

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 340 657**

21 Número de solicitud: 201030238

51 Int. Cl.:
A61L 27/38 (2006.01)
A61F 2/28 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **19.02.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2010**

Fecha de la concesión: **11.01.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **21.01.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
21.01.2011

73 Titular/es: **BANC DE SANG I TEIXTITS**
Passeig de la Vall d'Hebrón, 119-129
08035 Barcelona, ES

72 Inventor/es: **Cairo Badillo, Jordi Joan;**
Caminal Bobet, Marta;
Pla Calvet, Pablo Arnau;
Godia Casablanca, Francesc;
García López, Juan;
Vives Armengol, Joaquim y
Aguirre Canyadell, Marius

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

54 Título: **Procedimiento para la obtención de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración de tejido óseo.**

57 Resumen:

Procedimiento para la obtención de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración de tejido óseo. La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración de tejidos óseos. Más en particular, la presente invención se refiere a un producto que comprende principalmente células mesenquimales de origen óseo expandidas, inmovilizadas sobre soportes óseos y amalgamadas mediante geles de fibrina. Dicho procedimiento comprende fundamentalmente las etapas de colonización de los soportes óseos y el amalgamado de las partículas colonizadas en base a geles de fibrina.

ES 2 340 657 B1

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la obtención de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración de tejido óseo.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración de tejidos óseos. Más en particular, la presente invención se refiere a un producto que comprende principalmente células mesenquimales de origen óseo expandidas, inmovilizadas sobre soportes óseos y amalgamadas mediante geles de fibrina. Dicho procedimiento comprende fundamentalmente las etapas de colonización de los soportes óseos y el amalgamado de las partículas colonizadas en base a geles de fibrina.

10 La reconstrucción de segmentos óseos debido a traumatismos, enfermedades degenerativas, inflamación y el tratamiento quirúrgico de tumores es un problema clínico no resuelto. Los tratamientos disponibles en la actualidad incluyen el trasplante de tejido óseo autólogo, heterólogo y la utilización de implantes en base a diversos tipos de biomateriales. Entre las anteriores aproximaciones el autoinjerto de hueso obtenido de diversas localizaciones, como por ejemplo la cresta ilíaca, es el tratamiento preferido para una amplia variedad de condiciones ortopédicas. Entre estas se encuentran el reemplazo de defectos óseos, la consolidación de fracturas complicadas o los defectos de unión. La utilización de tejido autólogo como vehículo de la regeneración ósea cumple una serie de requisitos básicos claves, aporta una matriz estructural osteoinductiva, factores de crecimiento que promueven la vascularización y osteoinducción del implante e introduce células con potencial osteogénico.

20 A pesar de los beneficios derivados, desde un punto de vista exclusivamente mecánico, la utilización de autoinjertos en la práctica clínica presenta una serie de importantes inconvenientes. Frecuentemente, no se consigue una sustitución completa del tejido óseo dañado con el autoinjerto. Esta circunstancia puede desencadenar a largo plazo en la rotura del injerto. Se ha estimado que transcurridos 10 años el porcentaje de rotura es del 60% y se encuentra asociada a multitud de factores como la disminución en la mineralización del hueso neoformado, la producción de microfisuras o la actividad de los osteoclastos (Wheeler DL y otros, *Allograft bone decreases in strength in vivo over time*. Clin Orthop Relat Res. 2005; 435:36-42.). Por otro lado, la obtención quirúrgica del hueso autólogo frecuentemente lleva asociada una elevada morbilidad variable (Laurie SW y otros, *Donor-site morbidity after harvesting rib and iliac bone*. Plast Reconstr Surg. 1984;6:93-98.) en función de la localización anatómica y la técnica de extracción (Chou LB y otros, *Stress fracture as a complication of autogenous bone graft harvest from the distal tibia*. Foot Ankle Int. 2007;2:199-201; Brawley SC y otros, *Results of an alternative autogenous iliac crest bone graft harvest method*. Orthopedics. 2006;4:342-346.).

