

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 510 243**

21 Número de solicitud: 201330403

51 Int. Cl.:

**A61L 27/08** (2006.01)

**A61L 27/38** (2006.01)

**A61F 2/30** (2006.01)

**A61F 2/28** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**20.03.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**20.10.2014**

Fecha de la concesión:

**02.09.2015**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**09.09.2015**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2014/070205**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (90.0%)  
Oficina de Transferencia de Resultados de  
Investigación, Complejo Administrativo Triunfo,  
Hospital Real, Cuesta del Hospicio s/n  
18071 Granada (Granada) ES y  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (10.0%)**

72 Inventor/es:

**RUIZ DE ALMODÓVAR RIVERA, José M ;  
MORENO CASTILLA, Carlos;  
LÓPEZ PEÑALVER, Jesús;  
DE ARAÚJO FARIAS, Virginea;  
SIRÉS CAMPOS, Julia y  
OLIVER POZO, Francisco Javier**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **MÉTODO DE OBTENCIÓN DE UN BIOMATERIAL**

57 Resumen:

Método de obtención de un biomaterial.

La presente invención está dirigida a un método de obtención de un biomaterial que comprende un soporte de fibras de carbón activado y células de linaje osteocondral, en el que células madre se ponen en contacto con dicho soporte y se cultivan en presencia de suero y ausencia de factores de diferenciación osteogénica y/o condrogénica adicionales. La invención se dirige asimismo al biomaterial así obtenido y a las diferentes aplicaciones médicas de dicho biomaterial.

ES 2 510 243 B1

**DESCRIPCIÓN**

**MÉTODO DE OBTENCIÓN DE UN BIOMATERIAL**

5

**OBJETO DE LA INVENCION**

La presente invención está relacionada con una metodología para la obtención de un biomaterial que comprende un soporte de fibras de carbón activado, células de linaje osteocondral y matriz extracelular, en donde las células de linaje osteocondral proceden de la diferenciación de células madre en contacto con el soporte de fibras de carbón activado en presencia de un medio de cultivo que comprende suero y que no comprende factores de diferenciación de células madre ni adicionales ni diferentes a los presentes en el suero. La presente invención se relaciona asimismo con el biomaterial directamente obtenido mediante dicha metodología, así como con los usos médicos de dicho biomaterial.

15

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El desarrollo de la ingeniería tisular está orientado en la actualidad a la búsqueda de nuevos biomateriales que permitan, entre otros, la obtención de líneas celulares con capacidad de proliferación y de diferenciación a diversos tejidos.

20

La estructura tridimensional de los diferentes biomateriales proporciona un soporte (*scaffold*) adecuado para la adherencia, proliferación y diferenciación celular en condiciones de cultivo adecuadas.

25

El medio de cultivo habitualmente empleado en la diferenciación de células madre mesenquimales en osteocitos comprende factores tales como dexametasona,  $\beta$ -glicerofosfato o ácido ascórbico, mientras que el medio habitualmente empleado en el caso de diferenciación de dichas células madre en condrocitos comprende factores tales como dexametasona, ácido ascórbico, insulina, transferrina o selenio.

30

Las condiciones de diferenciación de células madre en osteocitos y en condrocitos son conocidas. Adicionalmente, se ha descrito que células madre mesenquimales en cultivo en un medio condicionado condrocítico dan lugar a la formación de cartílago, y que los factores secretados por los condrocitos promueven tanto la condrogénesis como la osteogénesis (Hwang NS *et al.* 2010 J Cell Physiol 212(2): 281-284). También se ha descrito la

35

composición de un medio mínimo para la diferenciación osteocondrocítica (Li J *et al.* 2009 Tissue Eng Part A 15(9): 2481-2490).

5 Es conocido del estado de la técnica el empleo de diferentes soportes para la diferenciación de células madre mesenquimales, tales como soportes de ácido poliglicólico (PGA) o de ácido poli-L-láctico (PLLA) (Zhao L & Detamore MS 2010 J Biomed Sci Eng 3: 1041-1049), soportes basados en geles de fibrina y poli-lacto-co-caprolactona (PLCL) (Jung Y *et al.* 2009 Biomed Mater 4: 1-7), soportes basados en una matriz tridimensional derivada de ácido hialurónico, una matriz tridimensional de material cerámico e ingredientes activos (WO 10 02/070030), soportes basados en policaprolactona (Cao T *et al.* 2003 Tissue Eng 9(1): S103-S112, Shao X *et al.* 2006 Tissue Eng 12(6): 1539-1551), soportes cerámicos porosos de fosfato cálcico (Gao J *et al.* 2001 Tissue Eng 7(4): 363-371), y soportes de nanofibras (Hu J *et al.* 2009 Biomaterials 30(28): 5061-5067). También se han usado carbones 15 activados en polvo y en forma granular procedentes de un carbón bituminoso y de cáscara de coco, respectivamente, como soportes en la diferenciación de células de linaje neuronal (Chen E *et al.* 2012 J Biomed Mater Res A 100(8): 2006-2017).

Se ha descrito anteriormente el empleo de telas de carbón activado como soporte para el crecimiento de células madre mesenquimales y su diferenciación a osteocitos en 20 condiciones de diferenciación osteocítica (Peñalver JL *et al.* 2009 Carbon 47: 3574-3584), o a condrocitos en condiciones de diferenciación condrogénica (V. de Araujo Farias *et al.* 2011 Boletín del Grupo Español del Carbón 22: 7-13).

Composiciones celulares para implante que comprenden osteocitos y condrocitos sobre un 25 soporte tridimensional tapizado con colágeno han sido descritas en la técnica (US2011/0274729 A1).

A la vista del estado de la técnica, es de interés proporcionar metodologías de diferenciación celular basadas en soportes tridimensionales que permitan la diferenciación de células 30 madre en diversos tipos celulares, tales como los implicados en regeneración ósea, osteogénesis y condrogénesis, en condiciones de cultivo adecuadas que permitan la diferenciación simultánea de dichos tipos celulares, ventajosamente en un mismo tipo de soporte y sin requerimiento de múltiples manipulaciones del cultivo.

**DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

Los autores de la presente invención han desarrollado una metodología de diferenciación de células madre sobre un soporte tridimensional que permite la obtención de tipos celulares implicados en regeneración ósea en condiciones de cultivo celular que no requieren factores de diferenciación adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero del cultivo celular.

5 Así, la presente invención está dirigida a un biomaterial que comprende un soporte de fibras de carbón activado, células de linaje osteocondral y matriz extracelular, así como a un método de obtención de dicho biomaterial y a los usos del mismo.

10 Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un método de obtención de un biomaterial que comprende un soporte de fibras de carbón activado, células de linaje osteocondral y matriz extracelular, en donde dicho método comprende

- (i) poner en contacto el soporte de fibras de carbón activado con células madre en condiciones adecuadas de adhesión celular de las células madre sobre el soporte de fibras de carbón activado, y
- 15 (ii) mantener el cultivo celular obtenido en la etapa (i) en presencia de un medio de cultivo adecuado y durante el tiempo suficiente para la diferenciación de las células madre en células de linaje osteocondral y la formación de una matriz extracelular, en donde dicho medio de cultivo comprende suero adecuado para el cultivo celular y en donde dicho medio de cultivo no ha sido suplementado con al  
20 menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero.

25 En un segundo aspecto, la invención se relaciona con el biomaterial obtenible mediante el método indicado anteriormente.

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con el uso del biomaterial obtenible mediante el método indicado anteriormente para preparar un medicamento.

30 En un último aspecto, la invención se relaciona con el uso del biomaterial obtenible mediante el método indicado anteriormente para preparar un medicamento para el tratamiento de una patología ósea, de una patología condrogénica, de una patología que cursa con una lesión condral, de una patología que cursa con una lesión ósea o de una patología que cursa con una lesión osteocondral.

35

**DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Estas y otras características y ventajas de la invención, se pondrán más claramente de manifiesto a partir de la descripción detallada que sigue de una forma preferida de realización, dada únicamente a título de ejemplo ilustrativo y no limitativo, con referencia a las figuras que se acompañan.

5

**Figura 1. (A)** Micrografía SEM de la tela de carbón activado (TCA). **(B)** Isoterma de adsorción-desorción N<sub>2</sub> a -196 ° C; adsorción (triángulos negros), desorción (triángulos de color gris).

10 **Figura 2.** Cinética de crecimiento de células madre mesenquimales humanas derivadas del estroma del cordón umbilical (UCSSC) cultivadas sobre tela de carbón activado (TCA). **(A)** Histograma de la cantidad de núcleos contados en función del tiempo de cultivo. Obsérvese que desde 3 a 17 días hay un aumento progresivo en el número de células. La disminución en el número de células que se ve a los 21 días está asociada con el pico en la intensidad de la señal autofluorescente. **(B)** Regresión lineal de los datos correspondientes a la fase de crecimiento inicial. El tiempo de duplicación de las células en esta fase era  $T_D = 88 \pm 15$  horas,  $R^2 = 0.987$  ( $P < 0,001$ ).

15 **Figura 3.** Cinética de crecimiento de UCSSCs cultivadas sobre TCA en medio de diferenciación específico de osteocitos y condrocitos. Los datos se representan como barras para cada tiempo de cultivo. **(A)** Histograma del proceso de crecimiento y diferenciación inducida hacia osteocitos. **(B)** Histograma de la cinética de crecimiento de células en medio de diferenciación condrocítica. Las diferencias entre cada una de las columnas se calcularon por ANOVA, aplicando después el test de Bonferroni. Cuando las diferencias son estadísticamente significativas se señalan en el gráfico (\*\* $P < 0,001$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*  $P < 0,05$ ).

20 **Figura 4.** Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) de la superficie de una TCA. La energía de enlace de los electrones con su átomo se representa en el eje X (eV), mientras que la intensidad de la señal medida en unidades relativas de área se representa en el eje Y (unidades arbitrarias x 10<sup>-3</sup>).

30 **Línea A:** Experimento de control. El espectro general de la TCA pura muestra la composición de este material, con fotoelectrones C<sub>1s</sub> a 288,6 eV, que es el pico principal (98%), y el que se usó como patrón interno, y un pico muy bajo en 532,4 eV, producido por fotoelectrones O<sub>1s</sub> (<2%).

35 **Línea B.** Los cambios en el espectro de fotoelectrones son debidos a la adsorción sobre la

TCA de aminoácidos, sales y otras moléculas presentes como componentes del medio de cultivo para la inducción de diferenciación de condrocitos (MDC). Cabe destacar el cambio en la forma del pico  $C_{1s}$ , la presencia de fotoelectrones  $N_{1s}$  a aproximadamente 400 eV y el aumento en el área del pico de  $O_{1s}$ .

5 **Línea C.** El espectro general obtenido para la TCA saturada con medio de cultivo para la inducción de diferenciación de osteocitos (MDO) es muy similar a la observada para MDC a pesar de la presencia de un suplemento de 10% de suero fetal bovino en el medio MDO y su ausencia en el medio MDC. No obstante, hay que señalar la presencia de dobletes fotoelectrónicos característicos del  $Ca_{2p}$  con la contribución  $Ca_{2p3/2}$  a 347,2 eV y el pico representativo de energía de enlace del fotoelectrón de  $P_{2p}$  a 131,2 eV (Ferraz et al., 1999),  
10 Estos picos (Ca y P) son debidos a los suplementos específicos que se adicionan al medio utilizado para la diferenciación osteogénica de las células madre.

**Líneas D, E y F.** Resultados correspondientes al estudio de una superficie de TCA después de un cultivo de UCSSCs durante 21 días en medio sin factores de diferenciación de células madre (D) y en el medio de cultivo que contiene los factores químicos y proteicos empleados para inducir la diferenciación a osteocitos (E) y condrocitos (F). Obsérvese en **D, E y F** de la presencia de  $Ca_{2p}$  con una contribución  $Ca_{2p3/2}$  a la energía de 347,2 eV y  $P_{2p}$  a 131,2 eV y su tamaño.  
15

20 **Figura 5. (A)** Espectro multi-región de fotoelectrones de  $N_{1s}$ . La deconvolución del espectro permite calcular las áreas correspondientes a los espectros del  $N_{1s}$  tanto en el grupo amida a  $400,6 \pm 0,3$  eV como al grupo amina a  $399,2 \pm 0,2$  eV, presentes en la superficie de la TCA después de 3 semanas de cultivo de las células UCSSCs en un medio que contiene los suplementos necesarios para inducir su diferenciación condrogénica. **(B)** Espectro XP de alta resolución de fotoelectrones de  $O_{1s}$  arrancados de la superficie de TCA en las que se  
25 habían cultivado UCSSCs (durante 21 días) en medio con los suplementos necesarios para la diferenciación condrogénica. El pico  $O_{1s}$  contiene un componente principal que corresponde al oxígeno enlazado a carbono  $O = C - N$ , que forma el enlace peptídico y que resulta a una energía de enlace de  $532,4 \pm 0,3$  eV.

30 **Figura 6.** Presencia, en función del tiempo, en la superficie de la TCA de átomos de: **(A)** oxígeno perteneciente a los enlaces peptídicos; **(B)** nitrógeno que perteneciente a los enlaces peptídicos, y **(C)** nitrógeno que pertenece a los grupos amina. **(D)** Nótese que la relación C/N disminuye desde un valor de 5,5 hasta alcanzar el valor de a 3,6 a los 21 días  
35 de cultivo. Los valores C/N de todas las columnas son estadísticamente diferentes del valor de la relación a los 3 días ( $P < 0,001$ ). La evolución de los datos de C/N en función del

tiempo muestra una aproximación gradual a la teórica relación C / N = 2,94, correspondiente a colágeno puro. (E) Para los mismos tiempos de cultivo la relación O/N osciló entre 4,2 y 2,9 ( $P > 0,001$ ); el valor teórico de esta relación correspondiente al colágeno puro es de alrededor de 1,83. Estas cifras son coherentes con la densidad atómica relativa de los átomos de C, O y N en la superficie de la molécula de colágeno y los cambios podrían ser interpretados como un reflejo del enriquecimiento de colágeno dentro de la matriz extracelular (MEC), así como del auto-ensamblaje de las fibrillas para generar ordenamientos supra-fibrilares. (F) La relación Ca/P varió desde 0,92 hasta 1,37, siendo las diferencias de este valor entre los días 3 y 14 a 21 días estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), lo que sugiere que la mineralización de la MEC evoluciona para aproximarse a valores cercanos a los de la forma cristalina de la hidroxiapatita ( $\text{Ca} / \text{P} = 1,60$ ). La significación estadística de diferencias entre cada una de las columnas se calculó mediante ANOVA seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni o comparación múltiple post-test de Dunnett. Los resultados se han marcados en el gráfico cuando las diferencias resultaron estadísticamente significativas ( $*** P < 0,001$ ,  $** P < 0,01$ ,  $* P < 0,05$ ).

