la Figura 5B muestra el porcentaje de peso en seco de colágeno, la Figura 5C muestra el porcentaje de los glucosaminoglucanos (GAG) de peso en seco y la Figura 5D muestra el porcentaje de calcio de peso en seco.
- 20 La Figura 6 muestra el análisis de ADN de GAPDH, β -actina y colágeno I de menisco y hueso frescos y descelularizados.
- La Figura 7 muestra la tinción inmunohistoquímica para el colágeno I para el sitio de unión, la entesis y el hueso de muestras frescas y descelularizadas.
- 25 La Figura 8A muestra un resumen tabulado de una variedad de componentes de la matriz extracelular (colágeno I, colágeno II, colágeno III, colágeno IV, colágeno VI y osteocalcina) para menisco interno y externo fresco y descelularizado, unión y áreas óseas de un trasplante de hueso-menisco medial-hueso. La Figura 8B muestra las regiones del implante de hueso-menisco medial-hueso de las que se tomaron muestras para la tinción histoquímica.
- La Figura 9 muestra el porcentaje de contenido de colágeno desnaturalizado de peso en seco después de la digestión de α -quimotripsina seguida de un ensayo de hidroxiprolina para andamios frescos y descelularizados.
- 30 La Figura 10 muestra la desnaturalización del colágeno de andamios frescos y descelularizados frescos y descelularizados como se evaluó mediante el uso de calorimetría de barrido diferencial.
- 35 Las Figuras 11A y 11B muestran el contenido residual de dodecilsulfato de sodio (SDS) de hueso-menisco-hueso descelularizado. La Figura 11A muestra la concentración de SDS $\mu\text{g}/\text{mg}$ durante el proceso y la Figura 11B muestra la concentración de SDS $\mu\text{g}/\text{mg}$ en el menisco externo, interno, la región de unión, el hueso y el andamio completo.
- La Figura 12 muestra la deformación bajo carga para implantes de hueso-menisco-hueso nativos y descelularizados.
- 40 La Figura 13 muestra la tinción DAPI de tejido porcino osteocondral descelularizado y fresco (Figura 13A) preparado por los métodos de la presente invención (Figura 13B).
- La Figura 14 muestra la tinción DAPI de tejido bovino fresco (Figura 14A) y osteocondral preparado por los métodos de la presente invención (Figura 14B).
- 45 La Figura 15 muestra el contenido de ADN de cartílago fresco y dCELL de porcino (Figura 15A) y bovino (Figura 15B).
- La Figura 16 muestra la tinción con azul alciano de tejidos osteocondrales porcinos frescos (Figura 16A) y dCELL (Figura 16B).
- 50 La Figura 17 muestra la tinción con azul alciano de tejidos osteocondrales bovinos frescos (Figura 17A) y dCELL (Figura 17B).
- 55 La Figura 18 muestra el contenido de GAG de cartílago fresco y dCELL porcino (Figura 18A) y bovino (Figura 18B).
- La Figura 19 muestra el contenido de hidroxiprolina de cartílago fresco y dCELL porcino (Figura 19A) y bovino (Figura 19B).
- 60 La Figura 20 muestra el porcentaje de deformación de cartílago fresco (Figura 20A) y dCELL porcino (Figura 20B) y bovino.
- La Figura 21 muestra el coeficiente de fricción para tapones osteocondrales bovinos, ovinos y porcinos descelularizados y frescos.
- 65

La Figura 22 muestra tapones óseos manchados con Hematoxilina y Eosina, A) Tapón óseo fresco sección 1, B) Tapón óseo fresco sección 20 C) tapón decell 1, sección 1, D) tapón decell 1, sección 20, E) tapón decell 2, sección 1, E) tapón decell 2, sección 20. G) tapón decell 3, sección 1, H) tapón decell 3, sección 20.

5 La Figura 23 muestra la tinción con Dapi de hueso fresco y descelularizado.

La Figura 24 muestra la cantidad de ADN ng/mg de muestras de hueso frescas y descelularizadas (peso en seco).

10 La Figura 25 muestra el ensayo de citotoxicidad del extracto de tapones óseos frescos y descelularizados con células BHK. F1-F3; hueso fresco. Hueso descelularizado D1-D3; + Control positivo DMSO; - Solo células Los datos se expresan como la media [n=3] cps [ensayo de ATP] $\pm$ 95 % de intervalos de confianza.

15 La Figura 26 muestra el ensayo de citotoxicidad del extracto de tapones óseos frescos y descelularizados con células 3T3. F1-F3; hueso fresco. Hueso descelularizado D1-D3; + Control positivo DMSO; - Solo células Los datos se expresan como la media [n=3] cps [ensayo de ATP] $\pm$ 95 % de intervalos de confianza.

20 La Figura 27 muestra la citotoxicidad por contacto con células 3T3. Células 3T3 cultivadas con A) Tapón óseo fresco 1, B) Tapón óseo fresco 2, C) Tapón óseo fresco 3, D) Tapón óseo decell 1, E) Tapón óseo decell 2, F) Tapón óseo decell 3, G) Control de colágeno H) Control positivo de adhesivo, I) Control solo de células

La Figura 28 muestra la citotoxicidad por contacto con células BHK. Células BHK cultivadas con A) Tapón óseo fresco 1, B) Tapón óseo fresco 2, C) Tapón óseo fresco 3, D) Tapón óseo decell 1, E) Tapón óseo decell 2, F) Tapón óseo decell 3, G) Control de colágeno H) Control positivo de adhesivo, I) Control solo de células.

25 La Figura 29 muestra el tapón óseo de control insertado en el cóndilo ovino y escaneado por micro-CT.

La Figura 30 muestra un tapón óseo descelularizado insertado en el cóndilo ovino y escaneado por micro-CT.

30 La Figura 31 muestra el grosor trabecular medio y la separación de las clavijas de control porcino y cóndilos ovinos.

La Figura 32 muestra el grosor trabecular medio y la separación de las clavijas de porcinos y cóndilos ovinos descelularizados. Los datos se presentan como la media (n=6) $\pm$ 95 % de límites de confianza.

35 La Figura 33 muestra el porcentaje de volumen óseo de los tapones óseos porcinos de control y los cóndilos ovinos.

La Figura 34 muestra el porcentaje de volumen óseo de los tapones óseos porcinos de control y los cóndilos ovinos. Los datos se presentan como la media (n=6) $\pm$ 95 % de los límites de confianza.

Descripción detallada

40

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta descripción, las palabras "comprende" y "contiene" y sus variaciones significan "incluye pero no se limita a" y no pretenden excluir (y no excluyen) otros grupos, aditivos, componentes, enteros o etapas. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta descripción, el singular abarca el plural a menos que el contexto lo requiera de cualquier otra manera. En particular, donde se usa el artículo indefinido, la descripción debe entenderse como que contempla la pluralidad así como también la singularidad, a menos que el contexto lo requiera de cualquier otra manera.

45

Los elementos, los enteros, las características, los compuestos, las porciones o grupos químicos descritos junto con un aspecto particular, la modalidad o el ejemplo de la invención deben entenderse como aplicables a cualquier otro aspecto, modalidad o ejemplo descrito en la presente descripción a menos que sean incompatibles con el mismo. Todas las características descritas en esta descripción (que incluyen cualquier reivindicación, resumen y figuras adjuntas), y/o todas las etapas de cualquier método o proceso así descrito, pueden combinarse en cualquier combinación, excepto las combinaciones donde al menos algunas de tales características y/o etapas son mutuamente excluyentes. La invención no se limita a los detalles de cualquiera de las modalidades anteriores. La invención se extiende a cualquier característica novedosa, o a cualquier combinación novedosa de estas, descritas en esta descripción (incluidas cualquiera de las reivindicaciones, resumen y figuras adjuntas), o a cualquier etapa novedosa, o combinación novedosa de estas, de cualquier método o proceso descrito.

50

55

La referencia en la presente descripción a un implante o andamio o matriz de tejido "nativo" o "natural" pretende incluir aloinjerto o tejidos biológicos derivados xenogénicos. Los términos "producto de implante" o "producto de trasplante" o "andamio" o "matriz" son intercambiables y se refieren al material biológico preparado por los métodos de descelularización de la presente invención.

60

La referencia en la presente descripción a un implante compuesto pretende incluir un implante que comprende diferentes materiales/tejidos biológicos naturales, teniendo cada uno diferentes propiedades y funciones.

65

El propio hueso es un material compuesto que tiene características de materia inorgánica fuerte y dura y cierta flexibilidad y se da de la materia orgánica de colágeno y, en combinación con tejido conectivo, los productos de la invención son productos de trasplante multicompuesto.

5 La referencia en la presente descripción a "descelularizado" pretende incluir material biológico que se ha sometido a metodología para eliminar células de modo que el producto final sea sustancialmente acelular, es decir, carece de células, ya sean viables de células no viables. Los términos "descelularizado" y "acelular" son intercambiables. Por sustancialmente descelularizado o acelular, esto incluye entre el 90 % y hasta el 100 % de eliminación de todas las células vivas o viables de todas las partes del producto de trasplante multicompuesto, por lo que los productos de la presente invención están por lo tanto prácticamente desprovistos de células como, por ejemplo, fibrocondrocitos y fibroblastos y tienen un contenido de ADN insignificante, si lo hay, y como tales son los materiales más apropiados para el trasplante subsecuente.

15 Se debe señalar que aunque el documento WO 2008/059244 describe un método de descelularización del tejido blando de menisco, se encontró que no era un método satisfactorio para descelularizar un implante compuesto de hueso-tejido conectivo-hueso. De hecho, los resultados mostraron células completas en la región de entesis y ablandamiento de las uniones óseas.

20 Preparación de tejido hueso-tejido conectivo-hueso

La Figura 1 muestra una representación esquemática de una articulación de rodilla, estando el fémur (1) separado de la tibia (3) por el menisco medial (2). El menisco es una estructura de fibrocartilago con una matriz extracelular muy organizada. El sitio de unión de menisco en la meseta tibial comprende capas de cartilago, entesis y hueso unidos por ligamentos. Se diseccionaron hueso-menisco medial-hueso (BMB) y hueso-tendón rotuliano-hueso (BPTB) de cerdos de seis meses de edad dentro de las 24 h del sacrificio del animal.

30 Los BMB se obtuvieron por disección aguda, separando inicialmente el menisco del tejido conectivo circundante y el plexo capilar perimeniscal seguido de un corte a través de la meseta tibial para obtener bloques de hueso en cada extremo de aproximadamente 10 mm x 10 mm x 15 mm. Una vez eliminado de la rodilla, se eliminó cualquier tejido conectivo restante mediante el uso de disección roma y se lavó en PBS (Oxoid) para eliminar el exceso de sangre. Después, las muestras se almacenaron a -20 °C en papel de filtro humedecido con PBS para uso futuro.

35 De manera similar, se obtuvieron los BPTB porcinos por disección aguda, separando inicialmente el tendón rotuliano del tejido conectivo circundante y la almohadilla de grasa seguido de liberar la rótula y cortar a través de la tibia para liberar la unión tibial más el hueso. Una vez eliminado de la rodilla, se eliminó cualquier tejido conectivo y grasa restantes por disección roma. El bloque de hueso tibial y el hueso rotuliano luego se recortaron y moldearon para proporcionar tapones óseos de aproximadamente 2 cm de ancho por 3 cm de largo. Luego se lavaron en PBS para eliminar el exceso de sangre y se almacenaron a -80 °C en papel de filtro humedecido con PBS.

40 Extracción de clavijas

Se extrajeron clavijas osteocondrales (9 mm de diámetro, 10 mm de profundidad) del cóndilo medial de las rodillas porcinas y de la ranura femoral medial de las rodillas bovinas. Las clavijas se almacenaron congeladas a -20 °C hasta que se requirieron.

45 Preparación de tejidos/histología

50 Los especímenes de tejido se fijaron en formalina tamponada neutra al 10 % (v/v) por 48 horas y luego se deshidrataron e incrustaron en cera de parafina. Se tomaron secciones en series de 6 µm de grosor con 1 de cada 10 secciones usadas. Se usó tinción estándar con hematoxilina y eosina (H&E) (Bios Europe Ltd, Skelmersdale, Reino Unido) para evaluar la histioarquitectura de tejido.

Preparación de especímenes de Inmunohistoquímica

55 Los especímenes de tejido se fijaron en fijador de zinc por 16 horas y luego se deshidrataron y se incrustaron en cera de parafina. Las secciones de hueso se fijaron en fijador de zinc por 16 horas y luego se descalcificaron mediante el uso de una solución de EDTA al 12,5 % (w/v), antes de la deshidratación y la incrustación en parafina. Se tomaron secciones en series de 6 µm de grosor con 1 de cada 10 secciones usadas. Luego, las secciones se desparafinaron mediante el uso de xileno y se rehidrataron en una serie de etanol graduado. La recuperación del antígeno se llevó a cabo mediante el uso de proteinasa K (20 µg/mL, Dako) a temperatura ambiente por 20 minutos. La actividad de la peroxidasa se bloqueó sumergiendo las secciones en peróxido de hidrógeno al 3 % (v/v) en agua destilada a temperatura ambiente por 10 minutos. La actividad de la enzima endógena se bloqueó mediante el uso del agente bloqueante incluido en el sistema de detección Ultra Vision One (Thermo Fisher Scientific).

65 Las secciones se incubaron con los siguientes anticuerpos por 1 hora a temperatura ambiente: Anti-colágeno I (MAB3391, Millipore, 1: 100), anti-colágeno II (MAB1330, Millipore, 1:50), anti-colágeno III (ab7778, Abcam, 1: 100), anti-colágeno IV

(M 0785, Dako, 1:50), anti-colágeno VI (MAB3303, Millipore, 1:50), anti-osteocalcina (0400-0040, AbD Serotec, 1: 100) y anti-alfa-gal (ALX-801-090, Enzo Life Sciences, 1: 3). Los anticuerpos se visualizaron mediante el uso del complejo de polímero-peroxidasa de rábano picante proporcionado por el estuche (Sistema de Detección UltraVision One, Thermo Fisher Scientific) utilizando 3,3'-diaminobencidina (DAB) como un sustrato para desarrollar un color marrón.