35 La utilización de hueso humano procedente de bancos de tejidos soluciona el problema de la morbilidad asociada a los autoinjertos, pero carece de los beneficios asociados a la actividad regeneradora aportada por el componente celular, la cual se ha determinado como un factor clave. Este tipo de injertos presentan una incorporación lenta en el hueso nativo que puede acabar produciendo inestabilidad mecánica durante esfuerzos o poca afinidad celular, circunstancias que se traducen en la no unión con el hueso nativo (Enneking WF y otros, *Observations on massive retrieved human allografts*. J Bone Joint Surgery. 1991;73:1123-1142; Turk JB y otros, *Bone source from craneomaxillofacial reconstruction*. Facial Plast Surg. 2000;16:7-14). Esta problemática sitúa la tasa de fracaso de esta técnica entre el 10 y el 40% (Ottolenghi CE. *Massive osteo and osteo-articular bone grafts: technique and results of 62 cases*. Clin Orthop Relat Res 1972;87:156-64). Por esta razón, aunque se disponga de tejido óseo de banco, el tratamiento más frecuente de lesiones óseas importantes es el autoinjerto.

45 Como respuesta a la problemática mencionada, la presente invención da a conocer un procedimiento para preparar un producto basado en la ingeniería tisular, cuya utilización resulta en una alternativa terapéutica eficaz. El uso del producto obtenido mediante el procedimiento que da a conocer la presente invención se fundamenta en la utilización de matrices en base a biomateriales, combinadas con células madre para inducir la regeneración de los tejidos óseos dañados.

50 Las matrices utilizadas en la presente invención muestran varias características, que resultan claves para realizar la función de soporte a la reconstrucción del tejido diana. Entre estas características se destacan que son biocompatibles, reabsorbibles, poseen integridad estructural y características mecánicas que se adecúan a la zona de implantación. Además, deben ser capaces de generar un entorno biológico que garantice el aporte de nutrientes a las células para asegurar que estas puedan realizar su función regeneradora. A las anteriores características debe añadirse que una matriz orientada a la regeneración de tejidos óseos debería poseer capacidad de inducir osteoinducción.

60 El segundo componente fundamental del producto de ingeniería tisular de la presente invención son las células. Dichas células también exhiben varias características relevantes tales como la facilidad y seguridad de su preparación, son una fuente segura desde el punto de vista citogenético y tienen propiedades de multipotencialidad, que les permite diferenciarse hacia células responsables de la producción de tejido óseo, los osteoblastos.

65 Por lo tanto, la presente invención da a conocer un procedimiento para la preparación de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración ósea. Dicho procedimiento se fundamenta en la utilización de células mesenquimales expandidas, de origen autólogo o alogénico, procedentes de la médula ósea, dichas células se inmovilizan sobre soportes en base a partículas de hueso desantigenizado o desantigenizado/desmineralizado. El producto obtenido por dicho procedimiento se amalgama y estabiliza en la zona de implantación utilizando geles de fibrina. El tratamiento con el producto obtenido por el procedimiento de la presente invención tiene como principal ventaja respecto de los tra-

ES 2 340 657 B1

tamientos basados en el autoinjerto, que no es necesario someter al receptor de la terapia a una o varias intervenciones de cirugía mayor para la extracción del material biológico.

5 El material celular necesario para la preparación del producto de Ingeniería Tisular según la presente invención se obtiene mediante la extracción de médula ósea que se realiza de forma ambulatoria. Esta aproximación, por lo tanto, evita las complicaciones potencialmente graves derivadas de la obtención de material óseo autólogo tales como dolor crónico, afectación del tejido nervioso y arterial, inestabilidad de la pelvis, infección y cicatrices (Banwart JC y otros, Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. Spine. 1995;20:1055-1060).

10 Por otro lado, el procedimiento según la presente invención, que utiliza de forma combinada células mesenquimales y una matriz de reconocida capacidad osteoinductora, preferentemente hueso desantigenizado o desantigenizado/desmineralizado permite superar las limitaciones impuestas por la utilización de hueso procedente de banco de tejidos sin componente celular, que muestra un Índice de fracaso en la integración ósea de entre el 10% y el 40%.