**Figura 7.** Estudio mediante SEM de UCSSCs en diferentes condiciones de cultivo: (A) UCSSCs tras 21 días de cultivo en ausencia de factores químicos o proteicos para inducir la diferenciación. En las imágenes es posible identificar procesos dendríticos largos y, en la parte inferior de la figura, una fibra de carbón activado, sobre la que hay numerosas fibrillas pertenecientes a las células, o a las proteínas de la MEC, que parecen ancladas a los microporos de las fibras de carbón activado del soporte. A este tipo de fibrillas, cuyo diámetro no se ha medido, las hemos clasificado como de tipo I. (B) Imagen de UCSSCs cultivadas en un medio de diferenciación de condrocitos durante 35 días; en ella es posible ver una malla de colágeno tridimensional que se extiende por todo el soporte de TCA. La mayoría de las fibrillas identificables fueron clasificadas como tipo II y su diámetro se midió bajo todas las condiciones en las que las células UCSSC se cultivaron. En el centro de la imagen hay un recuadro negro que se muestra ampliado en C: Las fibras aquí visibles han sido clasificadas como de tipo III, y sugieren la existencia de un proceso de auto-ensamblaje de fibrillas de colágeno para producir estructuras suprafibrilares. La flecha blanca señala una estructura en la que se pueden identificar estriaciones periódicas en la agrupación suprafibrilar producida. La periodicidad de esas estructuras, medida por la distancia media entre dos bandas adyacentes (Image J) fue de, aproximadamente, 135 nm. D: Histograma de los diámetros de las fibrillas medidos en las imágenes SEM de crecimiento UCSSC en TCA en condiciones control (tipo IIa), osteogénico (tipo IIb) y condrogénico (tipo IIc) después de 21 días de cultivo en comparación con el diámetro de las fibrillas de tipo III. Las

diferencias de diámetro entre las fibrillas de tipo II y tipo III es muy significativo; el diámetro medio de la fibrillas de tipo III es de aproximadamente tres veces mayor que la de tipo II.

\* Las barras de escala en **(A)** y **(B)** corresponden a 20  $\mu\text{m}$  y en **(C)** a 5  $\mu\text{m}$ .

5 **Figura 8.** Ejemplos de las fibras medidas en la invención. **(A)** En la estructura de la TCA (marcados con un asterisco, \*) pueden discernirse numerosos microfilamentos unidos a la superficie del carbón. La muestra corresponde a un experimento de diferenciación de UCSSCs a osteocitos examinados a los 14 días. Estas fibras se denominan tipo I, como en la figura anterior. **(B)** muestra correspondiente a un experimento con cultivos UCSSC bajo  
10 condiciones de control examinados a los 21 días. En la microfotografía hay numerosas fibras tipo II (marcadas con \*\*). También pueden distinguirse procesos dendríticos y materiales formados por la secreción celular. **(C)** Las fibras de tipo III (marcado con \*\*\*) son fácilmente identificables en cultivos de más de 4 semanas. En este caso la imagen corresponde a un  
15 experimento con UCSSCs cultivadas en un medio para estimular la diferenciación hacia linajes osteoblástico. Destacan los diferentes espesores de las fibras y la presencia de dos esferulitas, que se consideran un depósito inicial de hidroxapatita. En **(D)** se representa el histograma de distribución de frecuencias de la anchura de las fibras medidas en la invención. No se midieron fibras de tipo I que se suponen menores de 10-20 nm. El histograma muestra una distribución bimodal con máximos aproximadamente centrados en  
20 60 y 160 nm respectivamente.

**Figura 9.** Microscopía electrónica de barrido (SEM) con análisis de energía dispersiva de rayos X (EDA). Esta imagen confirma la presencia en la TCA de mineralización que espontáneamente se produce a causa del cultivo sobre ella, de células UCSSC. Destaca la  
25 presencia de una fibra de carbono, de restos de células y de abundante material de secreción, así como de gran cantidad de microfilamentos y fibras dentro de la MEC. Los espectros de EDA muestran la presencia en el cristal de C, O, Ca y Mg de lo que se deduce que el cristal es un carbonato de calcio y magnesio tal y como la dolomita.

### 30 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Los autores de la invención han desarrollado un método que, mediante el uso de telas de carbón activado (TCA) como soporte, permite la diferenciación espontánea de células madre cultivadas sobre dicho soporte en presencia de un medio de cultivo suplementado  
35 únicamente con suero fetal bovino y sin necesidad de factores de crecimiento adicionales. Tal como se muestra en el Ejemplo 1 de la presente invención, las imágenes de microscopía

confocal y de microscopia electrónica de barrido, así como las técnicas de espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS), ponen de manifiesto la formación de abundante matriz extracelular (MEC) compuesta mayoritariamente por colágeno, con presencia de osteopontina, hidroxiapatita y cristales de carbonato de calcio y magnesio que son productos de la mineralización de la matriz extracelular ocasionada por la diferenciación de las células UCSSC hacia linajes condro-osteoblásticos. Los inventores han demostrado que las telas de carbón activado inducen la diferenciación espontánea de las células madre mesenquimales en ausencia de suplementos adicionales, tanto químicos como biológicos, evitando así el uso de xenobióticos. Estos resultados sugieren nuevas posibilidades para el estudio de cuestiones biológicas fundamentales necesarias para abordar el tratamiento de las enfermedades óseas traumáticas y degenerativas.

#### Definiciones

15 El término "ácido ascórbico" hace referencia al ácido orgánico cuya forma L se conoce como vitamina C, siendo una vitamina hidrosoluble que no es sintetizada por el ser humano. La deficiencia de vitamina C causa escorbuto.

20 El término "aminoácidos no esenciales" o "NEAA" hace referencia a aquellos aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas en un sujeto y que no resultan esenciales puesto que pueden ser sintetizados por dicho sujeto. Tales aminoácidos no esenciales son añadidos en algunas formulaciones de medios de cultivo celular para reducir la carga metabólica de las células permitiendo un aumento en la proliferación celular. Los aminoácidos no esenciales incluyen alanina, asparagina, ácido aspártico, glicina, ácido glutámico, prolina y serina. Los aminoácidos no esenciales pueden formar parte del medio de cultivo, o bien formar parte de una solución madre estéril que es añadida al medio de cultivo.

30 El término "biomaterial" empleado en la presente invención hace referencia a materiales aptos para entrar en contacto con los tejidos de un sujeto con propósitos terapéuticos específicos, de diagnóstico, o con propósitos preventivos. Estos materiales deben ser biocompatibles, es decir, no deben causar ninguna respuesta adversa significativa del organismo vivo tras la interacción del biomaterial con los tejidos y fluidos corporales y, en ocasiones, debe biodegradarse, ya sea química o físicamente, o por una combinación de ambos procesos, para dar origen a componentes no tóxicos. El biomaterial de acuerdo a la presente invención comprende un soporte de fibras de carbón activado, células de linaje

osteocondral y matriz extracelular.

El término “célula de linaje osteocondral”, denominado alternativamente como “célula de linaje osteocondrogénico” o “célula de linaje condro-osteogénico” hace referencia en la presente invención a aquella célula de linaje osteogénico (osteocondral) o de linaje condrogénico procedente de la diferenciación de una célula madre hacia el linaje osteogénico o el linaje condrogénico. El término “linaje condrogénico” hace referencia a todas aquellas células en diferente grado de diferenciación, y cuya diferenciación está comprometida hacia el linaje condrogénico, tales como condroblastos y condrocitos. Las células de linaje condrogénico muestran marcadores de diferenciación de linaje condrogénico. El término “linaje osteogénico” hace referencia a todas aquellas células en diferente grado de diferenciación, y cuya diferenciación está comprometida hacia el linaje condrogénico, tales como condroblastos y condrocitos. Las células de linaje osteogénico y de linaje condrogénico muestran marcadores de diferenciación específicos de esos linajes

Marcadores de diferenciación osteogénica incluyen osteocalcina (OC), osteopontina (OP), osterix (SP7), fosfatasa alcalina específica de hueso (un marcador temprano de diferenciación osteogénica, también denominado AP o ALP), sialoproteína ósea (BSP), receptor alfa del factor de crecimiento obtenido de plaquetas (PDGF-Ra), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y colágeno de tipo I. Marcadores de diferenciación condrogénica incluyen agregano, colágeno, osteopontina (marcador temprano de diferenciación condrogénica), fosfatasa alcalina y colágeno tipo II (marcador temprano de diferenciación condrogénica).

El término “célula madre” hace referencia a una célula con capacidad clonogénica, de autorrenovación y de diferenciación en múltiples linajes celulares. En particular, las células madre mesenquimales tienen la capacidad de proliferar extensamente y formar colonias de células fibroblásticas. Tal como se usa en la presente invención, la expresión “célula madre” se refiere a una célula pluripotente o multipotente, capaz de generar uno o más tipos de células diferenciadas, y que además posee la capacidad de auto regenerarse, es decir, de producir más células madre. Las “células madre totipotentes” pueden dar lugar tanto a los componentes embrionarios (como por ejemplo, las tres capas embrionarias, el linaje germinal y los tejidos que darán lugar al saco vitelino), como a los extraembrionarios (como la placenta). Es decir, pueden formar todos los tipos celulares y dar lugar a un organismo completo. Las “células madre pluripotentes” pueden formar cualquier tipo de célula correspondiente a los tres linajes embrionarios (endodermo, ectodermo y

mesodermo), así como el germinal y el saco vitelino. Pueden, por tanto, formar linajes celulares pero a partir de ellas no se puede formar un organismo completo. Las “células madre multipotentes” son aquellas que sólo pueden generar células de su misma capa o linaje embrionario de origen. La médula ósea alberga al menos dos poblaciones de células madre distintas: células madre mesenquimales (MSCs) y células madre hematopoyéticas (HSCs). En el contexto de la presente invención, las células madre son seleccionadas del grupo que comprende células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre adultas, o combinaciones de las mismas. En una realización particular, las células madre son células madre de un mamífero, preferiblemente humanas. En una realización particular, las células madre son células madre mesenquimales, preferiblemente células madre mesenquimales humanas.

El término “célula madre adulta” se refiere a aquella célula madre que es aislada de un tejido o un órgano de un animal en un estado de crecimiento posterior al estado embrionario. Preferiblemente, las células madre de la invención son aisladas en un estado postnatal. Preferiblemente son aisladas de un mamífero, y más preferiblemente de un humano, incluyendo neonatos, juveniles, adolescentes y adultos. Se pueden aislar células madre adultas de una gran variedad de tejidos y órganos, como médula ósea (células madre mesenquimales, células progenitoras adultas multipotentes y células madre hematopoyéticas), tejido adiposo, cartílago, epidermis, folículo piloso, músculo esquelético, músculo cardíaco, intestino, hígado, neuronal.

El término “célula madre embrionaria” o “ESC” son células derivadas de masa celular interna de embriones en estadio de blastocisto, con capacidad de auto-renovación y de diferenciación en todos los tipos de células adultas. Las células madre embrionarias son capaces de proliferar indefinidamente *in vitro* manteniéndose en un estado indiferenciado y con un cariotipo normal a través del cultivo prolongado. También tienen la capacidad de diferenciarse en células de las tres capas germinales embrionarias (mesodermo, endodermo y ectodermo; (Itskovitz-Eldor, et al., Mol. Med. 6:88-95, 2000) y linaje germinal. Las células madre embrionarias representan un modelo de sistema de gran alcance para la investigación de los mecanismos que subyacen a la biología de células pluripotentes y la diferenciación en el embrión temprano, así como proporcionar oportunidades para la manipulación genética. Las células madre embrionarias han sido aislados de la MCI de embriones en estadio de blastocisto especies múltiples (Bhattacharya, et al., BMC Dev. Biol.. 5:22, 2005), incluidos los ratones (Solter y Knowles, Proc. Natl. Acad. EE.UU. 75:5565-

5569, 1978.), porcina (Chen, et al., Theriogenology 52:195-212, 1999), y los primates no humanos (Thomson, et al., Proc. Natl. Acad. EE.UU. 92 , 7844-7848, 1995).

5 La invención contempla el uso de células madre embrionarias procedentes de líneas celulares establecidas de origen murino tales como las líneas 59B5, 36.5, 9TR#1, TK#1, ES-D3 [D3], YS001, ES-E14TG2a, ES-D3, 10P12, 56B3,L Wnt-3A, OP9, 3T3 MEFs WT, 3T3 MEFs KO, 127TAg, 151TAg, WPE-stem, NE-4C, NE-GFP-4C, ES-C57BL/6, J1, R1, RW.4, B6/BLU, SCC#10, EDJ#22, AB2.2, Ainv15, 7AC5/EYFP, R1/E, G-Olig2, CE-1, CE3,y hESC BG01V todas las cuales se encuentran disponibles en repositorios públicos.

10 Métodos para la obtención de células madre embrionarias son ampliamente conocidos y pueden ser puestos en práctica por el experto sin necesidad de experimentación excesiva. Células embrionarias de primates se pueden aislar de blastocistos de distintas especies de primates (Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7844).

15 Con el fin de evitar el uso de embriones humanos, es posible el uso de animales transgénicos no humanos como fuente de células madre embrionarias. En particular, US5.523.226 describe métodos para generar credos transgénicos que pueden ser usados como donantes para xenotransplantes a humanos. WO97/12035 describe métodos para producir animales transgénicos adecuados para xenotransplantes. Asimismo, WO01/88096 describe tejidos animales inmunocompatibles. Estos animales inmunocompatibles se pueden usar para generar células embrionarias pluripotentes tal y como se ha descrito en US6.545.199.