5

Ensayo de hidroxiprolina.

10

Antes de realizar el ensayo de hidroxiprolina, las muestras se liofilizaron a un peso constante antes de hidrolizarlas por incubación con 6M de ácido clorhídrico (HCL) por 4 h a 120 °C y neutralizarlas mediante el uso de hidróxido de sodio (NaOH). El procedimiento adoptado se basó en el método descrito por Edwards y O'Brien. Se prepararon soluciones de calibrador estándar mediante el uso de trans-4-hidroxi-L-prolina (Sigma). Se añadió solución de prueba (50 µl) a los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo plano a la que se añadieron 100 µl de solución oxidante (cloramina T hidratada; Sigma) y se dejó por 5 min con agitación suave. Luego, se añadió reactivo de Ehrlich (100 µl) a cada pocillo. Luego, la placa se cubrió y se incubó a 60 °C en un baño de agua por 45 min antes de leer la absorbancia a 570 nm.

15

Luego, se determinó la concentración de hidroxiprolina por interpolación de una curva estándar de hidroxiprolina.

El ensayo de colágeno desnaturalizado sigue el tratamiento con alfa quimotripsina

20

Las muestras de los tejidos se incubaron con α -quimotripsina (5 mg/mL, Sigma-Aldrich) a 30 °C por 24 horas para digerir el colágeno desnaturalizado. Luego, se centrifugaron los digeridos a 600 g por diez minutos y se llevaron a cabo ensayos de hidroxiprolina (como antes) en el sobrenadante.

Ensayo de azúcar sulfatado.

25

Antes de realizar el ensayo de azúcar sulfatado, las muestras (n = 3) se liofilizaron a un peso constante antes de digerir enzimáticamente el tejido en tampón de papaína (1 mg.mL⁻¹ de papaína, Sigma, en PBS a pH 6,0 con 5mM de cisteína-HCl, Sigma y 5 mM de Na₂EDTA, VWR) por 48 h a 60 °C. El método se adaptó de Farndale y otros. [30]. Brevemente, se prepararon soluciones de calibrador estándar mediante el uso de sulfato de condroitina (Sigma). Se añadieron solución estándar o de prueba (40 µl) a 250 µl de solución de azul de 1,9-dimetileno en pocillos de placas de 96 pocillos de fondo plano. Luego, se leyó la absorbancia a 525 nm después de 1 min. La concentración resultante de azúcares sulfatados, representativa de glucosaminoglucanos (GAG) se determinó luego por interpolación de la curva estándar.

30

Extracción y análisis de la presencia de ADNg

35

El ADN genómico (ADNg) se extrajo mediante el uso de un estuche de aislamiento de ADN para tejidos (Qiagen). Brevemente, se digirieron 25 mg de tejido de menisco porcino fresco y 100 mg de descelularizado mediante el uso de una solución de Proteinasa K (n=3). Después de esto, los digeridos de tejido de menisco se procesaron centrifugando a través del estuche proporcionado de columnas de minicentrifugado para capturar y eluir el ADN. Se digirió hueso fresco y descelularizado mediante el uso de una solución de proteinasa K que contiene también EDTA al 12,5 % (w/v) y SDS al 1 % a 56 °C durante la noche. Después, las muestras se procesaron como para el tejido de menisco. El ADN se cuantificó midiendo la absorbancia a 260-280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop (Labtech Int, Ringmer, Reino Unido).

40

45

Cualitativamente, la presencia de ADN funcional se analizó por amplificación de genes de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), colágeno I y β -actina mediante el uso de PCR. Las muestras se prepararon para PCR mezclando 25 µL de mezcla maestra (Fermentas Life Sciences, Reino Unido) con 22 µL de agua libre de nucleasas, 1 µL de cada uno de los cebadores hacia adelante y hacia atrás (Sigma) y 1 µL de ADN de muestra extraído como se describió anteriormente. Las muestras se mezclaron y se colocaron en una máquina de PCR y una vez que se completó el programa, los genes amplificados se visualizaron mediante el uso de un sistema E-gel PowerBase (Invitrogen, Paisley, Reino Unido). Se insertó un E-gel de agarosa seco al 4 % (w/v) (Invitrogen) en la base antes de la adición de las muestras. Se prepararon muestras resuspendidas (13,5 µL) añadiendo tampón de carga (1,5 µL, Invitrogen) para facilitar la carga de la muestra. Luego, se cargó el volumen total en carriles individuales del E-gel y entonces se sometió a electroforesis. Se corrió en paralelo una estructura de ADN de 1 kb (Fermentas Life Sciences, Reino Unido) para estimar el tamaño del ADN aislado. La tinción con SYBR SAFE (Invitrogen) permitió la inspección visual en un sistema Kodak Gel Logic 1500 (Compañía Eastman Kodak, Harrow, Reino Unido).

50

Preparación de muestras de hueso

60

Las muestras de hueso se fijaron en NBF al 10 % (v/v) y se deshidrataron mediante el uso de una serie de etanol graduado hasta 100 % de etanol. Después, las muestras se infiltraron mediante el uso de resina Technovit 7200 VLC (Exact) en una serie de resina graduada/etanol hasta 100 % de resina y se incrustaron en bloques de resina para seccionarlos mediante el uso de una sierra para huesos (Exact). Las secciones se obtuvieron cortando rodajas de 400 µm de los bloques mediante el uso de una sierra para huesos y triturando hasta un grosor final de 20 µm.

65

Tinción de tetracromo de McNeal modificado

Las secciones incrustadas en resina se sumergieron en etanol al 50 % (v/v) por diez minutos, se enjuagaron en agua destilada y luego se sumergieron en ácido fórmico al 0,1 % (v/v) por diez minutos para exponer la sección. Luego, los portaobjetos se lavaron tres veces mediante el uso de agua destilada y se sumergieron en Tetracromo de McNeal modificado (cloruro de azul de metileno al 0,1 % (w/v), eosinato de azul A al 0,16 % (w/v), violeta de metilo al 0,02 % (w/v), azul de toluidina al 0,05 % (w/v) por cinco minutos. Luego, las secciones se enjuagaron en agua destilada y se sumergieron en fucsina básica al 0,1 % (w/v) por 30 segundos, seguido por un enjuague final en agua destilada.

Calorimetría diferencial de barrido

10 Se tomaron muestras (n = 3) de BMB nativa y descelularizada (-10 mg) de las regiones interna, externa, de unión, entesis y ósea y se deshidrataron en una serie de etanol graduado (0, 20, 40, 60, 80 y 100 %). Luego, las muestras se secaron a temperatura ambiente al vacío por 30 minutos para eliminar el etanol y se calentaron a 10 °C/min hasta 200 °C para obtener las temperaturas de transición térmica.

15 Prueba de indentación

Se tomaron muestras cilíndricas de 7 mm de diámetro (n = 5) de la región central del menisco nativo y descelularizado. Se tomó una rodaja de 1 mm de grosor del centro del cilindro, se cargó mediante el uso de un indentador plano de 2 mm en el extremo de un eje de aluminio (23 g) de un equipo de indentación construido en el laboratorio, y el desplazamiento se midió durante una hora mediante el uso de un transformador diferencial variable lineal (LVDT). Se realizó una regresión lineal en las mediciones del LVDT para convertir la tensión en desplazamiento.

25 El tejido conectivo compuesto y los reemplazos óseos de la presente invención se regularían como un dispositivo médico de Clase III, proporcionando ventajosamente de esta manera una solución regenerativa de bajo costo sin cambios en las prácticas quirúrgicas actuales, y el beneficio de un tiempo reducido para el beneficio del paciente en comparación con otros enfoques regenerativos de la medicina.

Ejemplo 1

30 La Figura 2 muestra un proceso de descelularización típico para un implante de hueso-tejido conectivo-hueso, en este caso la muestra es un implante de hueso-menisco medial-hueso (BMB). El proceso puede tardar hasta seis semanas en completarse desde una muestra nueva (4) hasta una muestra descelularizada (5). El material de trasplante comprende cualquiera de las porciones de hueso en los extremos (B) cada porción de hueso se une a una región de unión (A) interconectada por un menisco (M). El hueso-menisco medial-hueso se diseccionó de cerdos de seis meses de edad antes de someterlo a un proceso de descelularización. La muestra de BMB se sometió a una congelación a -20 °C sobre papel humedecido con PBS por aproximadamente 3 horas y luego se descongeló a 40-45 °C por 1 hora por tres ciclos. Luego, los bloques de hueso se limpiaron con un irrigador que expulsa agua o PBS a presión a temperatura ambiente mediante el uso de aproximadamente 300 mL de fluido por bloque de hueso. El hueso fresco comprende sangre y células de la médula ósea y es deseable que estos se purguen de los tapones óseos. Luego, los fascículos en la región de la entesis se separaron sin cortar ninguna de las fibras mediante el uso de un bisturí, después de lo cual las muestras se sometieron a una congelación/descongelación adicional en una solución hipotónica que comprende 10 mM de solución de TRIS aproximadamente a pH 8,0 que incluye aproximadamente 10 KIU/mL de aprotinina. La congelación se llevó a cabo a -20 °C por aproximadamente 3 horas y la descongelación a 40-45 °C por aproximadamente 1 hora en tres ciclos. Luego, las muestras se lavaron en tampón hipotónico de 10 mM de TRIS más aprotinina a 40-45 °C seguido por lavado en tampón hipotónico más aprotinina con SDS al 0,1 % (w/v) a 40-45 °C. El tampón hipotónico/tampón hipotónico más lavados con SDS se repitieron dos veces. Después de esto, las muestras se lavaron en PBS a pH 7,2-7,4 con aprotinina por 72 horas en seis lavados de 12 horas y luego se sometieron a un tratamiento con nucleasa que comprende 50 mM de TRIS, 10 mM de MgCl₂ y ARNasa y ADNasa a 1 y 50 U/mL respectivamente a pH 7,5-7,7 a 37 ± 1 °C, 80 rpm por 3 horas durante tres ciclos. Se realizó un lavado adicional con PBS a pH 7,2-7,4 que contiene 10 KIU/mL de aprotinina a 4 °C, 320 rpm por 12-16 horas en un solo ciclo seguido por una solución hipertónica de 50 mM de TRIS, 1,5 M de NaCl a pH 7,5-7,7 por 24 horas a 40-45 °C. Esto seguido después, por un lavado adicional con PBS y una desinfección mediante, por ejemplo, un tratamiento con ácido peracético (0,1 % v/v a 27 °C, 320 rpm por 3 horas). Finalmente, se realizan lavados finales con PBS prolongados adicionales a 160 rpm, luego las muestras pueden congelarse en papel humedecido con PBS a aproximadamente -20 °C para su almacenamiento.

55 El protocolo para BPTB fue similar al descrito para BMB. El BPTB se descongeló a temperatura ambiente. Luego, los bloques de hueso se limpiaron con un irrigador que expulsa agua o PBS a presión a temperatura ambiente mediante el uso de aproximadamente 300 mL de fluido por bloque de hueso. Los BPTB se volvieron a congelar en tampón hipotónico por 16 horas y se descongelaron. Esto se repitió. Una vez descongelados a temperatura ambiente, los fascículos en la región de la entesis se separaron sin cortar ninguna de las fibras mediante el uso de un bisturí, después de lo cual se incubó el BPTB en tampón hipotónico con aprotinina a 40-45 °C por 23-25 horas. Luego, los BPTB se incubaron en tampón hipotónico que contenía SDS al 0,1 % (v/v) y aprotinina por 23-25 horas a 40-45 °C. Este proceso se repitió. Después de esto, las muestras se lavaron en PBS a pH 7,2-7,4 con aprotinina y luego se sometieron a un tratamiento con nucleasa que comprendía 50 mM de TRIS, 10 mM de MgCl₂ y ARNasa y ADNasa a 1 y 50 U/mL respectivamente a pH 7,5-7,7 a 37 ± 1 °C, 80 rpm durante 3 horas por tres ciclos. Se realizó un lavado adicional con PBS a pH 7,2-7,4 que contenía 10 KIU/mL de aprotinina a 4 °C a 320 rpm por 12-16 horas en un solo ciclo seguido de una solución hipertónica de 50 mM

de TRIS, 1,5 M de NaCl a pH 7,5-7,7 por 24 horas a 40-45 °C. Esto seguido por un lavado adicional con PBS y una desinfección mediante, por ejemplo, un tratamiento con ácido peracético (0,1 % v/v a 27 °C, 320 rpm por 3 horas). Finalmente, se realizan lavados finales con PBS prolongados adicionales a 160 rpm, luego las muestras pueden congelarse luego en papel humedecido con PBS a aproximadamente -80 °C para su almacenamiento.

5

Ejemplo 2

10

La tinción histoquímica del menisco (M) incrustado en parafina fijado con formalina por hematoxilina (que mancha los núcleos celulares de azul/negro) y eosina (que mancha el citoplasma y el tejido conectivo de rosa) muestra que el método de descelularización de la presente invención es capaz de eliminar células de ambas porciones internas y externas del tejido de menisco (Figura 3).

15

De manera similar, se llevó a cabo mediante el uso de una tinción histoquímica de tetracromo de McNeal modificada de hueso incrustado en resina fijado con formalina (B). El tetracromo de McNeal usa: azul de toluidina para manchar el cartílago (azul/violeta); eosina para manchar el citoplasma y el tejido conectivo (rosa); azul de metileno que mancha el ADN (azul) y; fucsina básica que mancha el hueso (rojo/morado). Los resultados mostraron que mediante el uso de los métodos de la presente invención, el sitio de unión y el tejido óseo se descelularizaron en comparación con el tejido fresco (Figura 4).