15 La combinación de matrices óseas desmineralizadas/desantigenizadas o desantigenizadas con médula ósea no procesada ha demostrado acelerar y incrementar la formación de hueso en comparación a la utilización de la matriz ósea por sí sola (Rougraft BT., Treatment of active unicameral bone cysts with percutaneous injection of demineralized bone matrix and autogenous bone marrow. J. Bone Joint Surg. Am. 2002;84:921). Aunque este resultado pone de manifiesto que la médula ósea, es decir las células con posible potencial osteogénico contenidas en ella, puede ser un
20 elemento clave en la actividad terapéutica del producto, al actuar como catalizadores de la formación de tejido sano.

Sin embargo, la médula ósea está constituida por un conjunto celular heterogéneo que incluye todas las células de linaje hematopoyético, células endoteliales, células de tejido adiposo así como un porcentaje, menor al 0,01% de células mesenquimales multipotentes. Esta población de células mesenquimales es la que mediante un proceso de diferenciación dará lugar a los osteoblastos, que son los principales responsables de la formación de hueso. Lógicamente este bajo porcentaje de las células mesenquimales en la médula ósea supone una limitación en la capacidad regeneradora de esta fuente celular. Por lo tanto, existe un grado de incertidumbre elevado en el resultado del tratamiento, al no ser posible determinar la cantidad de células con capacidad osteoinductora aplicadas y fijadas a la zona de la lesión.

30 Los presentes inventores han descubierto que mediante el procedimiento de la presente invención, en el que se conjugan matrices óseas mediante un proceso de inmovilización de un producto celular enriquecido en células mesenquimales se obtienen resultados sorprendentes en la regeneración ósea. Dicho producto presenta una excelente capacidad osteoinductora y se obtiene mediante una selección y posterior expansión *in vitro* de estas células mesenquimales.

35 El procedimiento de la presente invención, mediante la manipulación del proceso de expansión de las células mesenquimales, permite generar un amplio rango de cantidades de injerto óseo, que facilita el tratamiento de lesiones de diverso tamaño y origen. Esta característica hace que el producto obtenido mediante el procedimiento según la presente invención sea aplicable en un abanico de aproximaciones terapéuticas tales como la reconstrucción ósea maxilofacial, en osteoartrosis, en osteonecrosis, en el reemplazo de defectos óseos, en la fusión intervertebral, en la consolidación de fracturas complicadas o en los defectos de unión.

45 Por otro lado, la conjugación de las células mesenquimales a las matrices óseas mediante un proceso de colonización, permite la localización de las células con potencial osteogénico en la zona a regenerar. Esta característica asegura la actividad celular reparadora en la zona a tratar y a diferencia de otras aproximaciones de ingeniería tisular, que introducen las células sin inmovilizar en la matriz. Además, esto garantiza la permanencia de las células mesenquimales en la zona de la lesión donde deben realizar la labor reparadora.

50 Finalmente, el amalgamado de estas partículas de hueso colonizadas con células mesenquimales mediante geles de fibrina permite dotar al conjunto de plasticidad y capacidad de manipulación, facilitando a su vez la inmovilización de la mezcla en la zona a tratar y dándole la arquitectura requerida.

Descripción detallada de la invención

55 La presente invención da a conocer un procedimiento para la preparación de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración de tejidos óseos. Dicho producto está constituido por un componente celular consistente en células mesenquimales expandidas a partir de la médula ósea y un componente no celular en base a matrices óseas. El procedimiento comprende las etapas de:

- 60 a) expansión de células mesenquimales;
- b) conjugación/inmovilización de las células mesenquimales obtenidas en (a) en matrices óseas;
- 65 c) lavado de la suspensión ósea; y
- d) acondicionado final (amalgamado).

ES 2 340 657 B1

El tamaño de la lesión a tratar determinará la cantidad de células mesenquimales requeridas para una adecuada regeneración ósea. Una vez obtenida en la etapa (a) la dosis de células mesenquimales requeridas, se inicia la etapa de conjugación de éstas a una matriz ósea. Esta conjugación-inmovilización se puede realizar mediante sistemas dinámicos o estáticos.