20 Asimismo, es posible el uso de líneas de células troncales embrionarias, que pueden ser de distinto origen. En una forma de realización, las líneas celulares son de ratón e incluyen células tales como la línea R1 (ATCC No. SCRC-1011) descrita por Nagy *et al.*, (Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1993, 90:8424-8428) y la línea celular D3.

25 El término "célula madre hematopoyética" o "HSC" hace referencia a una célula madre adulta con capacidad de dar lugar a los linajes hematopoyéticos tanto mieloides (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas) como linfoides (linfocitos T, células B, células NK). Este tipo celular se encuentra fundamentalmente en la médula ósea.

30 El término "célula madre mesenquimal" o "MSC", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula de estroma multipotente, originada a partir de la capa germinal mesodermal, que puede diferenciarse en una variedad de tipos de células, incluyendo

osteocitos (células de hueso), condrocitos (células de cartílago) y adipocitos (células de grasa). Los marcadores expresados por las células madre mesenquimales incluyen CD105 (SH2), CD73 (SH3/4), CD44, CD90 (Thy-1), CD71 y Stro-1 así como las moléculas de adhesión CD106, CD166, y CD29. Entre los marcadores negativos para las MSCs (no expresados) están los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, CD14, y las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 así como la molécula de adhesión CD31. Las MSC pueden ser obtenidas a partir de, sin quedar limitado a, médula ósea, tejido adiposo (tal como el tejido adiposo subcutáneo), hígado, bazo, testículos, sangre menstrual, fluido amniótico, páncreas, periostio, membrana sinovial, músculo esquelético, dermis, pericitos, hueso trabecular, cordón umbilical humano, pulmón, pulpa dental y sangre periférica. Las MSC de acuerdo con la invención pueden obtenerse a partir de cualquiera de los tejidos anteriores, tal como a partir de médula ósea, de tejido adiposo subcutáneo o de cordón umbilical. Se pueden aislar MSC de médula ósea mediante procedimientos conocidos por el experto en la materia. En general, dichos métodos consisten en aislar células mononucleares mediante centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll, Percoll) de aspirados de médula ósea, y posteriormente sembrar las células aisladas en placas de cultivo de tejido en medio que contiene suero fetal bovino. Estos métodos se basan en la capacidad de las MSC de adherirse al plástico, de forma que mientras que las células no adherentes se retiran del cultivo, las MSC adheridas pueden expandirse en placas de cultivo. Las MSC también pueden aislarse de tejido adiposo subcutáneo siguiendo un procedimiento similar, conocido para el experto en la materia. Un método para aislar MSC de médula ósea o de tejido adiposo subcutáneo ha sido descrito previamente (De la Fuente et al., Exp. Cell Res. 2004, Vol. 297: 313:328). En una realización particular de la invención, las células madre mesenquimales son obtenidas a partir de cordón umbilical, preferiblemente de cordón umbilical humano.

Los términos “célula madre pluripotente” o “célula troncal pluripotente” y equivalentes gramaticales se usan de forma indistinta en el contexto de la presente invención para referirse a células no diferenciadas o poco diferenciadas, de cualquier especie, con capacidad para dividirse indefinidamente sin perder sus propiedades y capaces de formar cualquier célula de los tres linajes embrionarios (mesodermo, endodermo, ectodermo) y linaje germinal así como el linaje germinal cuando se cultivan en ciertas condiciones. La invención contempla el uso de cualquier tipo de célula madre pluripotente que sea capaz de generar una progenie de cualquiera de las tres capas germinativas incluyendo células derivadas de tejido embrionario, tejido fetal, tejido adulto y otras procedencias. Células pluripotentes adecuadas para su uso en la presente invención incluyen células madre

embrionarias, células de carcinoma embrionario, células pluripotentes inducidas (iPS) y células germinales primordiales. Asimismo, la invención contempla el uso de células madre pluripotentes de cualquier especie incluyendo, sin limitación, células humanas, de ratón, de rata, bovinas, de oveja, de hámster, de cerdo y similares.

5

El término “célula madre pluripotente inducida” o “iPS”, según se usa en la presente invención, se refiere a células que son sustancialmente idénticas genéticamente a una célula somática diferenciada de la que derivan pero que muestran características similares en cuanto a diferenciación y capacidad proliferativa a las células madre embrionarias pluripotentes. Típicamente, las iPS expresan en su superficie uno o varios marcadores seleccionados del grupo formado por SSEA-3, SSEA-4, TRA-1 -60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E y Nanog. Típicamente, las iPS expresan uno o varios genes seleccionados del grupo de Oct-3/4, Sox2, Nanog, GDF3, REX1, FGF4, ESG1, DPP A2, DPP A4 y hTERT. Las iPS pueden generarse usando métodos descritos en el estado de la técnica tales como los métodos descritos por Takahashi y Yamanaka (Cell, 2006, 126:663-676), Yamanaka et al. (Nature, 2007, 448:313-7), Wernig et al. (Nature, 2007, 448:318-24), Maherali (Cell Stem Cell, 2007, 1:55-70); Maherali y Hochedlinger (Cell Stem Cell, 2008, 3:595-605), Park et al. (Cell, 2008, 134:1-10); Dimos et al. (Science, 2008, 321:1218-1221), Bliloch et al. (Cell Stem Cell, 2007, 1:245-247); Stadtfeld et al. (Science, 2008, 322:945-949) y Okita et al. (Science, 2008, 322: 949-953). Son células reprogramadas *in vitro* a partir de células somáticas diferenciadas de manera terminal mediante transducción retroviral de los factores de transcripción Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc. Típicamente, las células iPS se obtienen a partir de células somáticas mediante la expresión en dichas células de las proteínas Oct- 3/4 y Sox2, de las proteínas Oct-3/4, Sox2 y Klf4, de las proteínas Oct-3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc y/o de las proteínas Oct-4, Sox2, Nanog y LIN28.

25

El término “condiciones adecuadas para la adhesión celular”, hace referencia a las condiciones particulares que permiten que las células madre se adhieran a la superficie del soporte de fibras de carbón activado de acuerdo a la invención. En una realización particular, las células madre se adhieren a la superficie del soporte de fibras de carbón activado en presencia de polímeros que promueven la adhesión celular. El término “polímero que promueve la adhesión celular” hace referencia a un compuesto que facilita que las células de adhieran a la superficie de un soporte. Tales polímeros comprenden, sin limitarse a, colágeno, fibronectina, laminina, poli-lisina, gelatina y combinaciones de los mismos. En una realización alternativa preferida de la invención, las células madre se adhieren a la superficie del soporte de fibras de carbón activado en ausencia de tales polímeros que

35

embrionarias, células de carcinoma embrionario, células pluripotentes inducidas (iPS) y células germinales primordiales. Asimismo, la invención contempla el uso de células madre pluripotentes de cualquier especie incluyendo, sin limitación, células humanas, de ratón, de rata, bovinas, de oveja, de hámster, de cerdo y similares.

5

El término “célula madre pluripotente inducida” o “iPS”, según se usa en la presente invención, se refiere a células que son sustancialmente idénticas genéticamente a una célula somática diferenciada de la que derivan pero que muestran características similares en cuanto a pluripotencialidad y capacidad proliferativa a las células madre embrionarias.

10 Típicamente, las iPS expresan en su superficie uno o varios marcadores seleccionados del grupo formado por SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E y Nanog. Típicamente, las iPS expresan uno o varios genes seleccionados del grupo de Oct-3/4, Sox2, Nanog, GDF3, REX1, FGF4, ESG1, DPP A2, DPP A4 y hTERT. Las iPS pueden generarse usando métodos descritos en el estado de la técnica tales como los métodos  
 15 descritos por Takahashi y Yamanaka (Cell, 2006, 126:663-676), Yamanaka et al. (Nature, 2007, 448:313-7), Wernig et al. (Nature, 2007, 448:318-24), Maherali (Cell Stem Cell, 2007, 1:55-70); Maherali y Hochedlinger (Cell Stem Cell, 2008, 3:595-605), Park et al. (Cell, 2008, 134:1-10); Dimos et al. (Science, 2008, 321:1218-1221), Bliloch et al. (Cell Stem Cell, 2007, 1:245-247); Stadtfeld et al. (Science, 2008, 322:945-949) y Okita et al. (Science, 2008, 322:  
 20 949-953). Son células reprogramadas *in vitro* a partir de células somáticas diferenciadas de manera terminal mediante transducción retroviral de los factores de transcripción Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc. Típicamente, las células iPS se obtienen a partir de células somáticas mediante la expresión en dichas células de las proteínas Oct- 3/4 y Sox2, de las proteínas Oct-3/4, Sox2 y Klf4, de las proteínas Oct-3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc y/o de las proteínas Oct-4,  
 25 Sox2, Nanog y LIN28.

El término “condiciones adecuadas para la adhesión celular”, hace referencia a las condiciones particulares que permiten que las células madre se adhieran a la superficie del soporte de fibras de carbón activado de acuerdo a la invención. En una realización  
 30 particular, las células madre se adhieren a la superficie del soporte de fibras de carbón activado en presencia de polímeros que promueven la adhesión celular. El término “polímero que promueve la adhesión celular” hace referencia a un compuesto que facilita que las células de adhieran a la superficie de un soporte. Tales polímeros comprenden, sin limitarse a, colágeno, fibronectina, laminina, poli-lisina, gelatina y combinaciones de los mismos. En  
 35 una realización alternativa preferida de la invención, las células madre se adhieren a la superficie del soporte de fibras de carbón activado en ausencia de tales polímeros que

promueven la adhesión celular. En una realización particular de acuerdo a la invención, el valor de pH del medio de cultivo en presencia del cual las células madre se adhieren sobre el soporte de fibras de carbón activado y se diferencian en células de linaje osteocondral es similar al pH del punto de carga cero (pH<sub>PCC</sub>, valor de pH en el que la superficie del soporte de fibras de carbón activado carece de carga neta) del soporte de fibras de carbón activado según la invención. Es decir, el pH del punto de carga cero del soporte de carbón activado es tal que permite la adhesión, principalmente mediante interacciones hidrófobas, y el cultivo de las células madre sobre dicho soporte. En una realización preferida de la invención el pH del punto de carga cero tiene un valor comprendido entre 6 y 9, preferiblemente entre 7 y 8, aún más preferiblemente entre 7,2 y 7,6.

La expresión "condiciones adecuadas para la adhesión celular", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a condiciones de cultivo adecuadas que permiten tanto la adhesión de las células madre sobre el soporte de carbón activado como su viabilidad sobre dicho soporte, en particular a las condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica adecuadas para la adhesión y viabilidad de las células madre sobre el soporte de carbón activado.

La expresión "condiciones adecuadas para la diferenciación celular", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a las condiciones de cultivo (medio de cultivo, temperatura, pH, etc) que permiten que se produzca una diferenciación de las células madre precursoras hacia células diferenciadas maduras o hacia células en diferentes estadios de diferenciación. En particular, esta expresión se refiere a las condiciones que permiten la diferenciación de células madre en células de linaje osteocondral.

El término "condiciones adecuadas para la proliferación o expansión celular", tal como se usa en la presente invención, se refiere a las condiciones de cultivo (medio de cultivo, temperatura, pH, etc.) que permiten que se produzca un incremento del número de células por división celular, en particular, del número de células madre.

El término "condrocito" empleado en la presente invención hace referencia a un tipo celular presente en el cartílago, responsable de la producción y mantenimiento de la matriz cartilaginosa, la cual comprende fundamentalmente colágeno y proteoglicanos. La organización de este tipo celular en el cartílago difiere en función del tipo de cartílago y el tejido en donde se encuentre. En referencia al hueso o al cartílago, las células madre mesenquimales (de origen mesodérmico) se diferencian hacia el linaje osteocondrogénico. Dichas células madre mesenquimales no diferenciadas proliferan y se acumulan en un

conjunto denso de células condrogénicas (cartílago) en el centro de condricación. Estas células condrogénicas se diferencian a condroblastos capaces de sintetizar la matriz extracelular del cartílago, que comprende proteoglucanos, glucosaminoglucanos de bajo potencial osmótico y fibras. A continuación, los condroblastos quedan confinados en un espacio pequeño o laguna que ya no está en contacto con la matriz de nueva creación y que contiene líquido extracelular. El condroblasto en dicho estadio es el condrocito, que es generalmente inactivo pero aún pueden secretar y degradar la matriz dependiendo de las condiciones.

El término "colágeno", tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a una proteína que forma fibras y está presente en la matriz extracelular de todos los animales. El colágeno está constituido por tres cadenas polipeptídicas, denominadas cadenas  $\alpha$ , que se ensamblan intracelularmente mediante puentes de hidrógeno para formar una cadena de procolágeno en forma de triple hélice. Las cadenas de colágeno son ricas en prolina o hidroxiprolina y glicina, residuos fundamentales para la formación de la superhélice. El procolágeno se secreta al espacio extracelular para dar lugar al tropocolágeno. Varias moléculas de tropocolágeno se unen entre sí mediante enlaces entre determinados aminoácidos, como lisina, para formar fibrillas y fibras de colágeno. El término colágeno incluye tanto las hélices  $\alpha$  como el procolágeno, el tropocolágeno y todas las estructuras de fibrillas y fibras a las que dan lugar. Se conocen hasta 21 tipos de colágeno (colágeno tipo I-colágeno tipo XXI).

El término "cultivo" o "cultivo celular" empleado en la presente invención hace referencia al crecimiento de células o de tejidos en un medio adecuado. En la presente invención, dicho cultivo celular se refiere a un crecimiento de las células *in vitro*. En tal cultivo celular, las células proliferan, pero no se organizan en los tejidos *per se*. El término "cultivo adicional" se refiere a cultivar una célula o tejido hasta una determinada fase de crecimiento para, a continuación, utilizar otro método de cultivo para hacer que dicha célula o tejido alcance otra etapa de crecimiento. Un "cultivo en monocapa" se refiere a un cultivo en el que las células se multiplican en un medio adecuado mientras permanecen unidas entre sí y a un sustrato. Además, un "cultivo en suspensión" se refiere a un cultivo en el que las células se multiplican, en suspensión en un medio adecuado. Del mismo modo, un "cultivo de flujo continuo" se refiere al cultivo de células o explantes en un flujo continuo de medio fresco para mantener el crecimiento celular, por ejemplo, viabilidad. El término "medios condicionados" se refiere al sobrenadante, por ejemplo, libre de los cultivos de células/tejido, resultando después de un período de tiempo en contacto con las células cultivadas de tal

manera que los medios han sido modificado para incluir determinados factores paracrinicos y /  
o autocrinicos producidos por las células y que se secretan en el cultivo. Un "cultivo  
confluyente" es un cultivo de células en las que todas las células están en contacto y por lo  
tanto toda la superficie del recipiente de cultivo está cubierta, e implica que las células hayan  
5 alcanzado su máxima densidad, aunque confluencia no significa necesariamente que la  
división celular cese o que la población deje de aumentar de tamaño.