20

Ejemplo 3

25

Se realizaron una serie de ensayos bioquímicos en menisco fresco (lado izquierdo de cada barra) y descelularizado (lado derecho de cada barra), unión y tejido óseo preparado de acuerdo con los métodos de la presente invención. La Figura 5A muestra el contenido de ADN ng/mg de peso en seco de menisco y hueso tanto fresco como descelularizado, para las muestras descelularizadas hubo una reducción altamente significativa ($p < 0,01$) en el contenido de ADN. Este resultado, tomado junto con el análisis de ADN por PCR de los genes 'constitutivo' asociados con la funcionalidad del menisco y el hueso (GAPDH, β actina y colágeno I) donde se observó una ausencia de ADN funcional en los andamios descelularizados, indica que mediante el uso de los métodos de la presente invención los BMB de la presente invención se descelularizan efectivamente por completo.

30

Ejemplo 4

35

Los ensayos bioquímicos para el porcentaje de peso en seco de colágeno (Figura 5B), glucosaminoglucanos (Figura 5C) y calcio (Figura 5D) de tejido fresco y descelularizado mostraron que, para el colágeno, hubo un aumento significativo ($p < 0,05$) de colágeno en menisco descelularizado y un aumento menos significativo ($p < 0,05$) de colágeno en hueso descelularizado. El aumento en el porcentaje de contenido de colágeno del material descelularizado probablemente se deba a la eliminación de otro material.

40

El porcentaje de peso en seco de glucosaminoglucanos en las áreas internas y externas del menisco y el tejido de unión mostró que en todos los casos había una disminución altamente significativa ($p < 0,01$) en el tejido descelularizado en comparación con el tejido fresco. Además, se observó que hay una mayor concentración de glucosaminoglucanos en la región similar a un cartílago del menisco. Sin embargo, los resultados muestran que los métodos de la presente invención son efectivos para retirar glucosaminoglucanos de todas las áreas de las muestras de tejido. Hubo una pequeña pero significativa disminución en el porcentaje de calcio en peso en seco (Figura 5D).

45

Ejemplo 5

50

Se llevó a cabo un estudio sobre la inmunohistoquímica del sitio de unión (Figura 7). Las secciones de las áreas de unión, entesis y hueso se mancharon mediante el uso de anticuerpos para detectar el colágeno I. La Figura 8B muestra una tabla resumen de la tinción inmunohistoquímica de las secciones del menisco (M) interno (7), externo (6), unión (A) y hueso (B) tanto de material fresco como descelularizado (Figura 8A). Los componentes de la matriz extracelular (MEC) evaluados fueron colágeno I, colágeno II, colágeno III, colágeno IV, colágeno VI y osteocalcina y puntuaron (+++) como muy fuerte, (++) fuerte, (+) positivo, (+/-) menos positivo y (-) negativo. Los resultados mostraron que para el colágeno I, el colágeno II y la osteocalcina no hubo diferencia en las puntuaciones para todas las secciones de tejido en las muestras frescas o descelularizadas. Hubo una ligera disminución de colágeno III en el tejido de unión descelularizado en comparación con el tejido fresco, todos los demás tejidos mostraron paridad en la resistencia de tinción.

55

60

También hubo una reducción del colágeno VI en el tejido de menisco interno (7), externo (6) y el tejido de unión (A) del material descelularizado en comparación con el material fresco. No hubo diferencia en el colágeno VI entre el hueso fresco y descelularizado. Sin embargo, el colágeno VI se redujo en el menisco interno y externo descelularizado y en el tejido de unión en comparación con el tejido fresco, no se observó diferencia apreciable en el hueso fresco o tratado para el colágeno VI. El tejido descelularizado (todos los tipos) mostró una ausencia de colágeno IV en comparación con el tejido fresco. Estos datos indican que, aparte del colágeno IV interno descelularizado, la unión del menisco externo y el hueso tienen el mismo o similar contenido de colágeno y osteocalcina en comparación con los equivalentes del tejido fresco.

65

Ejemplo 6

Se llevaron a cabo estudios para evaluar el grado de desnaturalización del colágeno durante el proceso de descelularización de la presente invención. Se evaluaron el menisco fresco y descelularizado para el porcentaje de contenido de colágeno desnaturalizado de peso en seco después de la digestión de α -quimotripsina seguida de un ensayo de hidroxiprolina. Los resultados mostraron que el colágeno desnaturalizado fue significativamente mayor ($p > 0,05$) en el tejido tratado en comparación con el tejido fresco (Figura 9). Un ensayo adicional mediante el uso de calorimetría de barrido diferencial como medida de la capacidad calorífica para material de menisco tanto fresco como descelularizado (Figura 10) confirmó que el colágeno no se desnaturalizó en un andamio descelularizado.

10 Ejemplo 7

El contenido de SDS de BMB descelularizado se evaluó mediante el uso de C^{14} ensayo de SDS (Figuras 11A y 11B). El límite de citotoxicidad de SDS citado en la literatura es de alrededor de 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido. Los resultados mostraron que en las muestras la concentración de SDS de $\mu\text{g}/\text{mg}$ estaba mucho más abajo que los niveles tóxicos, lo que indica que los BMB producidos por los métodos de la presente invención no son tóxicos.

15 Ejemplo 8

La deformación bajo carga para BMB nativo y descelularizado se evaluó mediante el uso de una prueba de indentación donde las muestras ($n = 5$) tomadas de la porción central del menisco fueron cargadas mediante el uso de un indentador plano de 2 mm por una hora y se midió el desplazamiento (Figura 12). Estos resultados luego se introdujeron en un modelo de elementos finitos para determinar el módulo de Young y la permeabilidad de las muestras. Se obtuvo un módulo de Young de 0,178 MPa para el menisco descelularizado en comparación con 0,205 MPa para el menisco nativo, lo que sugiere que el menisco nativo no era significativamente más rígido que el menisco descelularizado ($p > 0,05$).

En conclusión, los métodos de la presente invención se han desarrollado con éxito para implantes/andamios de hueso-tejido conectivo-hueso descelularizado. Además, tales andamios se han caracterizado histológica, estructural e inmunohistológicamente para tener una equivalencia comparable del tejido natural/nativo.

30 Ejemplo 9

La tinción DAPI de tejido osteocondral fresco (Figura 13A) y porcino preparado por los métodos de la presente invención (Figura 13B) y tejido osteocondral bovino y fresco (Figura 14A) preparado por los métodos de la presente invención (Figura 14B) resultó en núcleos celulares que están presente en el tejido fresco, pero una eliminación completa de los núcleos del cartílago y del hueso subcondral después de la descelularización. El contenido de ADN de cartílago fresco y descelularizado porcino (Figura 15A) y bovino (Figura 15B), expresado como la media ($n=3$) $\pm$ 95 % de intervalos de confianza, * significativo, $p<0,05$ se muestra en los gráficos de barras. La Figura 15A muestra una reducción del 98,2 % en el ADN del cartílago porcino después de dCELL y la Figura 15B una reducción del 4,2 % en el ADN del cartílago bovino. El contenido de ADN del cartílago descelularizado (dCELL) tanto porcino como bovino cae por debajo de 50 $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ por peso de prueba de tejido, por lo que ambos andamios están dentro de los criterios especificados para tejido descelularizado establecido por Crapo y otros. (2011).

Ejemplo 10

La tinción con azul alcian de tejidos osteocondrales porcinos frescos (Figura 16A) y dCELL (Figura 16B) resultó en que el tejido fresco muestra una tinción intensa para proteoglicanos sulfatados en el tejido porcino fresco, especialmente en la zona media del cartílago. La intensidad de la tinción se reduce en el tejido porcino dCELL (Figura 16B), lo que sugiere la pérdida de los GAG durante el proceso de descelularización. Se observa la misma reducción de la tinción con azul alcian con tejidos osteocondrales bovinos frescos (Figura 17A) y dCELL (Figura 17B), lo que sugiere nuevamente una gran pérdida de los GAG durante el proceso de descelularización. La Figura 18 muestra el contenido de GAG de cartílago fresco y dCELL porcino (Figura 18A) y bovino (Figura 18B). Los datos se expresan como la media (Fresco $n=5$, dCELL $n=3$) $\pm$ 95 % de intervalos de confianza. * significativo, $p<0,05$. La Figura 18A muestra una reducción del 60,3 % en el contenido de GAG del cartílago porcino después de la descelularización, mientras que el cartílago bovino muestra una pérdida de GAG casi completa con una reducción del 99 % después de la descelularización (Figura 18B).

La Figura 19 muestra el contenido de hidroxiprolina de cartílago fresco y dCELL porcino (Figura 19A) y bovino (Figura 19B). Los datos se expresan como la media (Fresco $n=5$, dCELL $n=3$) $\pm$ 95 % de intervalos de confianza. * significativo, $p<0,05$. La Figura 19 muestra un aumento significativo en el contenido de hidroxiprolina del cartílago tanto porcino como bovino después de la descelularización. El contenido de hidroxiprolina se expresa como una proporción del peso en seco del tejido. El proceso dCELL elimina las células y otros componentes estructurales (por ejemplo, los GAG) del cartílago, por lo tanto, el colágeno constituirá una mayor proporción del peso en seco del tejido.

Ejemplo 11

Se llevaron a cabo pruebas de compresión mediante el uso de un indentador. Los tapones osteocondrales (frescos $n=5$, dCELL $n=3$) se comprimieron en un equipo de indentación especialmente construido mediante el uso de un indentador

hemisférico de acero inoxidable de 3 mm de diámetro bajo una carga de 0,8 N. Los tapones se sumergieron en PBS durante la prueba para mantener la hidratación del cartílago. La deformación del cartílago se midió a una frecuencia de muestreo de 5 Hz durante una hora, después de lo cual todas las muestras habían alcanzado el equilibrio. Después de la compresión, las clavijas se rehidrataron completamente en PBS antes de medir el grosor del cartílago. Se usó un indentador de aguja para penetrar el cartílago, bajando a una velocidad de 4,5 mm.min⁻¹; la resistencia al movimiento se midió mediante el uso de una célula de carga de 500 N [Instron 3365]. Se registró un aumento en la carga cuando la aguja entró en contacto por primera vez con la superficie del cartílago y un segundo aumento al entrar en el hueso, la distancia entre estos dos cambios en la carga se tomó como el grosor del cartílago. La deformación del cartílago se normalizó al grosor para dar un porcentaje de deformación por cada clavija. La Figura 20 muestra el porcentaje de deformación de cartílago fresco (Figura 20A) y dCELL porcino (Figura 20B) y bovino. Los datos se expresan como la media (Fresco n=5, dCELL n=3) ± 95 % de intervalos de confianza. * significativo, p<0,05. La Figura 20 muestra un aumento significativo en el porcentaje de deformación del cartílago tanto porcino como bovino después de la descelularización. Esto se debe a la pérdida de los GAG que actúan para contener el fluido en la estructura del cartílago y resistir la compresión de acuerdo con el modelo bifásico de lubricación del cartílago.

15 Ejemplo 12

Los injertos osteocondrales se han usado para reparar multitudes de cartílago y, a su vez, restaurar la función articular. Sin embargo, existe un conocimiento limitado del efecto que estos injertos tienen sobre la biotribología local de la articulación y sus interacciones con el entorno del tejido del huésped. Se postula que después de la implantación de un injerto osteocondral puede cambiar la función biotribológica y biomecánica del sistema articular natural que puede conducir a la degradación y desgaste de la superficie de soporte opuesta, los injertos osteocondrales o el cartílago adyacente a los injertos. El objetivo de este estudio fue establecer si los aloinjertos osteocondrales y el daño del cartílago tenían un efecto sobre la biotribología local postimplante, en un modelo tribológico simple de la articulación natural.

Se usó un simulador tribológico de clavija sobre placa multidireccional de geometría simple para determinar el coeficiente de fricción y degradación de las placas de hueso y cartílago bovino (45 mm x 19 mm x 7 mm) deslizándose contra las clavijas de hueso y cartílago bovino de 9 mm de diámetro. Se extrajeron clavijas y placas osteocondrales de la ranura de la rótula de vacas esqueléticamente maduras de 18-24 meses de edad. Las placas y clavijas osteocondrales intactas (n=5) representaron el control negativo. Se usaron como controles positivos (n=5) las clavijas de acero inoxidable insertadas en defectos de 6 mm de diámetro en la placa.

- Grupos de prueba:
- Injertos osteocondrales de aloinjerto bovino implantados en defectos de 6 mm en las placas osteocondrales bovinas (n=5)
 - Injertos osteocondrales de xenoinjerto ovino implantados en defectos de 6 mm en las placas osteocondrales bovinas (n=5)
 - Injertos osteocondrales de xenoinjerto porcino implantados en defectos de 6 mm en las placas osteocondrales bovinas (n=5)
 - Injertos osteocondrales de aloinjerto bovino descelularizado implantados en defectos de 6 mm en las placas osteocondrales bovinas (n=5)
 - Injertos osteocondrales de xenoinjerto ovino descelularizado implantados en defectos de 6 mm en las placas osteocondrales bovinas (n=5)
 - Injertos osteocondrales de xenoinjerto porcino descelularizado implantados en defectos de 6 mm en las placas osteocondrales bovinas (n=5)

Las pruebas se realizaron en solución salina tamponada con fosfato más suero de ternero recién nacido al 25 % (v/v). Se usó una longitud de carrera de 20 mm con una velocidad de 4 mm/s. Se aplicó una carga de 160 N para representar una presión de contacto fisiológica de 2,5 MPa por un período de 6 h. El movimiento del simulador produjo una tensión dependiente del tiempo en la placa y el injerto osteocondral.