En el caso de que se utilice un sistema dinámico, las células mesenquimales obtenidas en la etapa de expansión (a) se resuspenden en medio de cultivo, preferentemente medio DMEM complementado con suero a una concentración no superior 1×10^7 células por mililitro y no inferior a 1×10^3 células por mililitro. A continuación, se dispensa la suspensión celular de forma estéril en una bolsa o frasco de cultivo, que puede estar dotado o no de agitador pendular previamente cargado con la matriz ósea. La relación número de células por centímetro cúbico de matriz ósea se mantendrá dentro del intervalo de 1×10^2 a 1×10^8 células por centímetro cúbico. Una vez añadida la suspensión celular al frasco, bioreactor o bolsa de cultivo, se incuba con agitación durante 4 a 24 horas a una temperatura de 37°C , una saturación de CO_2 del 5%, y humedad relativa del 95%. Las condiciones de agitación empleadas para garantizar el anclaje de las células son de 1 a 120 revoluciones por minuto.

En caso de emplear un sistema de inmovilización estático, las células mesenquimales obtenidas en la etapa de expansión (a) se resuspenden en medio de cultivo, preferentemente medio DMEM complementado con suero a una concentración no superior 1×10^7 células por mililitro y no inferior a 1×10^3 células por mililitro. A continuación, se dispensa la suspensión celular de forma estéril en una bolsa o frasco de cultivo, que puede estar dotado o no de agitador pendular previamente cargado con la matriz ósea. La relación número de células por centímetro cúbico de matriz ósea se mantendrá dentro del intervalo de 1×10^2 a 1×10^8 células por centímetro cúbico. Una vez añadida la suspensión celular al frasco, bioreactor o bolsa de cultivo, se incuba durante 4 a 24 horas a unas condiciones de temperatura de 37°C , una saturación de CO_2 del 5% y humedad relativa del 95%.

El producto obtenido de la etapa de conjugación/inmovilización (b), compuesto por células mesenquimales inmovilizadas sobre matrices óseas, preferentemente de hueso desantigenizadas, más preferentemente desantigenizadas/desmineralizadas, se somete a un ciclo de lavados, preferentemente mediante una solución salina fisiológica, y se emplaza de forma estéril en bolsa de conservación.

El producto obtenido se extrae de la bolsa de conservación de forma estéril mezclado con un gel de fibrina con una relación de 1 unidad volumétrica de solución de fibrinógeno por una unidad volumétrica de solución de trombina y una unidad volumétrica de matriz ósea colonizada.

A continuación, la presente invención se ilustra mediante Ejemplos, que no constituyen una limitación de la misma.

Ejemplo 1

Procedimiento utilizando una inmovilización dinámica

En el siguiente procedimiento se realizó para la obtención de un centímetro cúbico del producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración ósea, según la presente invención.

Se obtuvieron 6×10^6 células mesenquimales de médula ósea mediante expansión empleando medios libres de suero animal y se inocularon en un frasco de cultivo. Mediante el empleo de medio en base a DMEM suplementado con suero humano al 10% (v/v), se fijó la concentración celular a una densidad de 6×10^5 células por mililitro. Esta suspensión celular se añadió de forma estéril a un segundo frasco de material plástico dotado de agitador pendular, donde previamente se añadió 1 centímetro cúbico de matriz ósea desantigenizada.

Se emplazó el frasco en la incubadora a unas condiciones de temperatura de 37°C , saturación de CO_2 del 5%, y humedad relativa del 95% y se inició un ciclo de agitación de 24 horas de duración a una velocidad de 1 rpm. A lo largo del tiempo que dura esta etapa de inmovilización de las células mesenquimales sobre la matriz ósea, se tomaron muestras del sobrenadante para determinar el ritmo y rendimiento de la inmovilización de las células. Los rendimientos de inmovilización cuando finalizó esta etapa fueron superiores al 80% y la viabilidad de las células, determinada mediante tinción de núcleos o ensayos metabólicos indirectos, fue superior al 90%.

Transcurridas las 24 horas, tras la inmovilización de las células mesenquimales sobre la matriz ósea, se realizó un lavado del producto obtenido con el objetivo de eliminar restos celulares y del medio de cultivo. Esta operación se llevó a cabo mediante filtración empleando como agente de lavado una solución salina fisiológica. A continuación, se emplazó el producto obtenido en una bolsa estéril.