El término "dexametasona" hace referencia a un glucocorticoide sintético con capacidad  
antiinflamatoria e inmunosupresora. Se ha descrito que este factor como un estímulo  
10 osteogénico, junto con el ácido ascórbico y el fosfato inorgánico, promueve la diferenciación  
de células madre mesenquimales a osteoblastos.

El término "diferenciación" hace referencia a la formación de células que expresan  
marcadores asociados con células más especializadas y más próximas a convertirse en  
15 células terminalmente diferenciadas, que son incapaces de división o diferenciación  
adicional. Los términos diferenciación "adicional" o "mayor", en un contexto de  
diferenciación, se refieren a la diferenciación de células que están más especializadas y más  
próximas a convertirse en células terminalmente diferenciadas, incapaces de división o  
diferenciación adicional, que las células a partir de las cuales fueron cultivadas. El término  
20 "diferenciación final" se refiere a aquellas células que se han convertido en células  
terminalmente diferenciadas, incapaces de división o diferenciación adicional. Durante este  
proceso, cada tipo celular expresa un perfil génico característico, que marca la capacidad  
proliferativa de cada tipo celular y su forma de responder a cada tipo de estímulo. Las  
células sufren modificaciones citológicas que dan lugar a formas y funciones determinadas  
25 durante el desarrollo embrionario o durante la vida de un organismo pluricelular,  
especializándose en un tipo celular. La diferenciación celular supone un proceso biológico  
de especialización celular que permite que células con información genética idéntica den  
lugar a células diferentes entre sí, tanto estructural como funcionalmente, de acuerdo a las  
necesidades del organismo. En el contexto de la presente invención, la diferenciación celular  
30 se produce a partir de células madre, preferiblemente células madre mesenquimales, en  
particular células madre mesenquimales humanas, más en particular células madre  
mesenquimales procedentes de cordón umbilical humano. Dichas células madre se  
diferencian en células de linaje osteocondral, condroblastos/condrocitos y  
osteoblastos/osteocitos, con capacidad de síntesis de proteínas de matriz extracelular tales  
35 como colágeno y osteopontina.

El término “factor adecuado para la diferenciación de células madre en células de linaje osteocondral” hace referencia en la presente invención a todos aquellos compuestos que posibilitan, promueven o favorecen la diferenciación de células madre en cultivo celular se diferencien *in vitro* en células de linaje osteocondral. De acuerdo a la invención, se contemplan todos aquellos factores que posibilitan, promueven o favorecen la diferenciación de células madre en cultivo celular en células de linaje condrogénico que incluyen, sin quedar limitados a, el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-beta 1, *transforming growth factor beta 1*), el factor de crecimiento transformante beta 2 (TGF-beta 2), la proteína morfogénica ósea (BMP, *bone morphogenetic protein*), el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1, *insuline-like growth factor-1*), dexametasona, ascorbato (o derivados tal como ascorbato-2-fostato), prolina, piruvato sódico, insulina humana recombinante, transferrina, selenito sódico (la combinación de estos tres últimos se denomina habitualmente ITS, (*insulin-transferrin-selenium*), Por otro lado, se contemplan todos aquellos factores que posibilitan, promueven o favorecen la diferenciación de células madre en cultivo celular en células de linaje osteogénico que incluyen, sin quedar limitados a, TGF-beta1, BMP, glucocorticoides tales como dexametasona, osteogenina, ácido ascórbico, beta-glicerofosfato y vitamina D, en particular vitamina D3.

El término “factor de crecimiento de fibroblastos básico” o “bFGF” (*basic fibroblast growth factor*) o “FGF2” o “FGF-β” hace referencia a un factor miembro de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos que permite el mantenimiento de células madre embrionarias humanas no diferenciadas, y que estimula la proliferación de células de origen mesodérmico así como de muchas células de origen neuroectodérmico, ectodérmico y endodérmico. bFGF está codificado por el gen *FGF2*. Esta proteína se activa durante el daño tisular o el desarrollo tumoral mediando procesos angiogénicos.

El término “factor de crecimiento tipo insulina” o “IGF-1” (*insulin-like growth factor*), tal y como se usa aquí, se refiere a una proteína que en humanos está codificada por el gen IGF1. La estructura de IGF-1 es similar a la de la insulina, y ejerce su función a través de la unión a su receptor IGF1R.

El término “factor de crecimiento transformante beta” o TGF-beta se refiere a la superfamilia de factores de crecimiento transformante beta de las citoquinas. Estos factores son proteínas de secreción implicadas en diversas funciones celulares, tales como el control del crecimiento celular, proliferación celular, procesos de diferenciación y apoptosis. En humanos se conocen tres isoformas (TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3) codificada por los genes

*TGB1*, *TGB2* y *TGB3* respectivamente. Se ha descrito que TGB-beta1 y TGF-beta 2 están implicados en la diferenciación de células madre mesenquimales a condrocitos.

5 El término "hidroxiapatita" o "hidroxiapatito" hace referencia al mineral formado por fosfato de calcio cristalino, el cual representa un depósito del 99% del calcio corporal y 80% del fósforo total. El hueso desprovisto de mineralización o hueso desmineralizado se denomina osteoide.

10 El término "insulina-transferrina-selenio" o "ITS" se refiere a una combinación habitualmente empleada en la inducción de diferenciación condrogénica formada por insulina, habitualmente insulina humana, transferrina y selenio, habitualmente selenito sódico. El término "insulina" hace referencia a una hormona polipeptídica de 51 aminoácidos, producida y secretada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, que interviene en el anabolismo de los carbohidratos. El término "transferrina" o "siderofilina" se  
15 refiere a una proteína transportadora específica del hierro en plasma. El término "selenio" hace referencia al elemento químico de número atómico 34 y símbolo Se.

El término "matriz extracelular" o MEC hace referencia en la presente invención al conjunto de materiales extracelulares que forman parte de un tejido y cuya función está relacionada  
20 con el relleno de los espacios entre células, la posibilidad de la compresión y/o estiramiento celular y la degradación de los restos celulares. En particular, la presente invención se refiere a la matriz extracelular del tejido óseo y/o cartilaginosa. Componentes de la matriz extracelular osteocondral comprenden colágeno, elastina, proteoglicanos y glicoproteínas. En particular, la matriz extracelular comprende colágeno, osteopontina, hidroxiapatita,  
25 carbonato cálcico y/o carbonato magnésico. Los condroblastos, responsables de la formación del tejido cartilaginosa, producen una matriz extracelular que comprende proteoglicanos asociados a ácido hialurónico y a microfibrillas de colágeno tipo II. Los condroblastos, al quedar totalmente rodeados por la matriz cartilaginosa, se denominan condrocitos. Los osteoblastos, responsables de la formación del tejido óseo, sintetizan el  
30 componente orgánico de la matriz extracelular ósea que se caracteriza por un alto contenido en colágeno tipo I, glicosaminoglicanos y glicoproteínas. Los osteoblastos, al quedar totalmente rodeados por la matriz ósea, se denominan osteocitos.

El término "medio de cultivo" o simplemente "medio", tal como se emplea aquí, hace  
35 referencia a cualquier sustancia o preparado que se utiliza para el cultivo de células vivas. El término "medio", empleado en referencia a un cultivo celular, incluye los componentes del

medio ambiente que rodea a las células en cultivo. El medio de cultivo puede ser sólido, líquido, gaseoso o una mezcla de fases y materiales. Los medios de cultivo incluyen medios líquidos de crecimiento, así como medios líquidos que no sustentan el crecimiento celular. Los medios también incluyen medios gelatinosos tales como agar, agarosa, gelatina y matrices de colágeno. Los ejemplos de medios gaseosos incluyen la fase gaseosa al que las células que crecen en una placa de Petri u otro soporte sólido o semisólido están expuestas. El término "medio" también se refiere al material que está destinado para uso en un cultivo celular, incluso si todavía no se ha puesto en contacto con las células. El término "medio basal" se refiere a un medio que promueve el crecimiento de muchos tipos celulares que no requieren ningún suplemento de nutrientes especiales. Medios más basales comprenden generalmente cuatro grupos químicos básicos: aminoácidos, hidratos de carbono, sales inorgánicas y vitaminas. Un medio basal generalmente sirve como la base para un medio más complejo, al que los suplementos tales como suero, tampones, factores de crecimiento, lípidos, y similares, son añadidos. Ejemplos de medios basales incluyen, pero no están limitados a, Medio Eagle's Basal (EBM), medio esencial mínimo (MEM), medio modificado de Dulbecco Eagle (DMEM), medio 199, Ham F-10, Ham F-12, Mc Coy 5A, MEM de Dulbecco / FI 2, medio RPMI 1640, e Iscove modificado por Dulbecco (IMDM). En el contexto de la presente invención, el medio de cultivo es un medio adecuado para el cultivo de células madre sobre un soporte de fibras de carbón activado que comprende suero adecuado para dicho cultivo celular y en donde dicho medio no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero.

El término "osteoblasto" se refiere a las células responsables de la formación y organización de la matriz extracelular del hueso y de su posterior mineralización. Son células de morfología cuboide que forman una capa en la superficie de los huesos en crecimiento, o como en el caso de la osificación intramembranosa, rodean áreas de osificación. Parte de su membrana se encuentra en contacto con el borde osteoide, llamándose así el área donde está teniendo lugar la calcificación. Los osteoblastos tienen abundante retículo endoplásmico rugoso y un área de Golgi muy desarrollada. Se reconocen fácilmente vesículas de pinocitosis cerca de la membrana responsables de la secreción del colágeno. El principal producto de los osteoblastos maduros es el colágeno de tipo I que constituye el 90% de las proteínas del hueso. También producen otras proteínas como la osteocalcina y las proteínas Gla matriciales, y glicoproteínas fosforiladas incluyendo las sialoproteínas I y II, la osteopontina y la osteonectina. Las principales proteínas con actividad enzimática producidas por los osteoblastos son la fosfatasa alcalina y la colagenasa.

El término "osteocito" empleado en la presente invención hace referencia a un tipo celular formado a partir de la diferenciación del osteoblasto, que a su vez deriva de células osteoprogenitoras. El osteocito, junto con el osteoclasto, constituye el elemento celular del tejido óseo. El osteocito se caracteriza por presentar un citoplasma ligeramente alargado y basófilo, con una enorme cantidad de prolongaciones citoplásmicas, retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi poco desarrollados, presentando pequeñas gotas de lípidos y pequeñas cantidades de glucógeno. Este tipo celular tiene la capacidad de segregar o reabsorber la matriz ósea que le rodea. A pesar de la distancia que hay entre los osteocitos, y de la cantidad de matriz que los separa, estos permanecen en contacto a través de pequeños canales presentes a lo largo del hueso, de modo que la comunicación de los osteocitos es importante para controlar la cantidad de hueso que se forma y deteriora. Los osteocitos derivan de osteoblastos que quedan atrapados en las lagunas de la matriz.

El término "osteoclasto" hace referencia a aquellas células responsables de resorción de la matriz ósea. Son células polinucleadas de gran tamaño que se localizan en las superficies óseas firmemente asociadas a la matriz ósea. Los osteoclastos se forman por la fusión de varias células mononucleares derivadas de una célula madre sanguínea de la médula ósea mostrando muchas propiedades de los macrófagos. Los osteoclastos se caracterizan por disponer de una porción de su membrana "arrugada", en forma de cepillo, rodeada de un citoplasma libre de orgánulos, llamada "zona clara" con la que se adhiere a la superficie del hueso mediante integrinas, unos receptores especializados del hueso. El proceso de resorción se inicia cuando el aparato de Golgi de la células excreta lisosomas con enzimas capaces de producir un microambiente ácido por debajo de la membrana arrugada como consecuencia del transporte de protones mediante la bomba de protones ATP-dependiente, el intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y la anhidrasa carbónica. Las enzimas lisosomales de los osteoclastos implicadas en este proceso son cistein-proteasas como la catepsina y sobre todo, la fosfatasa ácida tartrato-resistente (esta última se utiliza como marcador del fenotipo osteoclástico). Las enzimas lisosomales solo son liberadas en la zona clara en las proximidades del borde arrugado, produciéndose en este área las reacciones de degradación de la matriz que deben producirse antes de que el medio ácido disuelva las sales minerales del hueso. La resorción osteoclástica depende de una serie de factores reguladores externos como la hormona paratiroidea, la 1,25-dihidroxitamina D3 y la calcitonina. Otros factores que afectan la funcionalidad de los osteoclastos son los glucocorticoides y las prostaglandinas.

El término "osteogenina" o "BMP3" se refiere a un factor de crecimiento óseo endógeno implicado en el desarrollo esquelético y osteógenesis.

5 El término "osteopontina" o "BSP-1" (sialoproteína ósea) o "BNSP" hace referencia a una proteína extracelular estructural que supone un componente orgánico del hueso, perteneciendo al grupo de proteínas no colágenas de la matriz ósea.

10 La expresión "poner en contacto" tal como se utiliza aquí hace referencia al proceso mediante el cual un soporte de acuerdo a la invención basado en fibras de carbón activado entra en contacto con una célula madre, en particular con una célula madre mesenquimal, y/o entra en contacto con un medio de cultivo adecuado para la diferenciación de dicha célula madre de acuerdo a la presente invención. Tal como entiende el experto en la técnica, la puesta en contacto de la célula madre con el soporte de fibras de carbón activado tiene lugar en condiciones adecuadas de adhesión celular de las células madre sobre el soporte ,  
15 en particular, en condiciones adecuadas de pH, temperatura, fuerza iónica que permiten la viabilidad de las células y su adhesión al soporte.