Los resultados se muestran en la Figura (21). El control negativo (n=5) exhibió un coeficiente de fricción por debajo de 0,2 durante el período de prueba de 6 h (Figura 27). El control positivo (n=5) mostró un coeficiente de fricción significativamente mayor (p<0,05 ANOVA) en comparación con el control negativo. Los aloinjertos bovinos (n=5) mostraron un coeficiente de fricción significativamente mayor (p<0,05 ANOVA) en comparación con el control negativo. Cuando se insertó un tapón ovino en el centro de una placa bovina, la fricción aumentó significativamente en comparación con las otras pruebas. Sin embargo, la inserción de un tapón porcino en el centro de las placas mostró que la fricción no era diferente a la del control negativo. Esto sugirió que las propiedades mecánicas del tejido porcino pueden haber contribuido al bajo coeficiente de fricción. El coeficiente de fricción para el tapón bovino, ovino y porcino descelularizado (insertado en las placas) fue similar al del control negativo y al xenoinjerto porcino. Esto sugirió que las propiedades mecánicas de los tejidos descelularizados eran menores que las del aloinjerto y el tejido del xenoinjerto ovino y, por lo tanto, contribuyó a los bajos valores de fricción.

65 Ejemplo 13

Los tapones óseos se mancharon con Hematoxilina y Eosina, A) Tapón óseo fresco sección 1, B) Tapón óseo fresco sección 20 C) tapón de decell 1, sección 1, D) tapón de decell 1, sección 20, E) tapón de decell 2, sección 1, E) tapón de decell 2, sección 20. G) tapón decell 3, sección 1, H) tapón decell 3, sección 20. La tinción H&E mostró la matriz manchada de rosa y los núcleos celulares manchados de azul. Las imágenes muestran que el proceso de descelularización fue exitoso en retirar los núcleos del hueso y de la cavidad de la médula ósea (C-H) cuando se compara con el hueso fresco (A-B). Esto fue consistente a través de todos los tapones, como se muestra por las secciones tomadas de la sección intermedia cortada (sección 1) y el centro del bloque (sección 20) del hueso. Las imágenes C y D muestran que las células se eliminaron del área subcondral del hueso. La Figura 23 muestra la tinción con Dapi de hueso fresco y descelularizado. Las imágenes [parte superior del panel] comienzan desde el centro del tapón [borde cortado] y se insertan en el bloque. El hueso descelularizado estaba claramente libre de células por completo, como se demuestra por la falta de núcleos, sin embargo, parecía haber una pequeña cantidad de restos presentes dentro de la cavidad de la médula ósea. Esto no cambió a lo largo de los diferentes niveles de secciones.

La cantidad de ADN ng/mg de las muestras de hueso frescas y descelularizadas (peso en seco) se muestra en la Figura 24, lo que indica una reducción sustancial en el hueso descelularizado en comparación con las muestras frescas. La Figura 25 muestra el ensayo de citotoxicidad del extracto de tapones óseos frescos y descelularizados con células BHK. F1-F3; hueso fresco. Hueso descelularizado D1-D3; + Control positivo DMSO; - Solo células. Los datos se expresan como la media [n=3] cps [ensayo de ATP] $\pm$ 95 % de intervalos de confianza. La Figura 26 muestra el ensayo de citotoxicidad del extracto de tapones óseos frescos y descelularizados con células 3T3. La citotoxicidad del extracto se realizó con tapones óseos tanto frescos como descelularizados para determinar su biocompatibilidad. El control positivo [DMSO] mostró una marcada reducción en la viabilidad celular de tanto las células BHK (Figura 25) como las 3T3 (Figura 26) a las 48 h. Los extractos de los tapones óseos descelularizados no tuvieron un efecto significativo sobre el crecimiento de células BHK o 3T3 en comparación con el control negativo [-; sin extracto]. Los extractos de los tapones óseos frescos no tuvieron un efecto significativo sobre el crecimiento de las células BHK, pero redujeron significativamente el crecimiento de las células 3T3 durante un período de 48 horas.

Ejemplo 14

Se usó un ensayo de citotoxicidad por contacto para determinar la biocompatibilidad del hueso. Se cultivaron pequeñas muestras de hueso en contacto con células de riñón de cría de hámster (BHK) y las células 3T3 murinas durante 48 horas. Se usó colágeno tipo 1 como control negativo [sin inhibición por contacto] y adhesivo de contacto de cianoacrilato como control positivo [inhibición por contacto]. Las muestras se examinaron mediante el uso de microscopía de contraste de fase antes de fijarse con NBF y luego mancharse con solución de Giemsa, lavadas y vistas mediante el uso de microscopía óptica.

Las Muestras de citotoxicidad de extracto de hueso se maceraron y se incubaron con agitación y medio DMEM por 72 horas a 37 °C. La esterilidad del medio se comprobó rayando sobre varias placas de agar. Se sembraron células BHK y 3T3 en placas de 96 pocillos y se cultivaron por 24 horas, antes de la adición del medio de extracto. Se usó DMSO como control positivo [crecimiento celular reducido] y medio de cultivo estándar como un control negativo [crecimiento celular normal]. El medio de extracto se cultivó por 48 horas más antes de analizar la viabilidad celular mediante el uso del ensayo ligero ATP y leyendo la luminiscencia mediante el uso de un lector de luminiscencia de Conteo-Superior. Los resultados se analizaron mediante el uso de una almohadilla gráfica.

La Figura 27 muestra la citotoxicidad por contacto con células 3T3 y la Figura 28 muestra la citotoxicidad por contacto con células BHK. Células 3T3/BHK cultivadas con A) Tapón óseo fresco 1, B) Tapón óseo fresco 2, C) Tapón óseo fresco 3, D) Tapón óseo decell 1, E) Tapón óseo decell 2, F) Tapón óseo decell 3, G) Control de colágeno H) Control positivo de adhesivo, I) Control solo de células. Las imágenes (microscopía de contraste de fase) en las Figuras (27) y (28) muestran que ambos tipos de células [BHK y 3T3] fueron inhibidos por contacto por el control positivo de adhesivo de cianoacrilato pero crecieron hasta estar en contacto con el control negativo [Colágeno]. Ambos tipos de células [BHK y 3T3] crecieron hasta las muestras de hueso descelularizado sin ninguna inhibición. Algo de citotoxicidad fue visible en las muestras frescas con ambos tipos de células, lo que puede haber sido como un resultado de la necrosis del hueso/ médula ósea. Los datos en general mostraron que los tapones óseos descelularizados eran biocompatibles.

Ejemplo 14

Se estudió la implantación en cóndilos de oveja [in vitro] y análisis micro-CT. Se diseccionaron tres patas traseras de ovino Suffolk (1 año de edad) para exponer los cóndilos. En el lado lateral de cada cóndilo ovino se perforaron dos orificios de 6 mm de diámetro. Estos orificios representaron los defectos en los que se insertaron los tapones óseos porcino [N=6] en congruencia. Los fémures ovinos se escanearon en un Xtreme microCT a una resolución estándar.

Se usó un probador de compresión instron para determinar la fuerza requerida para empujar fuera los especímenes de hueso porcino de control y descelularizado de los cóndilos ovinos. Los cóndilos se separaron cortando el centro de la tróclea y el eje femoral. El eje femoral se cementó en un dispositivo hecho a medida (mediante el uso de PMMA), dejando los cóndilos expuestos antes de colocarlos en el Instron. Se usó un indentador de 5,5 mm para empujar los tapones óseos a una velocidad de 1 mm/min

Tabla 1 Fuerza requerida inicial para empujar los tapones óseos de control y descelularizados fuera de los cóndilos ovinos

	Tipo de tapón óseo	Carga (N)	Media $\pm$ 95 % de CL	Extensión (mm)	Media $\pm$ 95 % de CL
5	Porcino de control (1)	18,57	34,58 $\pm$ 15,63	0,79	1,31 $\pm$ 0,39
	Porcino de control (2)	34,47		1,60	
10	Porcino de control (3)	25,63		1,25	
	Porcino de control (4)	46,88		1,73	
	Porcino de control (5)	24,56		0,99	
15	Porcino de control (6)	57,40		1,51	
	Porcino decell (1)	8,80	11,73 $\pm$ 7,55	3,00	3,13 $\pm$ 0,12
	Porcino decell (2)	8,86		3,18	
	Porcino decell (3)	6,95		3,28	
20	Porcino decell (4)	25,62		3,15	
	Porcino decell (5)	6,85		3,20	
	Porcino decell (6)	13,28		3,02	

La fuerza inicial para empujar fuera los tapones óseos porcino de control fue significativamente mayor que la fuerza inicial para empujar fuera los tapones porcinos descelularizados ($P < 0,05$; prueba t de Student). El aumento de la velocidad de extensión ($P < 0,05$; prueba t de Student) para los tapones óseos descelularizados en comparación con los tapones óseos de control indicó que los tapones óseos descelularizados eran más compresibles y más comprimidos que los tapones de control antes del movimiento inicial del tapón.

Ejemplo 15

Se diseccionaron tres patas traseras de ovino Suffolk (1 año de edad) para exponer los cóndilos. En el lado lateral de cada cóndilo ovino se perforaron dos orificios de 6 mm de diámetro. Estos orificios representaron los defectos en los que se insertaron los tapones óseos porcino [N=6] en congruencia. Los fémures ovinos se escanearon en un Xtreme microCT a una resolución estándar. Dos imágenes representativas muestran un tapón óseo de control (Figura 29) y un tapón óseo descelularizado (Figura 30) implantados en cóndilos. El hueso se analizó mediante el uso del software micro-CT (Escanear IP) mediante el uso de dos programas (programa 7 y programa 8) para determinar el grosor trabecular y la separación. Se analizó el hueso del tejido huésped (cóndilo ovino) adyacente a los tapones óseos descelularizados y de control, así como también los propios tapones óseos. En las Figuras (31) y (32) se muestra el grosor trabecular promedio y la separación de los cóndilos ovinos y los tapones óseos. La Figura 31 muestra el grosor trabecular medio y la separación de las clavijas de control porcino y cóndilos ovinos. Los datos se presentan como la media ($n=6$) $\pm$ 95 % de límites de confianza. No hubo diferencias significativas entre el programa 7 y 9. El grosor trabecular y la separación de los cóndilos ovinos fueron levemente más altos pero no significativamente que los tapones porcinos de control. La Figura 32 muestra el grosor trabecular medio y la separación de las clavijas de porcinos y cóndilos ovinos descelularizados. Los datos se presentan como la media ($n=6$) $\pm$ 95 % de límites de confianza. El Programa 7 se refiere al análisis que tiene en cuenta la médula ósea, mientras que el Programa 9 se refiere al análisis que no tiene en cuenta la médula ósea. No hubo diferencias significativas entre el programa 7 y 9. El grosor trabecular de los tapones porcinos descelularizados fue ligeramente más bajo (pero no significativamente) que el de los cóndilos ovinos. La separación trabecular dentro del hueso del cóndilo ovino fue mayor (pero no significativamente) que la de los tapones óseos descelularizados.

El porcentaje de volumen óseo se determinó para los tapones óseos porcinos de control (programa 7 y 9) y el cóndilo ovino adyacente (Figura 33) y los tapones óseos descelularizados y el cóndilo ovino adyacente (Figura 34). La Figura 33 muestra el porcentaje de volumen óseo de los tapones óseos porcinos de control y los cóndilos ovinos. Los datos se presentan como la media ($n=6$) $\pm$ 95 % de límites de confianza. El volumen óseo entre los cóndilos ovinos fue menor que el de los tapones porcinos de control (para cualquier programa de análisis). La Figura 34 muestra el porcentaje de volumen óseo de los tapones óseos porcinos de control y los cóndilos ovinos. Los datos se presentan como la media ($n=6$) $\pm$ 95 % de límites de confianza. El volumen óseo para los cóndilos ovinos fue menor que el de los tapones porcinos descelularizados (para cualquier programa de análisis). No hubo diferencia significativa en el volumen óseo entre los tapones óseos porcino de control (Figuras 33 y 34) y los tapones óseos porcino descelularizados.

En conclusión, los métodos de la presente invención se han desarrollado con éxito para descelularizar implantes/andamios de hueso-tejido osteocondral. Además, tales andamios se han caracterizado histológica, estructural e inmunohistológicamente para tener una equivalencia comparable del tejido natural/nativo.