En el momento previo de la aplicación del producto al paciente, se realizó un amalgamado de las partículas óseas con un gel de fibrina. Para realizar esta operación, se empleó una relación volumétrica consistente en una unidad de solución de fibrinógeno por una unidad volumétrica de solución de trombina y una unidad volumétrica de matriz ósea colonizada. A continuación, se dotó a dicho conjunto de la forma que le permitió adaptarse a la distribución espacial de la lesión y se emplazó en la misma.

ES 2 340 657 B1

Ejemplo 2

Procedimiento utilizando una inmovilización estática

5 Se obtuvieron 6×10^6 células mesenquimales de médula ósea mediante expansión empleando medios libres de suero animal y se inocularon en un frasco de cultivo. Mediante el empleo de medio en base a DMEM suplementado con suero humano al 10% (v/v), se fijó la concentración celular a una densidad de 6×10^5 células por mililitro. Esta suspensión celular se añadió de forma estéril a una bolsa de cultivo permeable a gas de material plástico, donde previamente se añadió 1 centímetro cúbico de matriz ósea desantigenizada.

10 Se emplazó el frasco en la incubadora a unas condiciones de temperatura de 37°C , saturación de CO_2 del 5%, y humedad relativa del 95% y se mantuvo sin movimiento durante 24 horas. A lo largo del tiempo que dura esta etapa de inmovilización de las células mesenquimales sobre la matriz ósea, se tomaron muestras del sobrenadante para determinar el ritmo y rendimiento de la inmovilización de las células. Los rendimientos de inmovilización cuando finalizó esta etapa fueron superiores al 80% y la viabilidad de las células, determinada mediante tinción de núcleos o ensayos metabólicos indirectos fue superior al 90%.

15 Transcurridas las 24 horas, tras la inmovilización de las células mesenquimales sobre la matriz ósea, se realizó un lavado del producto obtenido con el objetivo de eliminar restos celulares y del medio de cultivo. Esta operación se llevó a cabo mediante filtración empleando como agente de lavado una solución salina fisiológica. A continuación, se emplazó el producto obtenido en una bolsa estéril.

20 En el momento previo de la aplicación del producto al paciente, se realizó un amalgamado de las partículas óseas con un gel de fibrina. Para realizar esta operación, se empleó una relación volumétrica consistente en una unidad de solución de fibrinógeno por una unidad volumétrica de solución de trombina y una unidad volumétrica de matriz ósea colonizada. A continuación, se dotó a dicho conjunto de la forma que le permitió adaptarse a la distribución espacial de la lesión y se emplazó en la misma.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la preparación de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración de tejidos óseos que comprende las etapas de:
- a) expansión de células mesenquimales;
 - b) conjugación/inmovilización de las células mesenquimales obtenidas en (a) en matrices óseas;
 - 10 c) lavado de la suspensión ósea; y
 - d) acondicionado final (amalgamado).
- 15 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la etapa de conjugación/inmovilización se realiza mediante un sistema dinámico o un sistema estático.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, en el que la matriz ósea es hueso desantigenizado.
- 20 4. Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, en el que la matriz ósea es hueso desantigenizado/desmineralizado.
5. Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, en el que el lavado se realiza con solución salina fisiológica.
- 25 6. Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, en el que el lavado se realiza en ciclos y el agente de lavado se elimina mediante filtración.
- 30 7. Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, en el que la relación número de células por centímetro cúbico de matriz ósea en la etapa de conjugación (b) se encuentra en el intervalo de 1×10^2 a 1×10^8 células por centímetro.
8. Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, en el que el tiempo de conjugación/inmovilización (b) se encuentra en el intervalo de 4 a 24 horas.
- 35 9. Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de conjugación/inmovilización (b) se realiza en unas condiciones de temperatura de 37°C , una saturación de CO_2 del 5% y humedad relativa del 95%.
- 40 10. Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, en el que la agitación cuando se utiliza el sistema dinámico en la etapa de conjugación/inmovilización (b) se realizan en un intervalo de 1 a 120 rpm.
11. Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, en el que el rendimiento de inmovilización de la etapa de conjugación/inmovilización (b) es superior al 80% y la viabilidad de las células, determinada mediante tinción de núcleos o ensayos metabólicos indirectos, es superior al 90%.
- 45 12. Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, en el que el acondicionado final se realiza mediante el amalgamado con un gel de fibrina.
13. Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, en el que el acondicionado final se realiza en el momento previo de la aplicación del producto al paciente.
- 50 14. Uso de un producto que comprende células mesenquimales inmovilizadas en una matriz ósea, obtenido mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la fabricación de un medicamento utilizado en la regeneración ósea.
- 55
- 60
- 65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 340 657