El término "proliferación" o "expansión" en el contexto de la presente invención se emplea para hacer referencia a un aumento en el número celular, derivado de la división celular.

20 El término "soporte de fibras de carbón activado" en el contexto de la invención hace referencia a un soporte que comprende fibras de carbón activado. En una realización particular preferida de la invención, las fibras de carbón activado que comprenden el soporte se disponen tejidas de manera adecuada. En el contexto de la presente invención, soportes  
25 de fibras de carbón activado incluyen, sin quedar limitados a, telas de carbón activado, fieltros de carbón activado y cuerdas de carbón activado. En una realización particular, el soporte de fibras de carbón activado se selecciona del grupo formado por telas de carbón activado (TCA) y fieltros de carbón activado.

30 El término "suero", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere al componente de la sangre resultante tras la coagulación de ésta y eliminación del coágulo resultante.

La expresión "suero adecuado para el cultivo celular" según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier suero que contenga los componentes necesarios para promover la  
35 proliferación y/o diferenciación de células en cultivo. En una forma preferida de realización, el suero adecuado para el cultivo celular es un suero adecuado para el cultivo de células

madre. Estos sueros incluyen, sin limitación, suero fetal bovino, suero humano, suero de ternero, suero bovino adulto, suero de cabra, suero de pollo, suero porcino, suero de conejo, suero de oveja, suero de caballo, suero de cobaya, suero de ratón, suero de rata así como cualquiera de los anteriores sometidos a tratamiento previo tales como, por ejemplo, sueros inactivados con radiación gamma, mediante adsorción en carbón activo o mediante tratamiento a altas temperaturas, sueros tratados para eliminar total o parcialmente las inmunoglobulinas, suero deslipidizado, suero enriquecido en hierro. En una realización particular de la invención, el suero adecuado para el cultivo celular de las células madre en contacto con un soporte de carbón activado según la invención es suero bovino, en particular suero fetal bovino (FBS, *fetal bovine serum*).

El término “sujeto”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un miembro de una especie de un animal mamífero, e incluye, pero no se limita, a animales domésticos, primates y humanos. En una realización particular, el sujeto es preferiblemente un ser humano, masculino o femenino, de cualquier edad o raza.

El término “tela de carbón activado” o “tela de carbón activo” o “TCA” hace referencia a un tejido cuya urdimbre está formada por fibras de carbón activado, preferiblemente con diámetro entre 1 y 50 micras, más preferiblemente con diámetro entre 5 y 20 micras, aún más preferiblemente con diámetro entre 8 y 10 micras. Estos materiales se caracterizan por tener una elevada área superficial y elevado volumen de microporos (poros con anchura menor de 2 nm), estando éstos situados perpendicularmente al eje de la fibra, lo que hace que estos materiales tengan una alta capacidad de adsorción y que sea rápida la cinética del proceso de absorción. Las fibras de carbón activado también se utilizan para la preparación de fieltros y cuerdas. Existe una gran variedad de estos productos con distintas características dependiendo de la naturaleza de las fibras orgánicas y de su procesado para convertirlas en fibras de carbón activado. Las fibras orgánicas usadas pueden ser polímeros como el rayón, el poliacrilonitrilo (PAN), resinas fenólicas (Novoloid) y breas procedentes de residuos del petróleo y de alquitranes del carbón mineral. Una vez carbonizadas en atmósferas inertes las fibras se activan en vapor de agua o dióxido de carbono para aumentar su área superficial y su microporosidad, pudiendo llegarse a desarrollar un área superficial de hasta 2.500 m<sup>2</sup>/g. Otra característica que define la tela de carbón activado, además de su porosidad y área superficial, es su química superficial, la cual viene determinada por los grupos funcionales superficiales, esencialmente de oxígeno y nitrógeno. Estos grupos son los responsables de la acidez-basicidad de la superficie, la carga superficial y pH del punto de carga cero. Las fibras, telas, fieltros y cuerdas de carbón

activado se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo, materiales de este tipo realizados con la fibra Novoloid los suministra Kynol Europe, realizados con Zorflex® los suministra Chemviron Carbon y BuyActivatedCharcol, realizados con PAN y Rayon los suministra HP Materials Solution Inc. y realizados con PAN los suministra TCT.

5

Método de obtención del biomaterial de la invención

Los inventores de la presente invención han desarrollado una metodología que permite la diferenciación espontánea de células madre mesenquimales humanas derivadas del estroma del cordón umbilical (UCSSC) sobre un soporte de tela de carbón activado, en ausencia de suplementos adicionales, tanto químicos como biológicos, evitando así el uso de xenobióticos. Esta metodología supone una alternativa más sencilla, económica y segura que las descritas en el estado de la técnica para la diferenciación de células madre en tipos celulares tales como células de linaje osteocondral, puesto que los materiales empleados (telas de carbón activado y células madre) son totalmente biocompatibles con un sujeto en necesidad de un implante de células osteocondrales, no siendo necesarios factores de diferenciación celular.

Así, en un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un método de obtención de un biomaterial que comprende un soporte de fibras de carbón activado, células de linaje osteocondral y matriz extracelular, en donde dicho método comprende

- (i) poner en contacto el soporte fibras de carbón activado con células madre en condiciones adecuadas de adhesión celular de las células madre sobre el soporte de fibras de carbón activado, y
- (ii) mantener el cultivo celular obtenido en la etapa (i) en presencia de un medio de cultivo adecuado y durante el tiempo suficiente para la diferenciación de las células madre en células de linaje osteocondral y la formación de una matriz extracelular, en donde dicho medio de cultivo comprende suero adecuado para el cultivo celular y en donde dicho medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero.

Así, el biomaterial que se obtiene mediante el método de la presente invención comprende un soporte de fibras de carbón activado, células de linaje osteocondral y matriz extracelular.

35

*Soporte de fibras de carbón activado*

El término “área superficial”, en relación al soporte de fibras de carbón activado, hace referencia a la extensión de la superficie desarrollada fundamentalmente en el interior de los poros y en menor medida en la superficie externa de las fibras de carbón activado, preferiblemente de las fibras de carbón activado con las que está tejida la tela de carbón activado, el fieltro de carbón activado o la cuerda de carbón activado. De acuerdo a la presente invención, el área superficial del soporte de fibras de carbón activado es de al menos 1000 m<sup>2</sup>/g, preferiblemente de al menos 1500 m<sup>2</sup>/g, preferiblemente de al menos 2000 m<sup>2</sup>/g, aún más preferiblemente de al menos 2500 m<sup>2</sup>/g. Métodos para determinar el área superficial de un soporte de carbón activado son conocidos por el experto en la materia. Tales métodos incluyen, sin quedar limitados a, la aplicación de la ecuación BET (Brunauer-Emmett-Teller) a las isothermas de adsorción de N<sub>2</sub> a -196 °C.

Por otro lado, el soporte de carbón activado de acuerdo a la presente invención tiene una estructura altamente porosa, en donde preferiblemente al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% del volumen total de poros de dicho soporte son microporos (poros con anchura inferior a 2 nm). En una realización particular de la invención, el soporte de carbón activado tiene un contenido en microporos de al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% respecto al volumen total de los poros existentes. Métodos para determinar el volumen y tamaño de los poros de un soporte de carbón activado incluyen, sin limitación a, el análisis de las isothermas de adsorción de N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> a -196 y 0 °C, respectivamente mediante los métodos DFT y de Dubinin-Radushkevich (DR), en donde se obtiene el valor del volumen de los microporos mediante la fórmula:

$$W = W_0 \exp\left(-\frac{K}{\beta^2 (RT \ln(P/P_0))^2}\right)$$

donde W es el volumen adsorbido a cada presión relativa; W<sub>0</sub> es el volumen de microporos; K es una constante dependiente de la estructura; β el coeficiente de afinidad (cociente entre los potenciales de adsorción de dos gases). En una realización preferida de la invención, el soporte de carbón activado tiene un volumen de microporos de entre el 50 y el 95%, preferiblemente de entre el 60% y el 95%, aún más preferiblemente de entre el 70 y el 90%

respecto al volumen total de los poros existentes en dicho soporte.

Otra característica del soporte de carbón activado de acuerdo a la invención está relacionada con la química superficial de dicho soporte, la cual viene determinada por la presencia de grupos funcionales fundamentalmente de oxígeno y nitrógeno. Estos grupos superficiales son los responsable esencialmente del carácter acido-básico de la superficie, de su carga y del pH del punto de carga cero. Los grupos superficiales de oxígeno pueden ser entre otros los de tipo fenol, quinona, hidroquinona, lactona, pirona, ácido carboxílico, éter, éster o aldehído. Los grupos superficiales de N pueden ser tipo amina, piridina, pirrol y nitrógeno cuaternario. La acidez superficial del soporte viene determinada por la presencia de grupos funcionales de carácter ácido como son los grupos carboxílicos y los fenoles y la basicidad superficial viene determinada por la presencia de grupos funcionales de carácter básico como las pironas, aminas y piridinas y regiones superficiales del soporte ricas en electrones  $\pi$ . La carga negativa de la superficie se debe a la desprotonación de grupos superficiales de tipo ácido, por encima del  $pH_{PCC}$  y la carga superficial positivase debe a la protonación de grupos básicos por debajo del  $pH_{PCC}$ . La superficie de un material carbonoso se dice que es anfótera porque puede tener cargas positivas y negativas al mismo tiempo sobre distintos grupos superficiales. La química superficial del soporte determina el tipo de interacción de la superficie del soporte con las moléculas que se adsorben sobre ella. Estas interacciones pueden ser de tipo electrostático, de dispersión e hidrófoba.

La química superficial de un soporte carbonoso se estudia mediante diferentes técnicas como son: desorción térmica programada (TPD), espectroscopia de fotoemisión de rayos X (XPS), espectroscopia de infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR), valoraciones potenciométricas con HCl y NaOH, calorimetría de inmersión en agua y benceno, y análisis elemental.

Los grupos superficiales que determinan la química superficial de un soporte carbonoso pueden estar presentes en el material debido a que provienen de la materia prima (fibras poliméricas en el caso de las telas de carbón activado) empleada en su fabricación o bien son introducidos posteriormente mediante tratamientos adecuados. Así, los tratamientos oxidantes del soporte carbonoso son, por ejemplo, peróxido de hidrógeno, persulfato amónico, ácido nítrico o perclorato amónico introducen grupos funcionales superficiales que contienen oxígeno. Los grupos funcionales que contienen nitrógeno pueden introducirse tratando con amoniaco o urea a alta temperatura el soporte carbonoso.

Como entiende el experto en la materia, el pH del punto de carga cero ( $\text{pH}_{\text{PCC}}$ ) del soporte de carbón activado según la invención es tal que resulta compatible con el cultivo de las células madre en cultivo con dicho soporte. El término “punto de carga cero” o “pH del punto de carga cero” o “ $\text{pH}_{\text{PCC}}$ ” hace referencia al valor de pH en el cual las partículas de carga superficial variable no tienen carga neta, es decir, el valor de pH en el cual un sólido carece de carga superficial neta. Así, si el pH del medio es superior al  $\text{pH}_{\text{PCC}}$  se generarán cargas negativas, mientras que si el pH del medio es inferior al  $\text{pH}_{\text{PCC}}$  se generarán cargas positivas (especies protonadas). Así, en una realización particular de la invención, el pH del punto de carga cero del soporte de carbón activado viene dado por el pH del medio de cultivo de acuerdo al método de la invención. En una realización preferida de la invención, el pH del punto de carga cero ( $\text{pH}_{\text{PCC}}$ ) del soporte de carbón activado tiene un valor comprendido entre 6 y 9, preferiblemente entre 7 y 8, aún más preferiblemente entre 7,2 y 7,6.

El experto en la materia conoce diferentes soportes de carbón activado. El soporte de carbón activado de acuerdo al método de la invención es cualquier soporte que cumple las características anteriormente descritas en cuanto a porosidad (disposición hacia la superficie de los poros, área superficial), química superficial y carga superficial.

En una realización particular de la invención, el soporte de fibras de carbón activado se selecciona del grupo que comprende telas, fieltros y cuerdas de carbón activado. En una realización más particular, el soporte de fibras de carbón activado es una tela de carbón activado o un fieltro de carbón activado. Las fibras, telas, fieltros y cuerdas de carbón activado se encuentran disponibles comercialmente. Por ejemplo, materiales de este tipo realizados con la fibra Novoloid los suministra Kynol Europe, realizados con Zorflex® los suministra Chemviron Carbon y BuyActivatedCharcoal, realizados con PAN y Rayon los suministra HP Materials Solution Inc. y realizados con PAN los suministra TCT.

#### *Células de linaje osteocondral*

El biomaterial obtenido de acuerdo al método desarrollado en la presente invención comprende en segundo lugar células de linaje osteocondral.

Las células de linaje osteocondral son células obtenidas por la diferenciación de las células madre en células diferenciadas hacia linaje osteogénico, diferenciadas hacia linaje condrogénico o diferenciadas hacia ambos linajes. La presente invención contempla que las células de linaje osteogénico comprendidas por el biomaterial obtenido mediante el método

aquí descrito puedan ser células en diferentes estadios de diferenciación osteogénica, es decir, como osteoblastos o como osteocitos. De modo similar, la presente invención contempla que las células de linaje condrogénico comprendidas por el biomaterial obtenido mediante el método aquí descrito puedan ser células en diferentes estadios de diferenciación condrogénica, es decir, como condroblastos o como condrocitos. Así, en una realización particular, el biomaterial obtenido de acuerdo con el método de la presente invención comprende células de linaje osteogénico. En una realización particular alternativa, el biomaterial obtenido de acuerdo con el método de la presente invención comprende células de linaje condrogénico. En una realización preferida, el biomaterial obtenido de acuerdo con el método de la presente invención comprende células de linaje condrogénico y células de linaje osteogénico, es decir, comprende células de linaje osteocondral.

#### *Matriz extracelular*

El biomaterial obtenido de acuerdo al método desarrollado en la presente invención comprende en tercer lugar proteínas de matriz extracelular.