REIVINDICACIONES

1. Un producto que comprende un material de trasplante óseo multicompuesto natural descelularizado caracterizado por la ausencia o ausencia sustancial de células en todo el compuesto, en donde el material de trasplante óseo multicompuesto es un compuesto hueso-tejido conectivo-hueso o un compuesto osteocondral, y en donde la ausencia sustancial está entre el 90 % y hasta el 100 % de eliminación de células de todas las partes del producto de trasplante multicompuesto, en donde el contenido de ADN genómico total (ADNg) de todos los tipos de tejido en el producto multicompuesto está entre 0 y 10 % del tejido nativo.
2. Un producto de acuerdo con la reivindicación 1 que retiene su histoarquitectura original y su composición de colágeno estructural en comparación con un tejido compuesto equivalente celularizado fresco nativo.
3. Un producto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que se deriva de tejido alogénico o xenogénico y, opcionalmente, en donde el tejido xenogénico es porcino, bovino u ovino.
4. Un producto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el tejido conectivo se selecciona del grupo que comprende ligamentos, tendón rotuliano que incluye opcionalmente tejido de entesis, entesis y menisco; opcionalmente, en donde el menisco es tejido de menisco medial e incluye tejido de unión o entesis en cualquier extremo del menisco que une el menisco a cada bloque de hueso terminal.
5. Un producto de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el ligamento se selecciona del grupo que comprende ligamentos de cabeza y cuello, ligamentos de muñeca y dedos, ligamentos de rodilla, ligamentos de tórax, ligamentos de pie y ligamentos de pelvis.
6. Un producto de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el ligamento de rodilla se elige del grupo que comprende ligamento cruzado anterior (ACL), ligamento colateral lateral (LCL), ligamento cruzado posterior (PCL), ligamento colateral medial (MCL), ligamento cruzado craneal (CRCL) - equivalente cuadrúpedo de ACL, ligamento cruzado caudal (CACL) - equivalente cuadrúpedo de PCL y ligamento rotuliano.
7. Un método para preparar una matriz de tejido óseo multicompuesto descelularizado para su posterior implantación en un huésped, en donde la matriz de tejido óseo multicompuesto es un compuesto hueso-tejido conectivo-hueso o un compuesto osteocondral caracterizado por la ausencia o ausencia sustancial de células en el compuesto completo, el método que comprende las etapas de:
 - (i) congelar y descongelar la matriz de tejido compuesto;
 - (ii) someter bloques de hueso a un chorro de fluido;
 - (iii) ultrasonidos de la matriz de tejido compuesto
 - (iv) en el caso de la matriz de tejido multicompuesto comprende una estructura de hueso-tejido conectivo-hueso, que separa los fascículos en una región de entesis;
 - (v) incubar la matriz de tejido compuesto en una solución hipotónica;
 - (vi) incubar la matriz de tejido compuesto en una solución hipotónica que comprende un detergente aniónico;
 - (vii) someter la matriz de tejido compuesto a lavados hipotónicos o isotónicos;
 - (viii) incubar el tejido en una solución que comprende al menos una enzima nucleasa;
 - (ix) lavar la matriz de tejido compuesto; y
 - (x) lavado adicional de la matriz de tejido compuesto; yen donde la ausencia sustancial está entre el 90 % y hasta el 100 % de eliminación de células de todas las partes del producto de trasplante multicompuesto.
8. El método de la reivindicación 7, en donde la temperatura de las etapas de congelación está entre -10 a -85 °C.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde el fluido del chorro de fluido es agua a presión o solución salina tamponada con fosfato (PBS) y, opcionalmente, en donde se usa entre 250-600 mL de fluido para irrigar cada bloque de hueso.
10. Un método de acuerdo con cualquiera de los acuerdos de las reivindicaciones de la 7 a la 9, en donde la energía ultrasónica se aplica a una solución en la que se sumerge la matriz de tejido óseo de donante multicompuesto.
11. Un método de acuerdo con cualquiera de los acuerdos de las reivindicaciones de la 7 a la 10, en donde la etapa (v) comprende en primer lugar incubar la matriz de tejido compuesto en una solución hipotónica bajo condiciones de congelación/descongelación y subsecuentemente un lavado en tampón hipotónico bajo condiciones de no congelación/descongelación.

FIGURA 1

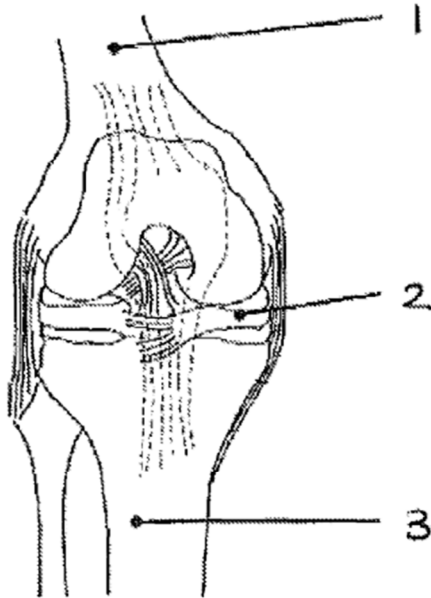


FIGURA 2

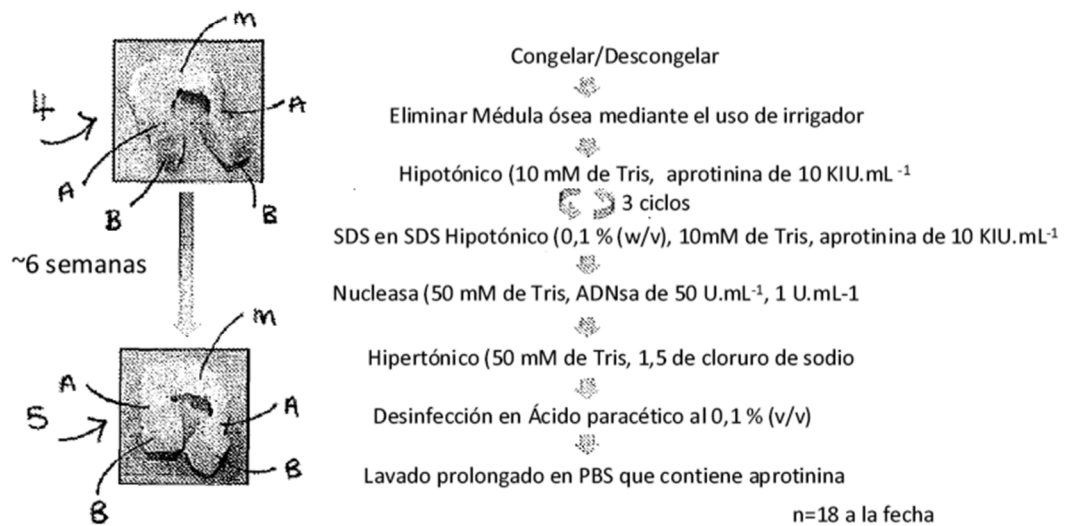


FIGURA 3

Hematoxilina & Eosina

Fresco



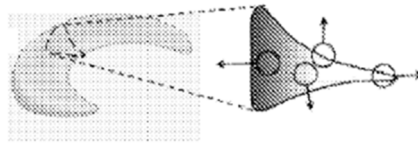
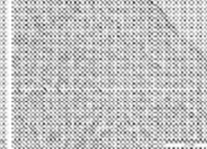
Descelularizado



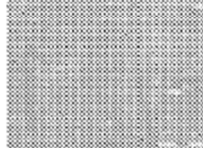
Fresco



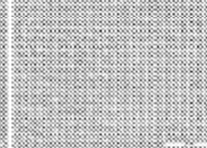
Descelularizado



Fresco



Descelularizado



Fresco



Descelularizado

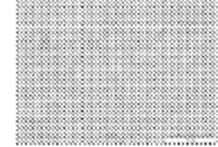


FIGURA 4

Tetracromo de McNeal

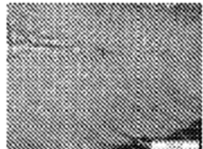
Fresco



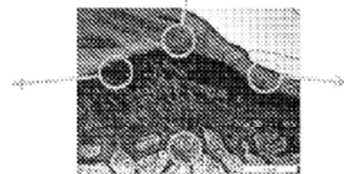
Descelularizado



Fresco



Descelularizado



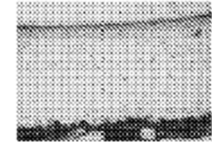
Fresco



Descelularizado



Fresco



Descelularizado

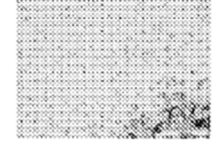


FIGURA 5A

*p<0,005, ** p<0,001

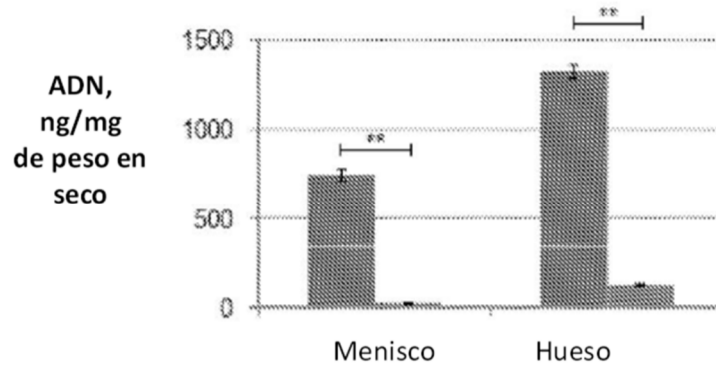


FIGURA 5B

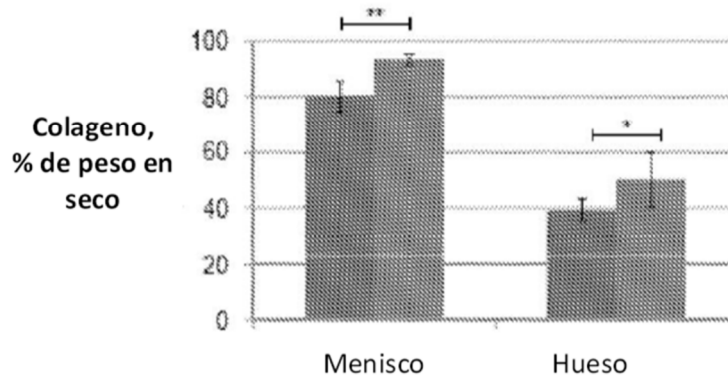


FIGURA 5C

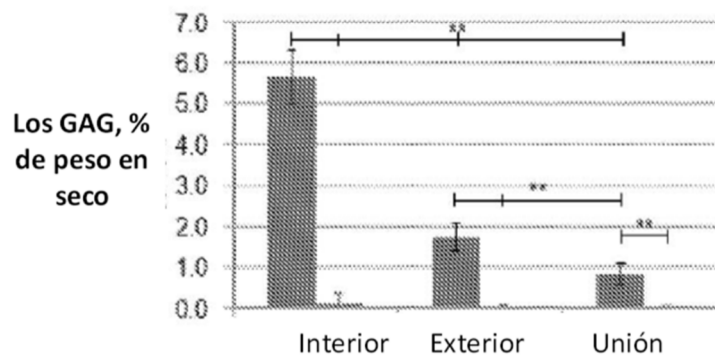


FIGURA 5D

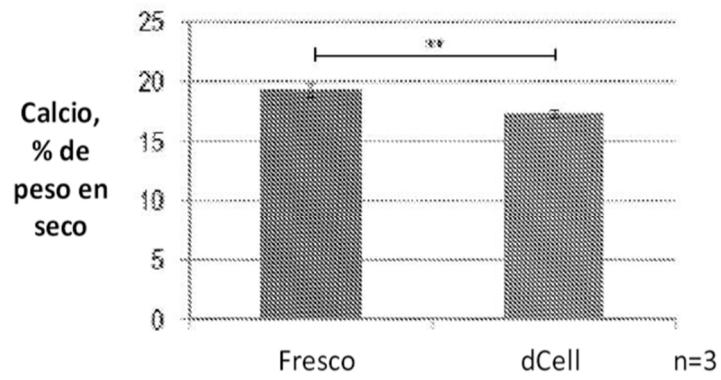


FIGURA 6

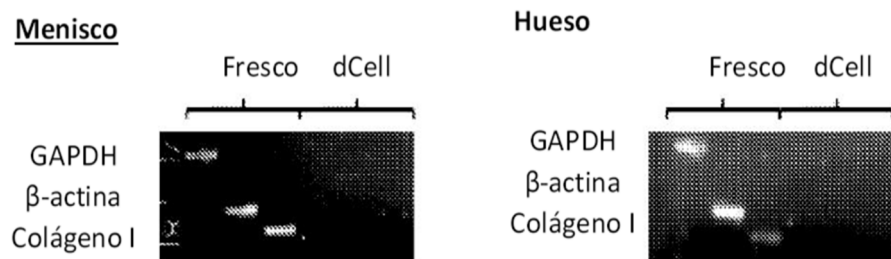


FIGURA 7

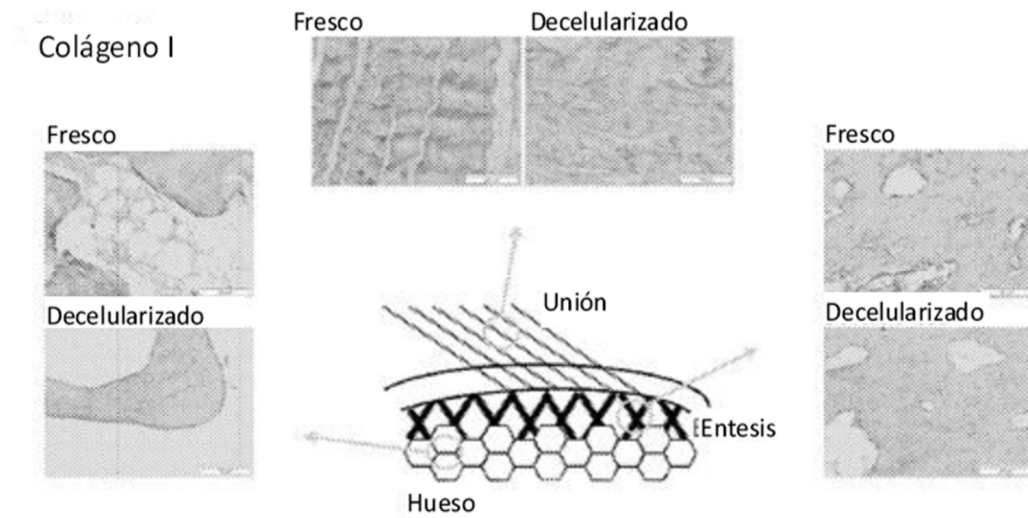


FIGURA 8A

Componente ECM	Fresco				Descelularizado			
	Interior	Exterior	Unión	Hueso	Interior	Exterior	Unión	Hueso
Colágeno I	++	+++	+++	+++	+	++	+++	+++
Colágeno II	+++	+	++	++	+++	+	++	++
Colágeno III	++	++	++	++	++	++	+	++
Colágeno IV	+	++	+	++	-	-	-	-
Colágeno VI	+	++	++	++	+/-	+/-	+/-	++
Osteocalcina	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	++