② N° de solicitud: 201030238

③ Fecha de presentación de la solicitud: **19.02.2010**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61L 27/38** (2006.01)
A61F 2/28 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 2004059364 A (GASKINS, B.D. et al.) 25.03.2004, resumen; ejemplo 2; reivindicaciones 1-3,13-16,21-22,25-27,30-32.	1,3-7,14
A	ES 2051914 T3 (ITAY, S.) 01.07.1994, reivindicaciones 1,6-8,10.	1,12,14
A	WO 2009036279 A1 (NAUMAN, E.A. et al.) 19.03.2009, reivindicaciones 1-3,12,14.	1,14

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
20.05.2010

Examinador
I. Galíndez Labrador

Página
1/4

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, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.05.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SÍ
	Reivindicaciones	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	US 2004059364 A	25-03-2004
D02	ES 2051914 T3	01-07-1994
D03	WO 2009036279 A1	19-03-2009

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 solicitud a estudio tiene por objeto un procedimiento para la obtención de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración de tejido óseo, que comprende las etapas de:

- Expansión de células mesenquimales y resuspensión en medio DMEM complementado con suero humano al 10% v/v, a una concentración de 1.103-1.107 células/ml.
- Conjugación/inmovilización de las células en matrices óseas de hueso desantigenizado, o desmineralizado y desantigenizado, durante 4-24 horas, a 37°C, a una saturación de CO₂ del 5% y una humedad relativa del 95%, hasta alcanzar un número de células por centímetro cúbico de matriz ósea de 1.102-1.108. Dicho proceso puede ser con o sin agitación.
- Lavado en ciclos del conjugado mediante filtración con solución salina fisiológica.
- Acondicionado/amalgamado final con un gel de fibrina, en el que se emplea una unidad de solución de fibrinógeno por una unidad volumétrica de solución de trombina. Se dota al conjunto de la forma adaptada a la lesión y se emplaza en la misma.

El documento D1 citado en el Informe de Búsqueda trata de un método de producción de fibras óseas que actúan como eficaces sustratos de unión de células con potencial de formación de hueso, p. ej. células madre. En este caso el hueso puede o no estar desmineralizado. Las células se cultivan en medio RPMI suplementado con FCS al 10% y posteriormente se añaden a la matriz ósea hasta alcanzar un número de células por centímetro cúbico de matriz de 5.103-1.104, incubando durante 1 hora sin agitación, a 37°C y lavando después repetidamente.

El documento D2 citado hace referencia a una composición para la reparación de cartílago y hueso y método para su preparación como implante de tejido óseo. Dicha composición consta de células mesenquimales y una cola adhesiva de vehículo de inmovilización, reabsorbible, biológico (BRIV) consistente en fibrinógeno, trombina, cloruro cálcico, inhibidor de proteasa y 10-30% de suero, caracterizada porque la composición contiene 80-160.106 células /cc de BRIV.

El documento D3 citado divulga matrices de hueso esponjoso con segmentos desmineralizados y segmentos mineralizados para la reparación de tejidos dañados que incluyen, entre otras cosas, células madre.

A la vista de dichos documentos, dado que el D1 carece de la fase final de amalgamado con un gel de fibrina, que el D2 inmoviliza las células sobre el gel de fibrina en vez de sobre hueso, y el carácter general del D3, se considera que las reivindicaciones 1-14 cumplen con los requisitos de Novedad y Actividad Inventiva, según los artículos 6 y 8 respectivamente de la Ley 11/1986, de 20 de Marzo, de Patentes.