El principal componente de la matriz ósea es el colágeno tipo I, que supone entre el 90 y 95% de la matriz orgánica. Las fibrillas de colágeno son similares a las presentes en otros tejidos y están distribuidas aleatoriamente formando un entramado. Otro componente orgánico importante es la osteonectina (también denominada SPRC o BM-40), una fosfoproteína que puede interactuar tanto con el colágeno como con las sales inorgánicas. Es una proteína altamente reactiva que se localiza preferentemente en las áreas de mayor grado de calcificación. La osteocalcina (también llamada proteína Gla) se caracteriza por la presencia de tres residuos de ácido g-carboxiglutámico. Otras proteínas no colagenosas son la osteopontina (también llamada sialoproteína I) que se une a la hidroxiapatita y es producida por los osteoblastos estimulados por la 1-alfa-1,25-dihidroxitamina D, las proteínas óseas morfogenéticas (BMPs) que juegan un papel similar al de los factores de crecimiento y los proteoglicanos ácidos que se encuentran en concentraciones mayores en el área osteoide en comparación con la matriz calcificada.

Por otro lado, la matriz ósea contiene abundantes sales minerales en forma cristalizada, en particular la hidroxiapatita y carbonato cálcico. En cantidades pequeñas se encuentran los sulfatos, fluoruros e hidróxido de magnesio. Todas estas sales se encuentran depositadas en una red formada por las fibras de colágeno. El proceso por el cual estas sales se depositan y cristalizan en la red se denomina calcificación. Aunque la dureza del hueso

se debe a sus componentes minerales, sin la existencia de la retícula de colágeno, el hueso sería frágil. Las fibras de colágeno y otras proteínas presentes en la matriz aportan flexibilidad y resistencia a la tensión.

- 5 En una realización particular, la matriz extracelular comprende colágeno. En una realización aún más particular, la matriz extracelular comprende colágeno, osteopontina, hidroxiapatita, carbonato cálcico y/o carbonato magnésico.

*Primera etapa del método de la invención*

10

Tal como se ha indicado anteriormente, en una primera etapa del método de acuerdo a la invención de obtención de un biomaterial que comprende un soporte de fibras de carbón activado, células de linaje osteocondral y matriz extracelular, se pone en contacto dicho soporte de carbón activado con células madre en condiciones adecuadas de adhesión celular de las células madre sobre el soporte de carbón activado.

15

Tal como entiende el experto en la técnica, la puesta en contacto de la célula madre con el soporte de fibras carbón activado tiene lugar en condiciones adecuadas de adhesión de las células madre sobre el soporte de carbón activado, en particular, en condiciones adecuadas de pH, temperatura y fuerza iónica que permiten tanto la viabilidad celular como su adhesión al soporte.

20

En una realización particular de acuerdo a la invención, el valor de pH del medio de cultivo en presencia del cual las células madre se adhieren sobre el soporte de carbón activado y se diferencian en células de linaje osteocondral es similar al valor de pH del punto de carga cero del soporte de carbón activado según la invención. Es decir, el pH del punto de carga cero del soporte de tela carbón activado es tal que permite la adhesión y el cultivo de las células madre sobre dicho soporte. En una realización preferida de la invención el pH del punto de carga cero y el valor de pH del medio de cultivo para la adhesión de las células madre sobre el soporte de carbón activado tiene un valor comprendido entre 6 y 9, preferiblemente entre 7 y 8, aún más preferiblemente entre 7,2 y 7,6.

25

30

Condiciones de temperatura para la adhesión celular de las células madre sobre el soporte de fibras de carbón activado son las condiciones de temperatura habituales de un cultivo celular conocidas por el experto en la materia. En particular, la temperatura tiene un valor de 37 °C.

35

En una realización particular, la superficie del soporte de fibras de carbón activado se encuentra modificado por medio de polímeros que promueven la adhesión celular. Tales polímeros comprenden, sin limitarse a, colágeno, fibronectina, laminina, poli-lisina y gelatina.

5 En una realización alternativa preferida de la invención, las células madre se adhieren a la superficie del soporte de carbón activado en ausencia de tales polímeros que promueven la adhesión celular.

10 Como entiende el experto en la materia, dicha puesta en contacto de las células madre con el soporte de fibras de carbón activado preferiblemente se produce con un soporte de tela de carbón activado esterilizado previamente a su contacto con las células. Métodos para la esterilización son conocidos por el experto en la materia y comprenden, sin quedar limitados a, métodos físicos tales como calor húmedo, calor seco, ebullición, radiación ionizante y radiación no ionizante, y métodos químicos tales como alcoholes, aldehídos, fenoles y  
15 peróxido de hidrógeno. En una realización particular de la invención, la esterilización del soporte de fibras de carbón activado se lleva a cabo mediante métodos físicos, preferiblemente mediante calor húmedo tal como mediante autoclave de vapor. Por otro lado, el experto en la materia entiende que la puesta en contacto del soporte de fibras de carbón activado con las células madre se produce preferiblemente tras un lavado apropiado  
20 del soporte de fibras de carbón activado. Dicho lavado puede llevarse a cabo mediante empleo de una disolución amortiguadora o mediante el empleo de un medio de cultivo de composición igual o similar a la del medio de cultivo de las células madre, preferiblemente mediante el empleo de un medio de cultivo de composición igual o similar al medio empleado para la puesta en contacto de las células madre con el soporte de carbón  
25 activado.

Las células madre de acuerdo a la invención son seleccionadas del grupo que comprende células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias no humanas, células madre pluripotentes inducidas, células madre adultas o combinaciones  
30 de las mismas. En una realización particular, las células madre son células madre humanas, en donde dichas células madre humanas no son células madre embrionarias humanas. En una realización particular, las células madre son células madre mesenquimales, preferiblemente células madre mesenquimales humanas.

Las células madre mesenquimales pueden ser obtenidas a partir de una amplia variedad de  
35 tejidos, tales como médula ósea, tejido adiposo, hígado, bazo, testículos, sangre menstrual, fluido amniótico, páncreas, periostio, membrana sinovial, músculo esquelético, dermis,

pericitos, hueso trabecular, cordón umbilical humano, pulmón, pulpa dental y sangre periférica. Las células madre mesenquimales aisladas muestran multipotencialidad para diferenciarse en cultivo o tras su implante *in vivo*, en osteoblastos, condrocitos, adipocitos y mioblastos. Una fuente empleada habitualmente para la obtención de células madre adultas es el estroma de la médula ósea (células mesenquimales, células del estroma de la médula ósea o unidades formadoras de colonias fibroblásticas), las cuales se pueden expandir *in vitro* con relativa facilidad y a la vez diferenciarse en múltiples tipos de células, mesenquimales o no, como adipocitos, condrocitos, osteocitos, hepatocitos, células cardíacas o incluso neuronas. Otra fuente de interés de células madre mesenquimales es el tejido adiposo, puesto que el número total de células madre que pueden obtenerse es superior al número obtenido a partir de otros tejidos.

Las células madre mesenquimales conforme a la presente invención pueden ser obtenidas mediante procedimientos y metodologías conocidas por el experto en la materia a partir de un tejido de un sujeto. La muestra que comprende las células madre inicialmente es, preferiblemente, lavada para separar la fracción que comprende las células madre mesenquimales del material restante. En una realización particular, la muestra de tejido se lava con una solución salina fisiológicamente compatible, tal como una solución salina tamponada fosfato o PBS. Para evitar agregados celulares, la muestra puede tratarse opcionalmente con un enzima que rompa las uniones entre células, tal como colagenasa, tripsina, etc, siendo tanto la cantidad de enzima necesaria como el tiempo de incubación conocidos por el experto en la materia. De modo alternativo o adicional, los agregados celulares pueden eliminarse mediante agitación mecánica, sonicación, calentamiento, etc. Si el método enzimático empleado puede provocar degradación celular, éste es seguido de un tratamiento neutralizante del enzima. La separación de los agregados celulares y las células de interés preferiblemente se consigue mediante centrifugación. Tras resuspender el sedimento celular, la muestra puede someterse opcionalmente a un tratamiento para la lisis eritrocitaria mediante incubación con un medio hipertónico, con un medio hipotónico, mediante cloruro amónico, etc. Las células resultantes pueden ser lavadas, centrifugadas y suspendidas secuencialmente en varias ocasiones para lograr una mayor pureza. Opcionalmente, puede analizarse la viabilidad y la concentración de la suspensión celular obtenida previamente a su puesta en cultivo.

Métodos de purificación de células madre tras su obtención han sido ampliamente descritos en la técnica e incluyen, sin quedar limitados a, centrifugación en gradiente de densidad (mediante, por ejemplo, Ficoll-Hypaque) seguida de incubación de las células adherentes,

citometría celular con *sorting* e incubación con partículas magnéticas específicas de marcador (con selección positiva o negativa). En una realización particular de la invención, las células madre mesenquimales son células humanas derivadas del estroma del cordón umbilical o UCSSC (*umbilical cord stromal stem cell*).

5

Como el experto en la técnica entiende, el número total de células madre que puede obtenerse a partir de un individuo puede ser mayor o menor en función del tejido de procedencia de dichas células madre. Así, en particular, el número total de células madre mesenquimales que puede obtenerse a partir de tejido adiposo es mayor que el que puede obtenerse a partir de, por ejemplo, médula ósea. Así, en una realización particular, las células madre obtenidas se ponen directamente en contacto con el soporte de telas de carbón activado en condiciones adecuadas de adhesión celular de las células madre sobre el soporte. En una realización particular, las células madre obtenidas se ponen en contacto con el soporte de fibras de carbón activado en condiciones adecuadas de adhesión celular de dichas células madre sobre el soporte de carbón activado y en condiciones adecuadas de proliferación de dichas células madre sobre el soporte de carbón activado. En una realización particular alternativa preferida, las células madre obtenidas, previamente a su puesta en contacto con el soporte de carbón activado en condiciones adecuadas de adhesión celular de dichas células madre sobre el soporte de carbón activado, se cultivan en condiciones adecuadas para la proliferación y expansión de dichas células madre.

10  
15  
20

Condiciones adecuadas para la proliferación y expansión de las células madre incluyen, sin quedar limitadas a, el cultivo de las células madre en un medio de cultivo adecuado entre 1 día y 14 días, preferiblemente entre 3 días y 7 días, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 37 °C, en presencia de un factor de crecimiento adecuado, una citoquina, una combinación de factores de crecimiento, una combinación de citoquinas o una combinación de factores de crecimiento y citoquinas. Ejemplos no limitativos de factores de crecimiento incluyen el factor de células madre (SCF, *stem cell factor*), trombopoyetina (TPO), eritropoyetina (EPO), factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF, *granulocyte colony-stimulating factor*), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF, *macrophage colony-stimulating factor*), ligando Flt-3/Flk-2, factor I derivado de células estromales (SDF-1, *stromal cell derived factor-1*), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ , *tumor necrosis factor-alpha*), factor de crecimiento transformante beta (TGF beta, *transforming growth factor beta*), interleucina 1, interleucina 2, interleucina 3, interleucina 4, interleucina 5, interleucina 6, interleucina 7, interleucina 8,

30  
35

interleucina 11, interleucina 12, interleuquina 13, y combinaciones de los mismos. El cultivo de las células madre en condiciones de proliferación se describe en las patentes de EE.UU. Nos. 6.511.958, 6.436.704, 6.280.718, 6.258.597, 6.184.035 y 6.132.708.

5 La proliferación de las células puede ser determinada por el experto en la materia siguiendo metodologías conocidas de rutina, tales como, contaje del número de células en cultivo, medida de la incorporación de un análogo de nucleótido marcado radiactivamente a la síntesis de DNA *de novo*, tinción celular y análisis mediante citometría de flujo, reducción de una sal de tetrazolium, el uso de marcadores fluorescentes (por ejemplo, carboxil-  
 10 fluoresceinsuccinimidil éster (CFSE), carboxifluoresceína succinimidil ester diacetato (CFDA SE), ácido carboxílico diacetato succinimidil éster (DFFDA, SE), calceína, PKH, DAPI, Hoechst, naranja de tiazol, yoduro de propidio, BrdU, análogos radio-marcados (por ejemplo, 3H-timidina), y agentes capaces de detectar marcadores celulares de proliferación (por ejemplo, Ki-67, proteína de mantenimiento de microcromosoma 2 (Mcm2/BM28),  
 15 proteína de mantenimiento de microcromosoma 6 (MCM6).

La proliferación de las células madre se mantiene hasta alcanzar una densidad suficiente de células para su puesta en contacto con el soporte de telas de carbón activado. Densidades celulares adecuadas incluyen, sin limitación, de  $10^5$  a  $10^6$  células/cm<sup>2</sup> de superficie del  
 20 soporte de carbón activo, preferiblemente de  $10^6$  a  $10^7$  células/cm<sup>2</sup> de superficie del soporte de carbón activo.

Condiciones adecuadas para la proliferación y expansión celular comprenden un medio de cultivo adecuado para la proliferación de las células madre. Medios de cultivo adecuados  
 25 son todos aquellos que permiten la proliferación de células madre. Tales medios de cultivo se encuentran disponibles comercialmente por, entre otros, StemCell Technologies, Invitrogen, R&D Systems, Sigma-Aldrich, etc. En una realización particular, el medio de cultivo es un medio que permite la proliferación de células madre mesenquimales. Medios adecuados para el cultivo de células madre mesenquimales son conocidos por el experto en  
 30 la materia e incluyen medios de cultivos para el crecimiento de células madre mesenquimales disponibles comercialmente que incluyen, sin limitarse a, el medio de cultivo de células madre mesenquimales de Innoprot, medio de cultivo de crecimiento de células madre mesenquimales de Lonza, los medios de cultivo de células madre mesenquimales MesenPro RS, StemPro® MSC y StemPro® MSC SFM XenoFree de Life Technologies,  
 35 medio de crecimiento de células madre mesenquimales DXF de PromoCell, así como cualquier medio de cultivo que permita el crecimiento y proliferación de células madre

mesenquimales tales como DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), alfa-MEM (*Minimum Essential Medium*), IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*), BME (*Basal Medium Eagle*), RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) o similares.

- 5 Condiciones habituales de incubación para la proliferación celular son conocidas por el experto en la materia. Tales condiciones comprenden una temperatura de 37 °C, saturación de humedad y atmósfera conteniendo del 5% al 21% de O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>.