FIGURA 8B

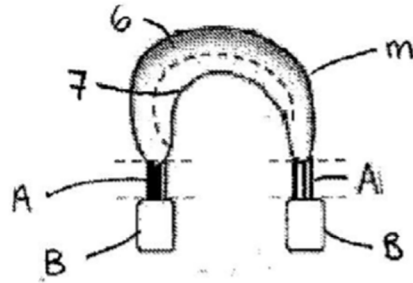


FIGURA 9

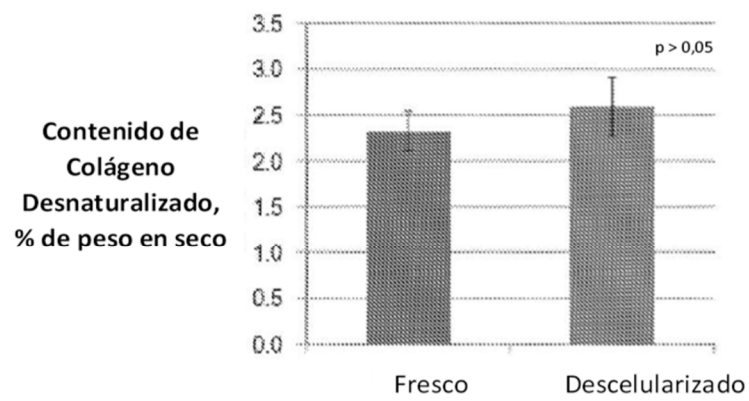


FIGURA 10

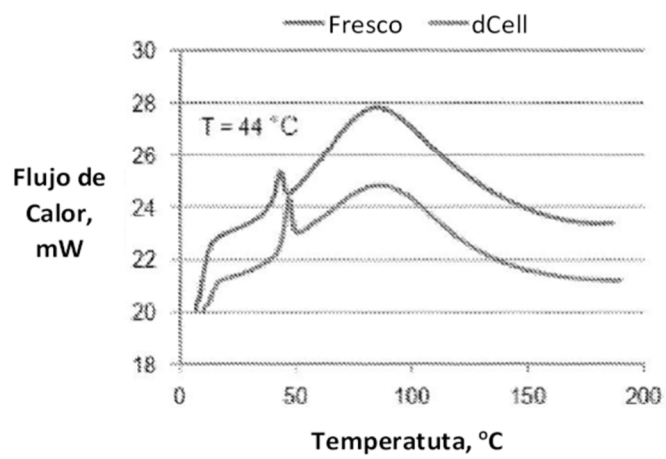


FIGURA 11A

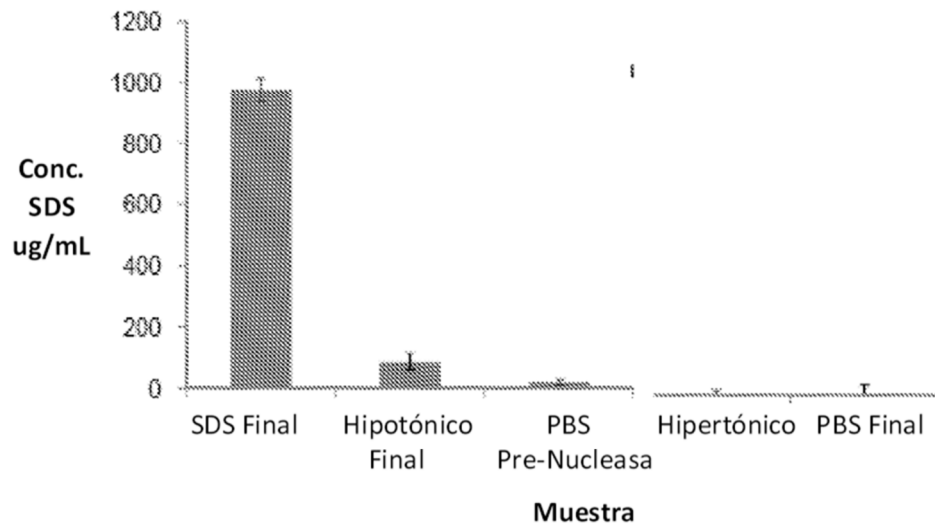


FIGURA 11B

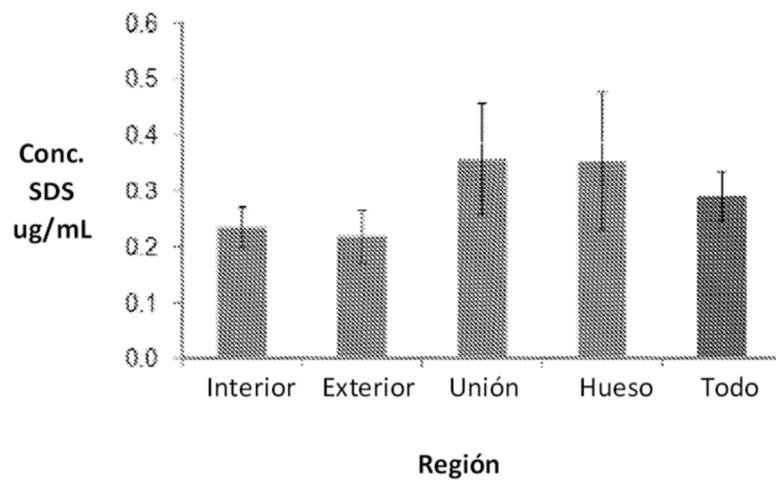


FIGURA 12

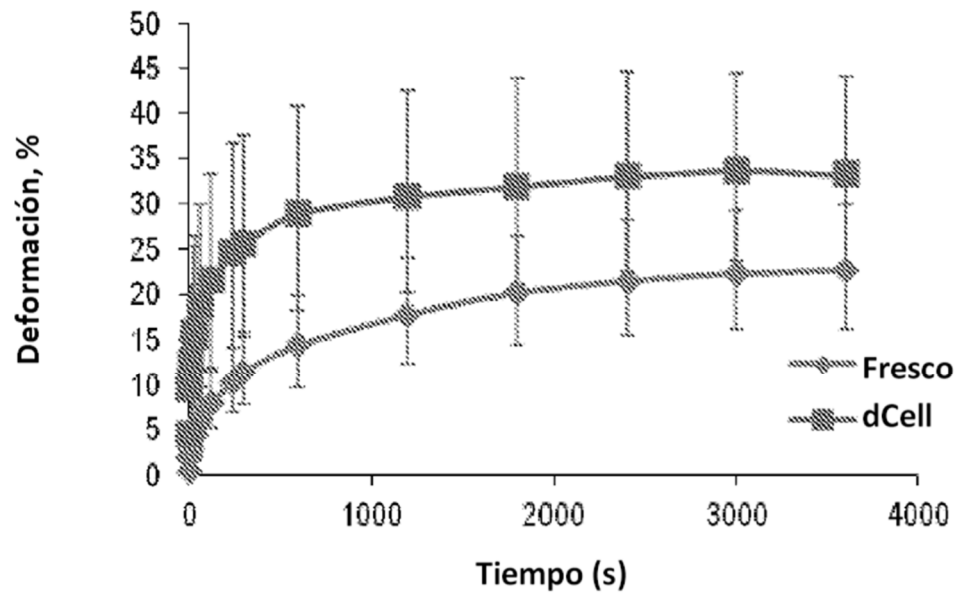


Figura 13A



Figura 13B

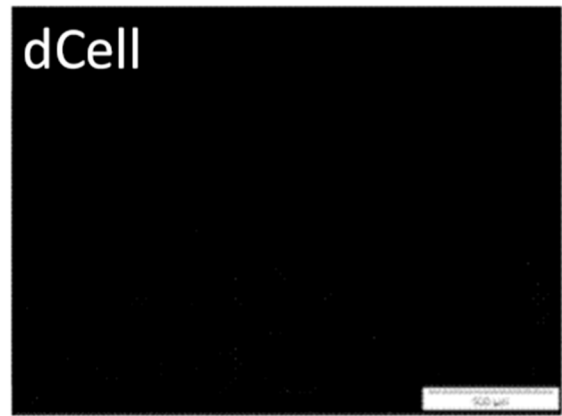


Figura 14A



Figura 14B

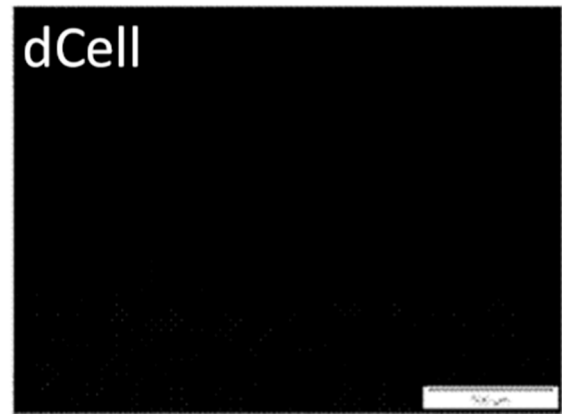


Figura 15A

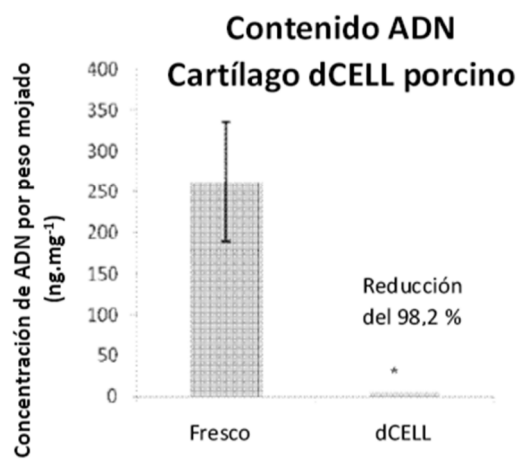


Figura 15B

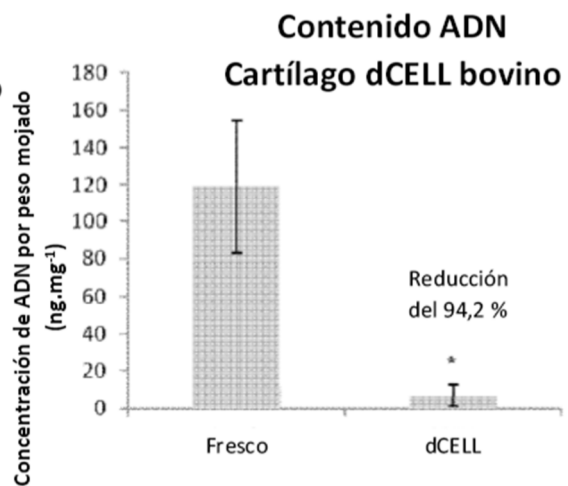


Figura 16A



Figura 16B

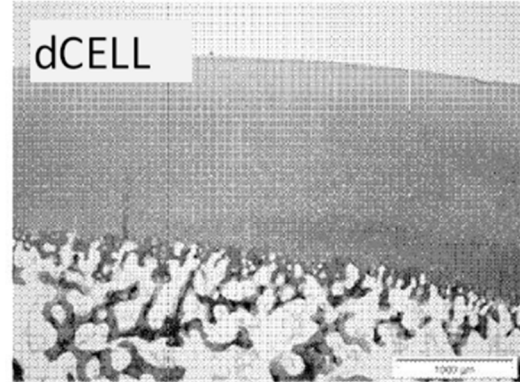


Figura 17A

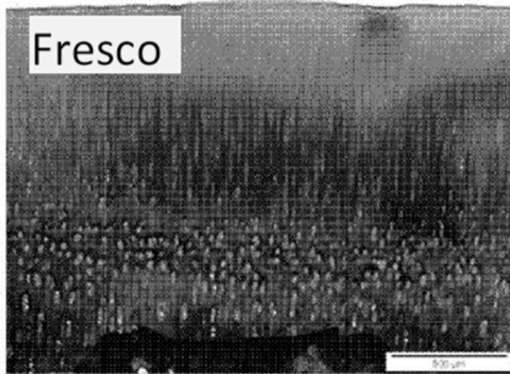


Figura 17B

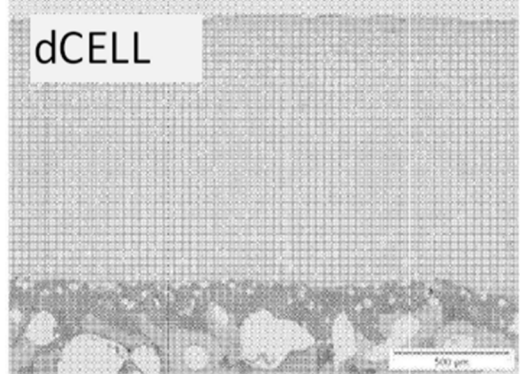


Figura 18A

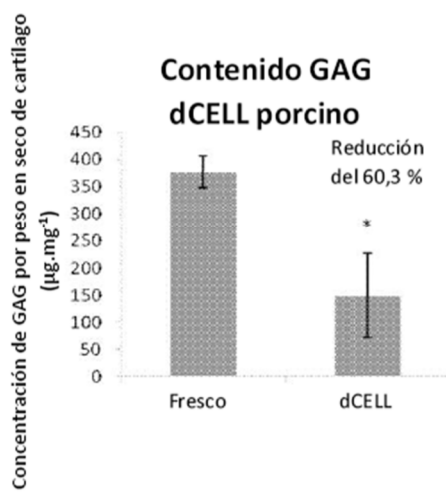


Figura 18B

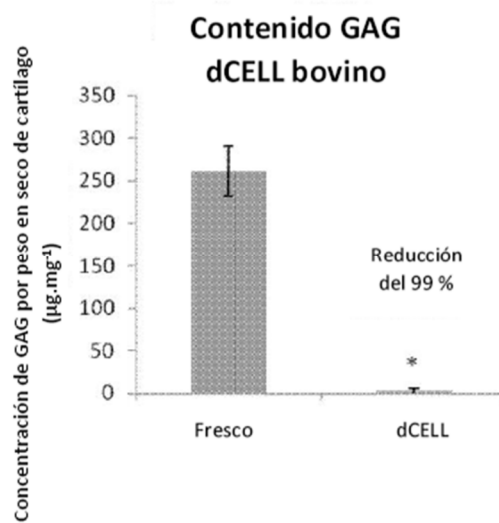


Figura 19A

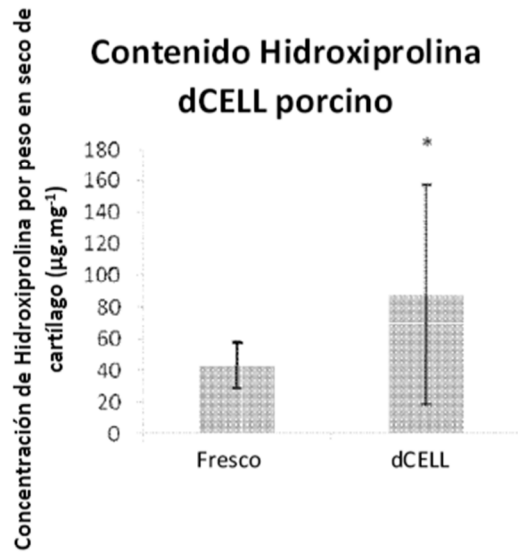


Figura 19B

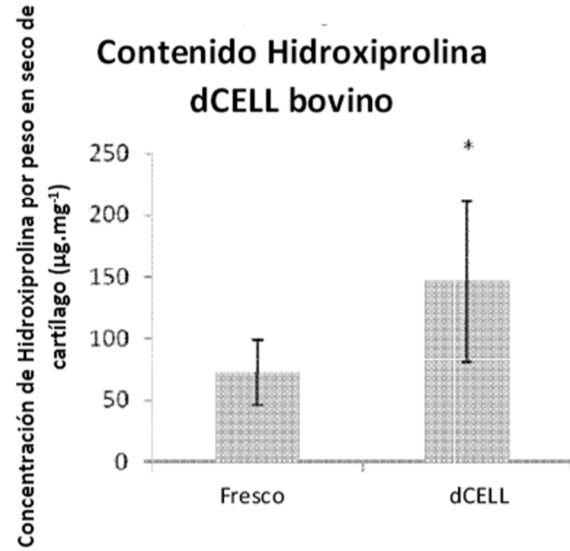


Figura 20A

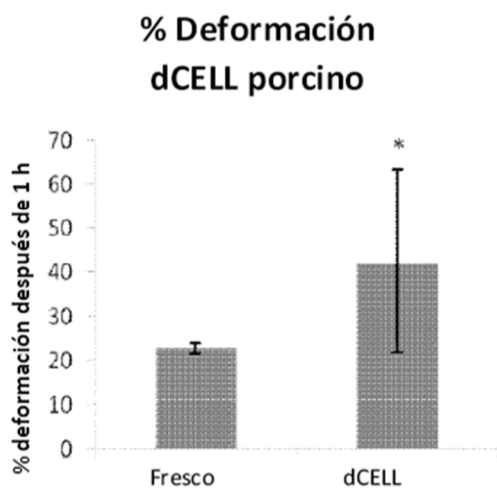


Figura 20B

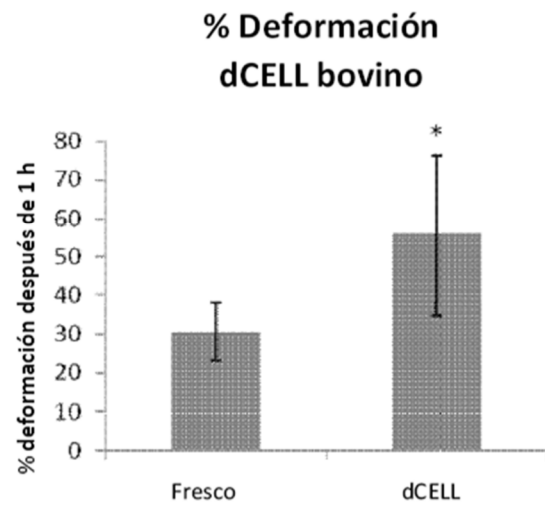


Figura 21

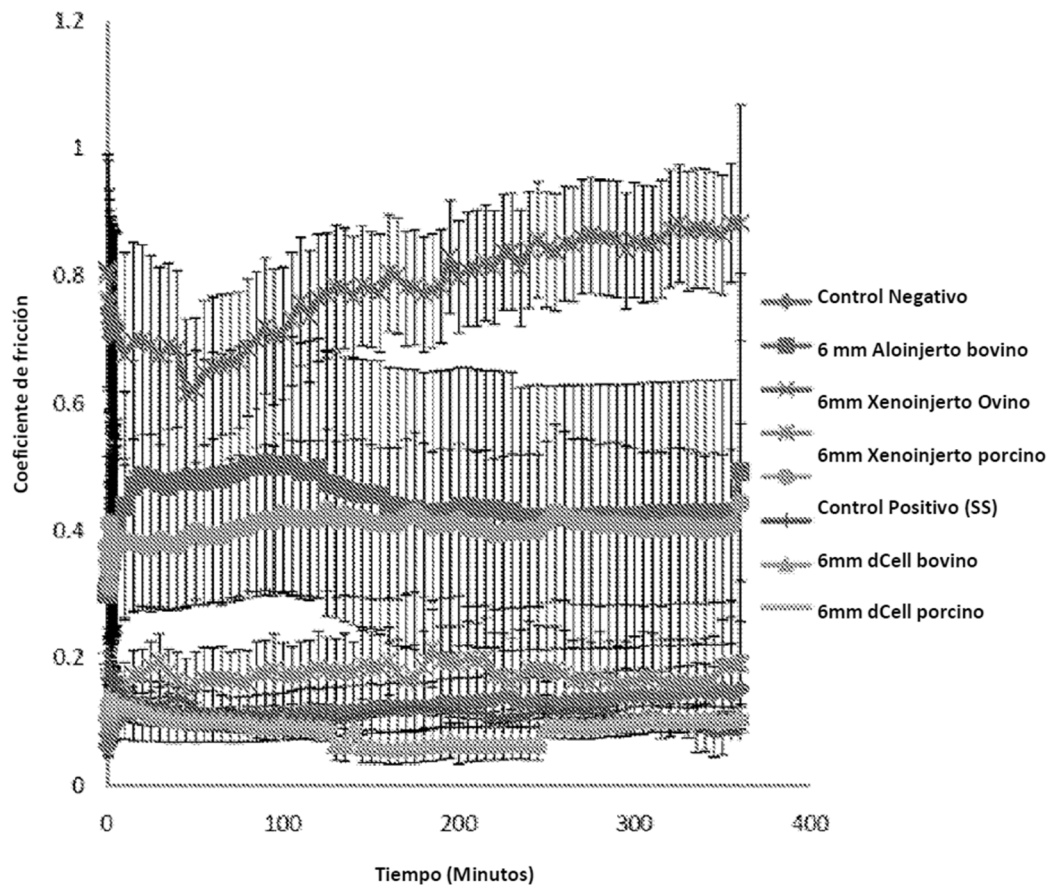


Figura 22

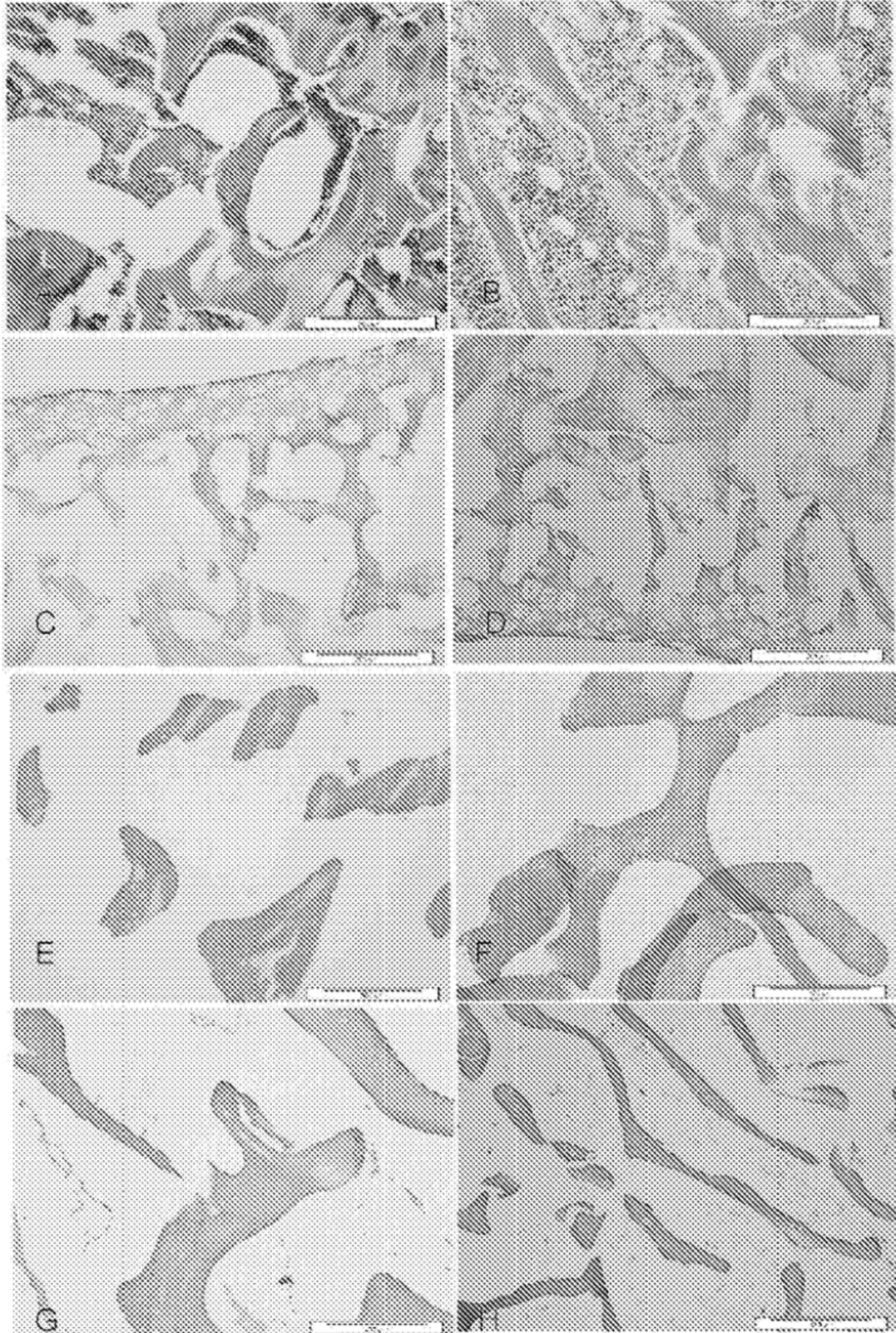


Figura 23