- 10 Otras condiciones de cultivo adecuadas para expandir las células madre para su uso en el método de la presente invención pueden ser determinadas usando métodos estándar conocidos para un experto en la materia.

- 15 Típicamente, en el caso de células madre pluripotentes, éstas se cultivan sobre una capa de células alimentadoras (*feeder cells*), preferiblemente fibroblastos. Las líneas celulares que se usan como alimentadoras se siembran a casi confluencia y son tratadas de forma que cesen de proliferar (típicamente por irradiación). A continuación se usan como soporte para el cultivo de células madre pluripotentes (por ejemplo Koopman and Cotton, Exp. Cell 154 (1984), 233-242; Smith and Hooper, Devel. Biol. 121 (1987), 1-91). El término "células alimentadoras" se usa para describir células de un tipo que se co-cultiva con células de un
- 20 segundo tipo para proporcionar un entorno en el que las células del segundo tipo puedan crecer. Las células alimentadoras son preferiblemente de una especie distinta a la de las células a las que dan soporte. Preferiblemente, las células madre embrionarias se cultivan sobre fibroblastos de ratón inmortalizados, tales como las células de ratón STO (Martin and Evans, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1975, 72:1441-1445) que se encuentran disponibles
- 25 comercialmente (ATCC CRL 1503) o fibroblastos humanos. Alternativamente, es posible hacer crecer las células en ausencia de células alimentadoras. La expresión "en ausencia de células alimentadoras" se entiende, según se usa en la presente invención, a condiciones de cultivo en donde el medio de cultivo no contiene células alimentadoras añadidas expresamente o en donde el medio de cultivo no ha sido previamente condicionado
- 30 mediante su puesta en contacto con un cultivo de células alimentadoras. Se entiende que si el cultivo de células pluripotentes para llevar a cabo el método de la invención procede de un cultivo original que se había cultivado sobre células alimentadoras, es posible que el cultivo contenga una cantidad residual de células alimentadoras sin que éstas hayan sido expresamente añadidas a dicho cultivo. Para ello, el cultivo requiere típicamente el uso de
- 35 medios de cultivos condicionados tales como

los descritos por Xu C. et al. (Nat Biotechnol., 2001, 19: 971–74), Rosler ES et al. (Dev Dyn 2004; 229: 259–74), Amit M. et al. (Biol Reprod., 2004; 70: 837–45) y/o el uso de placas de cultivo recubiertas de componentes de la matriz celular, tales como el método descrito por Klimanskaya, I. et al. 2005 Lancet (<http://image.thelancet.com/extras/04art11036web.pdf>).

5

La composición de células madre mesenquimales en contacto con el soporte de carbón activado es una composición celular en la que al menos el 40%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98% o al menos aproximadamente el 99% de las células expresan los marcadores característicos de células madre mesenquimales CD105 (SH2), CD73 (SH3/4), CD44, CD90 (Thy-1), CD71 y/o Stro-1 así como las moléculas de adhesión CD106, CD166 y/o CD29 y no expresan CD45, CD34, CD14, CD80, CD86, CD40 y/o CD31.

15

La caracterización fenotípica de una población de células por marcadores de la superficie se puede realizar ya sea por tinción de las células individuales (citometría de flujo) o mediante cortes histológicos de la población *in situ*, de acuerdo con métodos habituales. La determinación del perfil de expresión de marcadores de superficie mediante anticuerpos, o caracterización de inmunofenotipo, puede ser directa, utilizando un anticuerpo marcado, o indirecta, utilizando un segundo anticuerpo marcado contra el anticuerpo primario específico del marcador celular, logrando así la amplificación de la señal. Por otro lado, la presencia o ausencia de unión al anticuerpo se puede determinar por diferentes métodos que incluyen pero no se limitan a microscopía de inmunofluorescencia y citometría. Del mismo modo, es posible llevar a cabo el seguimiento de los niveles de la unión del anticuerpo por citometría de flujo, una técnica que permite que los niveles de fluorocromo sean correlacionados con la cantidad de antígenos presentes en la superficie celular unidos específicamente a los anticuerpos marcados. La expresión diferencial de una serie de marcadores de superficie en una población celular proporciona un método para la identificación y el aislamiento de dicha población.

25

30

#### *Segunda etapa del método de la invención*

En una segunda etapa del método de obtención del biomaterial de acuerdo a la invención, se mantiene el cultivo celular anteriormente obtenido en presencia de un medio de cultivo

35

adecuado y durante el tiempo suficiente para la diferenciación de las células madre en células de linaje osteocondral y la formación de una matriz extracelular, en donde dicho medio de cultivo comprende suero adecuado para el cultivo celular y en donde dicho medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero.

De acuerdo al método de la invención, el medio de cultivo adecuado para la diferenciación de las células madre en células de linaje osteocondral y la formación de una matriz extracelular es un medio que permite que las células madre en contacto con el soporte de fibras de carbón activado se diferencien en células de linaje osteogénico y células de linaje condrogénico y se forme la matriz extracelular derivada de la diferenciación osteogénica y condrogénica.

En una realización particular del método de la invención, el medio de cultivo en presencia del cual se pone en contacto el soporte de fibras de carbón activado de acuerdo a la invención con las células madre es un medio que permite que dichas células se adhieran al soporte de telas de carbón activado y que es adecuado para la diferenciación de las células madre en células de linaje osteocondral y la formación de una matriz extracelular. Este medio comprende suero adecuado para el cultivo celular, pero no está suplementado con factores adecuados para la diferenciación de las células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los factores presentes en dicho suero adecuado para el cultivo celular. Por lo tanto, el medio de cultivo adecuado para la diferenciación de las células madre comprende suero pero no factores de diferenciación adicionales y/o diferentes a los ya presentes en dicho suero. Factores adecuados para la diferenciación de células madre en linaje osteocondral comprenden factores adecuados para la diferenciación de células madre en linaje osteogénico y factores adecuados para la diferenciación de células madre en linaje condrogénico. Factores adecuados para la diferenciación de células madre en linaje osteogénico son conocidos del estado de la técnica y se han descrito anteriormente. Factores adecuados para la diferenciación de células madre en linaje condrogénico son conocidos del estado de la técnica y se han descrito anteriormente.

Así, el medio de cultivo en presencia del cual se pone en contacto el soporte de fibras de carbón activado de acuerdo a la invención con las células madre y se mantiene dicho cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero.

En una forma preferida de realización, el medio de cultivo no se ha suplementado con uno o más de los factores seleccionados del grupo formado por glucocorticoides como dexametasona, beta-glicerofosfato, ácido ascórbico, insulina-transferrina-selenito sódico (ITS), TGF-beta1, TGF-beta2, BMP, IGF-I, prolina, piruvato sódico, osteogenina y vitamina D, en particular vitamina D3. En una forma de realización aún más preferida, el medio de cultivo no ha sido suplementado con dexametasona, beta-glicerofosfato, ácido ascórbico o insulina-transferrina-selenito sódico (ITS).

Así, en una realización particular, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dicho factor es dexametasona. En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dicho factor es beta-glicerofosfato. En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dicho factor es ácido ascórbico. En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dicho factor es insulina. En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dicho factor es transferrina. En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dicho factor es selenio. En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dicho factor es insulina-transferrina-selenito sódico (ITS). En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dicho factor es TGF-beta1. En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dicho factor es TGF-beta2.

En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dicho factor es BMP. En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dicho factor es IGF-I. En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dicho factor es prolina. En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dicho factor es piruvato sódico. En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dicho factor es osteogenina. En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dicho factor es vitamina D.

En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dichos factores son dexametasona y beta-glicerofosfato. En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dichos factores son dexametasona y ácido ascórbico. En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dichos factores son dexametasona e insulina-transferrina-selenito sódico (ITS). En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dichos factores son beta-glicerofosfato y ácido ascórbico. En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o

diferentes a los presentes en el suero, en donde dichos factores son beta-glicerofosfato e insulina-transferrina-selenito sódico (ITS). En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dichos factores son ácido ascórbico e insulina-transferrina-selenito sódico (ITS).

En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dichos factores son dexametasona, beta-glicerofosfato y ácido ascórbico. En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dichos factores son dexametasona, beta-glicerofosfato e insulina-transferrina-selenito sódico. En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dichos factores son dexametasona, ácido ascórbico e insulina-transferrina-selenito sódico. En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dichos factores son beta-glicerofosfato, ácido ascórbico e insulina-transferrina-selenito sódico

En una realización alternativa, el medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero, en donde dichos factores son dexametasona, beta-glicerofosfato, ácido ascórbico e insulina-transferrina-selenito sódico (ITS).

Tal como entiende el experto en la materia, los sueros habitualmente empleados en cultivo celular tienen una composición que no está completamente definida, por lo que tales sueros pueden contener factores de diferenciación osteogénica y/o condrogénica tales como insulina, vitamina D o ácido ascórbico, entre otros. Sin embargo, el medio de cultivo para la diferenciación de las células madre que comprende suero adecuado para el cultivo celular según la invención no es suplementado en ningún caso con cantidades adicionales de factores de diferenciación osteogénica y/o factores de diferenciación condrogénica que ya pudieran estar presentes en dicho suero, ni con factores de diferenciación osteogénica y/o

factores de diferenciación condrogénica diferentes a los que ya pudieran estar presentes en el suero.

5 Sueros adecuados para el cultivo celular son conocidos por el experto en la materia e incluyen, sin limitación, suero fetal bovino, suero humano, suero de ternero, suero bovino adulto, suero de cabra, suero de pollo, suero porcino, suero de conejo, suero de oveja, suero de caballo, suero de cobaya, suero de ratón, suero de rata así como cualquiera de los anteriores sometidos a tratamiento previo tales como, por ejemplo, sueros inactivados con radiación gamma, mediante adsorción en carbón activo o mediante tratamiento a altas 10 temperaturas, sueros tratados para eliminar total o parcialmente las inmunoglobulinas, suero deslipidizado, suero enriquecido en hierro. En una realización particular de la invención, el medio de cultivo de acuerdo al método de la invención comprende suero adecuado para el cultivo celular de las células madre en contacto con un soporte de carbón activado, en donde dicho suero es suero bovino, en particular suero fetal bovino (FBS, *fetal bovine serum*). En una realización particular, la concentración de suero en el medio de cultivo es de 15 entre el 1 y el 25%, preferiblemente de entre el 1 y el 20%, más preferiblemente entre el 5 y el 10%, aún más preferiblemente del 10%. En una realización preferida de la invención, el medio de cultivo para la diferenciación de las células madre comprende suero fetal bovino en una concentración del 10%.

20 En una realización particular, el medio de cultivo de células madre es un medio de cultivo de células madre mesenquimales. Medios adecuados para el cultivo de células madre mesenquimales son conocidos por el experto en la materia e incluyen medios de cultivos para el crecimiento de células madre mesenquimales disponibles comercialmente que 25 incluyen, sin limitarse a, el medio de cultivo de células madre mesenquimales de Innoprot, medio de cultivo de crecimiento de células madre mesenquimales de Lonza, los medios de cultivo de células madre mesenquimales MesenPro RS, StemPro® MSC y StemPro® MSC SFM XenoFree de Life Technologies, medio de crecimiento de células madre mesenquimales DXF de PromoCell, así como cualquier medio de cultivo que permita el 30 crecimiento y proliferación de células madre mesenquimales tales como medio Eagle modificado por Dulbecco o DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), medio esencial mínimo alfa-MEM (*Minimum Essential Medium*), medio de Dulbecco modificado de Iscove o IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*), medio Eagle basal o BME (*Basal Medium Eagle*), RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) o similares. En una realización particular del 35 método de la invención, el medio de cultivo es DMEM.

Las condiciones de cultivo de acuerdo al método de la presente invención son tales que permiten la viabilidad, proliferación y diferenciación de las células madre en contacto con el soporte de carbón activado. Tales condiciones comprenden el cultivo celular en una atmósfera de CO<sub>2</sub> a concentraciones que pueden oscilar entre un 1 y un 6%, preferiblemente del 5%. En una realización particular de la invención, se usa el medio DMEM con un 10 % de suero bovino fetal bajo atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

En una realización particular, el medio de cultivo en el que se pone en contacto el soporte de telas de carbón activado de acuerdo a la invención con las células madre mesenquimales y en el que se mantiene dicho cultivo celular para la diferenciación de células madre en células de linaje osteocondral y formación de matriz extracelular carece de suplementación en factores de crecimiento diferentes y/o adicionales a los presentes en el suero. El término “factor de crecimiento”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a una sustancia biológicamente activa que influye en la proliferación, crecimiento, diferenciación, supervivencia y/o migración de diversos tipos de células, y puede efectuar cambios de desarrollo, morfológicos y funcionales en un organismo solo o cuando se modula por otras sustancias. Un factor de crecimiento puede actuar típicamente uniéndose, como ligando, a un receptor (por ejemplo, receptor de superficie o intracelular) presente en células sensibles al factor de crecimiento. Entre tales factores de crecimiento y/o proliferación se incluyen, sin quedar limitados a, proteína morfogenética ósea (BMP, *Bone Morphogenetic Protein*), factores de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF, *Epidermal Growth Factor*), factores de la familia del factor de crecimiento de tipo insulina (IGF, *Insuline-like Growth Factor*), factores de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*), factores de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, *Platelet-Derived Growth Factor*), factores de la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ, *Transforming Growth Factor beta*), factores de la familia del factor de crecimiento nervioso (NGF, *Neural Growth Factor*), factores de la familia del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, *Hepatocyte Growth Factor*), factores de crecimiento hematopoyéticos (HeGFs, *Hematopoietic Growth Factor*), angiopoyetina, glucocorticoides y similares.