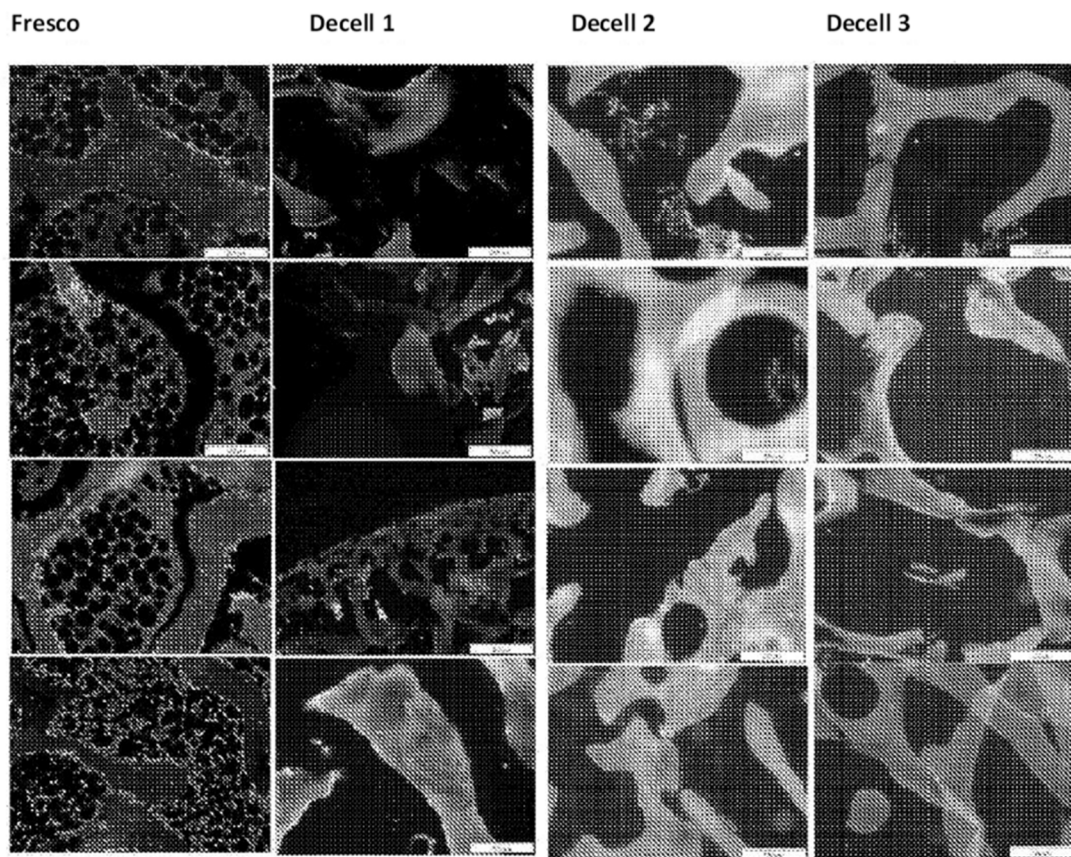


Figura 24

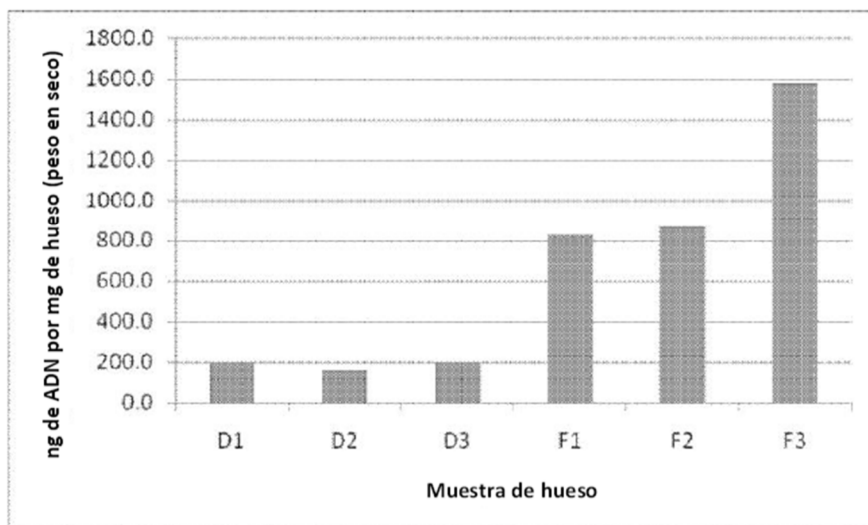


Figura 25

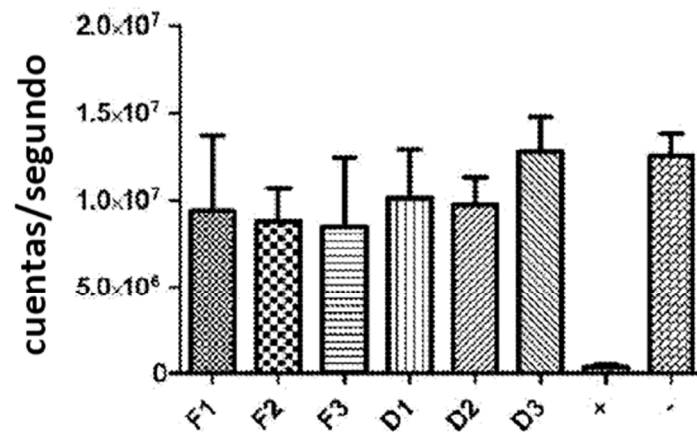


Figura 26

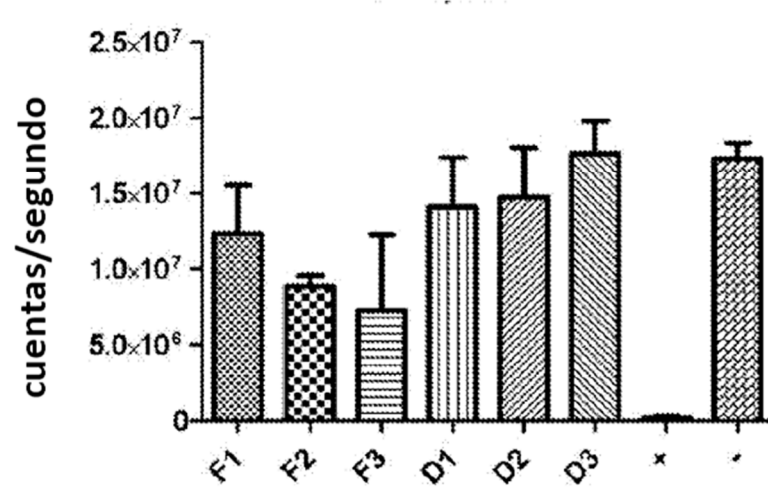


Figura 27

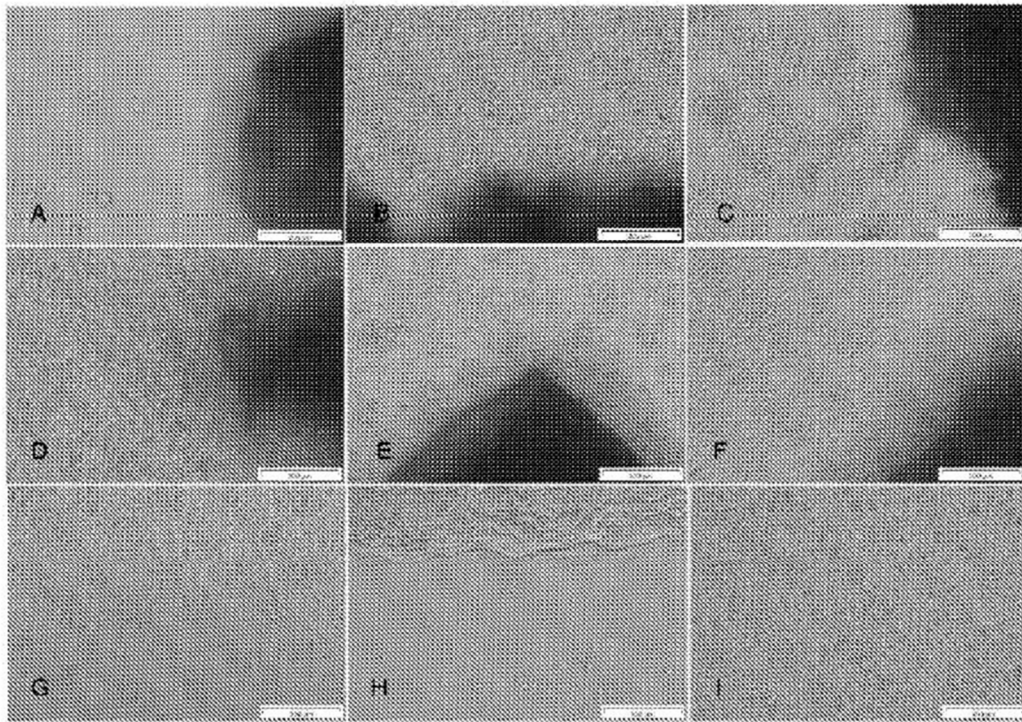
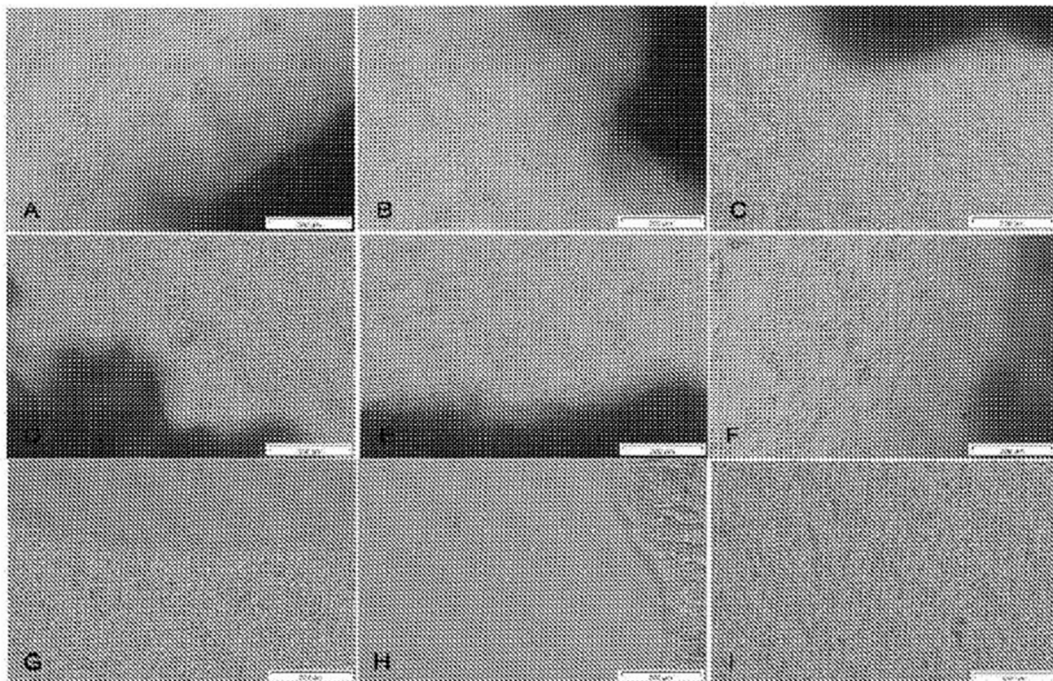
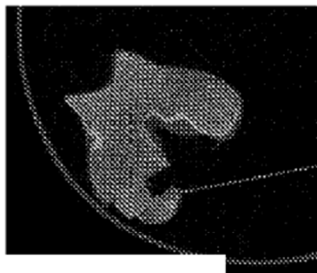


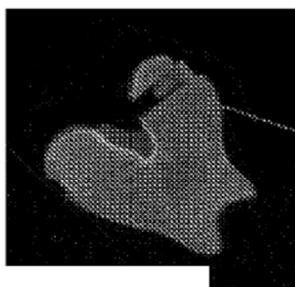
Figura 28





Tapón de hueso

Figura 29



Tapón de hueso

Figura 30

Figura 31

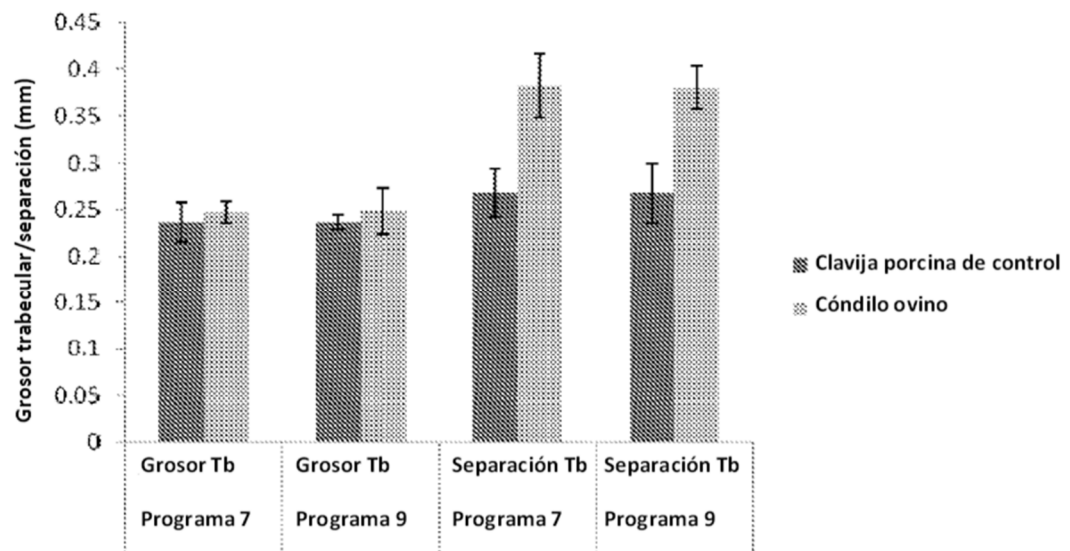


Figura 32

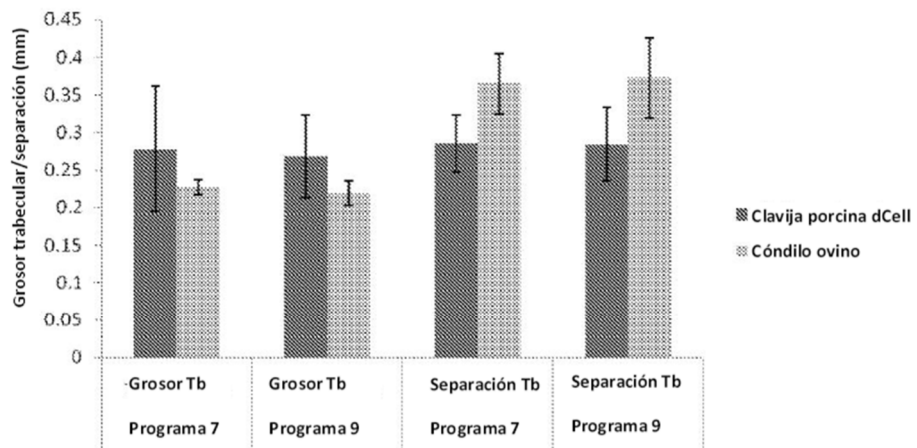


Figura 33

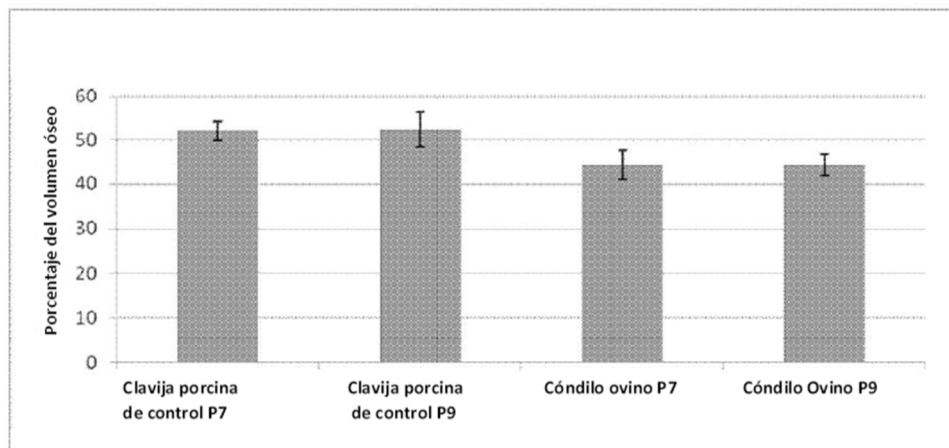


Figura 34