Tal como se ha indicado anteriormente, el cultivo celular obtenido tras la puesta en contacto del soporte de carbón activado con células madre en condiciones adecuadas de adhesión celular de las células madre sobre el soporte se mantiene en un medio de cultivo adecuado, en donde dicho medio de cultivo comprende suero adecuado para el cultivo celular y en donde dicho medio de cultivo no ha sido suplementado con al menos un factor específico

adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicional y/o diferente a los presentes en el suero. En una realización particular del método de la invención, la concentración de dicho factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral presente en el suero comprendido por el medio de cultivo adecuado para el mantenimiento del cultivo celular al comienzo de la etapa (ii) del método de acuerdo a la presente invención, es igual o inferior a la concentración endógena de dicho al menos un factor adecuado para la diferenciación celular presente en dicho suero adecuado para cultivo celular y comprendido por dicho medio. Conocida la concentración de dicho al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral presente en el suero, y conocido el porcentaje de suero presente en el medio de cultivo, el experto en la materia puede determinar la concentración de dicho al menos un factor adecuado para la diferenciación presente en el medio de cultivo al comienzo de la etapa (ii) del método de la invención. Asimismo, en una realización particular del método de la invención, el mantenimiento del cultivo celular según la etapa (ii) del método de la invención comprende un cambio del medio presente en el cultivo, bien en su totalidad o en parte, por medio fresco, en donde dicho medio de cultivo fresco comprende suero adecuado para el cultivo celular y en donde dicho medio de cultivo fresco no ha sido suplementado con al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral adicionales y/o diferentes a los presentes en el suero. En este caso, la concentración de dicho al menos un factor adecuado para la diferenciación de células madre a células de linaje osteocondral presente en el suero adecuado para el cultivo celular comprendido por el medio de cultivo fresco es igual o inferior a la concentración endógena de dicho al menos un factor adecuado para la diferenciación celular presente en el suero adecuado para cultivo celular.

En una realización particular del método de la invención, el medio de cultivo en el que se pone en contacto el soporte de carbón activado de acuerdo a la invención con las células madre, y en el que se mantiene dicho cultivo celular para la diferenciación de células madre en células de linaje osteocondral y formación de matriz extracelular, comprende aminoácidos no esenciales y/o bFGF.

En una realización particular del método de la invención, el medio de cultivo en el que se pone en contacto el soporte fibras de carbón activado de acuerdo a la invención con las células madre, y en el que se mantiene dicho cultivo celular para la diferenciación de células madre en células de linaje osteocondral y formación de matriz extracelular comprende al menos un antibiótico. Por "antibiótico" se entiende una sustancia química producida por un

ser vivo o derivada sintética de ella que a bajas concentraciones mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles, generalmente bacterias, aunque algunos antibióticos se utilizan también para el tratamiento de infecciones por hongos o protozoos. En una realización particular, el medio de cultivo comprende penicilina.

5 En una realización particular, el medio de cultivo comprende estreptomicina. En una realización particular preferida, el medio de cultivo comprende penicilina y estreptomicina. La concentración de penicilina en el medio de cultivo es aproximadamente de 10 a aproximadamente 200 unidades por mililitro. La concentración de estreptomicina en el medio de cultivo es aproximadamente de 10 a aproximadamente 200 µg/ml.

10

De acuerdo con el método de la invención, las células madre se diferencian en células de linaje osteocondral. La presente invención contempla células de linaje osteocondral derivadas de células madre en donde dichas células de linaje osteocondral se encuentran en diferentes estadios de la diferenciación osteocondral. Así, de acuerdo con el método de la invención, las células madre pueden diferenciarse en células de linaje osteocondral en fase de osteoblasto/condroblasto o en fase más avanzada de osteocito/condrocito.

15

Según el método de la invención, las células madre se mantienen en cultivo sobre el soporte fibras de de carbón activado durante el tiempo suficiente para la diferenciación de dichas células madre en células de linaje osteocondral y la formación de una matriz extracelular. El experto en la materia puede hacer un seguimiento del proceso de diferenciación de las células madre en células de linaje osteocondral y de la formación de matriz extracelular mediante técnicas rutinarias tales como las descritas a continuación, determinando la presencia de marcadores de diferenciación osteogénica, de marcadores de diferenciación condrogénica y de la presencia de proteínas de matriz extracelular. Habitualmente, el cultivo de células madre sobre un soporte de telas de carbón activado en las condiciones descritas anteriormente para la diferenciación de dichas células madre en células de linaje osteocondral y la formación de una matriz extracelular se mantiene durante un periodo de entre 4 y 20 días, preferiblemente de entre 5 y 14 días, aún más preferiblemente de entre 6 y 10 días.

20

25

30

Prácticamente cualquier método convencional puede usarse dentro del marco de la invención para la detección de marcadores de diferenciación celular. A modo de ejemplo no limitante, la presencia de un marcador de diferenciación celular puede ser determinada por medio de anticuerpos con la capacidad para unirse específicamente a dicho marcador (o a fragmentos del mismo que contienen los determinantes antigénicos) y posterior detección de

35

los complejos resultantes antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos pueden ser monoclonales, policlonales o fragmento de la misma, Fv, Fab, Fab 'y F (ab') 2, scFv, diacuerpos, triabodies, tetrabodies y anticuerpos humanizados. De manera similar, los anticuerpos pueden marcarse. Ejemplos ilustrativos, no limitantes, de marcadores que pueden ser utilizados en la presente memoria incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, cofactores de enzimas o sustratos, inhibidores enzimáticos, partículas, o colorantes. Hay una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención, tal como la aplicación combinada de anticuerpos no marcados (anticuerpos primarios) y anticuerpos marcados (anticuerpos secundarios), Western blot o inmunoblot, ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático), DAS-ELISA (ELISA sandwich de doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, inmunofluorescencia, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en la precipitación coloidal en formatos tales como las tiras de reactivo. Otras formas de detectar marcadores incluyen, por ejemplo, técnicas de cromatografía de afinidad o ensayos de unión a ligando.

En una realización particular, la determinación de los niveles de un marcador se realiza por inmunofluorescencia cuantitativa. La inmunofluorescencia (IF) es una técnica basada en la microscopía fluorescente y que es utilizada principalmente para el análisis de muestras biológicas. Esta técnica se basa en la especificidad de un anticuerpo hacia su antígeno para dirigir un marcador fluorescente hacia un objetivo particular de biomoléculas dentro de una célula, permitiendo así la visualización de la distribución de la molécula objetivo a través de la muestra. La inmunofluorescencia puede aplicarse en secciones de tejido, líneas celulares cultivadas, o células individuales, y puede ser utilizada para analizar la distribución de las proteínas, glicanos, y pequeñas moléculas biológicas y no biológicas. Además, la inmunofluorescencia también puede ser aplicada en combinación con otros métodos de marcaje fluorescente no basados en anticuerpos, como el marcaje con DAPI para marcar el ADN. En el análisis de muestras pueden emplearse diferentes diseños de microscopio, tales como el microscopio de epifluorescencia y el microscopio confocal.

Para el marcaje fluorescente, las etiquetas pueden ser fluorocromos u otros reactivos medibles. La selección de una o más etiquetas fluorescentes para su uso dependerá de los láseres utilizados para excitar los fluorocromos y los detectores disponibles. Un ejemplo de una etiqueta incluye, pero no se limitan a, azul (488 nm); verde (normalmente con la indicación FL1): FITC1 Alexa Fluor 488, GFP, CFSE, CFDA-SE, DyLight 488; naranja

(generalmente FL2): PE, PI; canal rojo (normalmente FL3): PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-Alexa Fluor 700, PE-Cy5 (tricolor), PE-Cy5.5; Infra-rojo (normalmente FL4, no se incluye en todos FACS máquinas como estándar): PE-Alexa Fluor 750, PE-Cy7; diodo láser rojo (635 nm); APC; APC-Cy7, APC-eFluor 780; Alexa Fluor 700; Cy5; Draq-5; láser violeta (405 nm); Pacific Orange; Amine Aqua; Pacific Blue, DAPI, Alexa Fluor 405; eFluor 450; eFluor nanocristales 605; eFluor 625 nanocristales y nanocristales eFluor 650.

En una realización alternativa, la detección de la presencia y del nivel de un marcador celular, tal como un marcador de diferenciación celular, se puede determinar, por ejemplo, por medio de citometría de flujo utilizando métodos y aparatos convencionales. Por ejemplo, se puede emplear un citómetro de flujo BD LSR II (BD Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) con anticuerpos disponibles comercialmente y protocolos conocidos en la técnica. Así, pueden seleccionarse las células que emiten una señal para un marcador de superficie celular específico más intensa que el ruido de fondo. La señal de fondo se define como la intensidad de la señal dada por un anticuerpo no específico del mismo isotipo que el anticuerpo específico utilizado para detectar cada marcador de superficie en el análisis de FACS convencional. Para que un marcador para ser considerado positivo, la señal específica observada debe ser 20%, preferiblemente, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 500%, 1000%, 5000% , 10000% o por encima del más intenso que la señal de fondo utilizando los métodos y aparatos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) y los anticuerpos disponibles comercialmente.

En una realización particular de la invención, se detecta la presencia de proteínas de matriz extracelular relacionadas con la diferenciación en células de linaje osteocondral, mediante métodos similares a los anteriormente descritos en relación a la detección de marcadores celulares de diferenciación.

#### *Biomaterial de la invención y sus usos*

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el biomaterial obtenido de acuerdo al método descrito anteriormente. Dicho biomaterial comprende un soporte de fibras de carbón activado, células de linaje osteocondral y matriz extracelular.

El biomaterial desarrollado por los inventores es de carácter biocompatible por lo que puede ser empleado para su implante en un sujeto en necesidad de tejido osteocondral.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con el uso de un biomaterial obtenido de acuerdo al método anteriormente descrito para preparar un medicamento. Alternativamente la presente invención se relaciona con el biomaterial  
5 obtenido de acuerdo al método anteriormente descrito para su uso en medicina.

En otro aspecto adicional, la presente invención se relaciona con el uso del biomaterial obtenido de acuerdo al método anteriormente descrito para preparar un medicamento para el tratamiento de una patología ósea, de una patología condrogénica, de una patología que  
10 cursa con una lesión condral, de una patología que cursa con una lesión ósea o de una patología que cursa con una lesión osteocondral. Alternativamente, la presente invención se relaciona con el biomaterial obtenido de acuerdo al método anteriormente descrito para su uso en el tratamiento de una patología ósea, de una patología condrogénica, de una patología que cursa con una lesión condral, de una patología que cursa con una lesión ósea  
15 o de una patología que cursa con una lesión osteocondral. Alternativamente, la presente invención se relaciona con un método de tratamiento de una patología ósea, de una patología condrogénica, de una patología que cursa con una lesión condral, de una patología que cursa con una lesión ósea o de una patología que cursa con una lesión osteocondral que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva  
20 del biomaterial obtenido de acuerdo al método anteriormente descrito.

El biomaterial de acuerdo a la presente invención comprende células de linaje osteocondral, en donde dichas células de linaje osteocondral se diferencian a partir de células madre del modo descrito anteriormente de acuerdo al método de la invención, y en donde dichas  
25 células madre pueden ser autólogas, alogénicas o xenogénicas con respecto al sujeto en necesidad de tejido osteocondral y al que se dirige el implante del biomaterial de acuerdo a la invención. El término "autoimplante" (también denominado homoimplante) hace referencia a un implante en el que el donante de las células que forman parte del implante y el receptor de dicho implante son el mismo sujeto. En particular, el biomaterial de acuerdo a la  
30 invención comprende células de linaje osteocondral obtenidas mediante diferenciación según el método de la invención de células madre procedentes del mismo sujeto al que es implantado dicho biomaterial. El término "aloimplante" hace referencia a un implante en el que el donante de las células que forman parte del implante y el receptor de dicho implante son sujetos que pertenecen a la misma especie. En particular, el biomaterial de acuerdo a la  
35 invención comprende células de linaje osteocondral obtenidas mediante diferenciación según el método de la invención de células madre procedentes de un sujeto donante que

pertenece al misma especie que el sujeto receptor del implante. El término “xenoimplante” (también denominado heteroimplante) hace referencia a un implante en el que el donante de las células que forman parte del implante y el receptor de dicho implante son sujetos que pertenecen a especies diferentes. En particular, el biomaterial de acuerdo a la invención  
 5 comprende células de linaje osteocondral obtenidas mediante diferenciación según el método de la invención de células madre procedentes de un sujeto donante que pertenece a una especie diferente respecto al sujeto receptor del implante.

Por lo tanto, el biomaterial obtenido de acuerdo al método de la invención anteriormente  
 10 expuesto puede emplearse para su implante en un sujeto, preferiblemente en un mamífero, aún más preferiblemente en un ser humano.

El biomaterial de acuerdo en la invención es de interés para su implante en un sujeto en necesidad de tejido osteocondral. Patologías y trastornos que cursan con destrucción o con  
 15 pérdida de tejido óseo, tanto por pérdida del balance entre síntesis y destrucción de tejido óseo como por decalcificación, incluyen cáncer, metástasis osteolítica, enfermedades óseas degenerativas (tales como osteoporosis), enfermedades autoinmunes (tales como artritis reumatoide, lupus, esclerosis múltiple o espondilits anquilosante), trastornos gastrointestinales y digestivos (tales como celiaquía, enfermedad de Crohn, colitis  
 20 ulcerante), trastornos hormonales (tales como diabetes, hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, síndrome de Cushing, tirotoxicosis o menopausia prematura), trastornos hematológicos (tales como leucemia, linfoma, mieloma múltiple o talasemia), trastornos neurológicos y nerviosos (tales como infarto, enfermedad de Parkinson o daños en la médula ósea), enfermedades mentales (tales como trastornos de la alimentación, depresión). Existen otros  
 25 procesos que cursan igualmente con pérdida de tejido osteocondral, tales como fracturas, falta de ejercicio, falta de estímulos para el mantenimiento del tejido óseo, falta de gravedad, pérdida de peso, malnutrición, etc. Otras patologías óseas incluyen, sin quedar limitadas a, osteoporosis, panosteitis, osteoartrosis, osteocondritis dessecans, hipervitaminosis A, fragmentación del proceso coronoides, raquitismo, displasia de cadera, no unión proceso  
 30 ancóneo, osteodistrofia hipertrófica.

Patologías y trastornos que cursan con destrucción o con pérdida de tejido cartilaginoso incluyen, sin quedar limitados a, cáncer, obesidad, trauma, inestabilidad articular, deficiencias nutricionales, alternaciones hormonales, alineación corporal inadecuada,  
 35 osteoartritis, enfermedades articulares degenerativas (tales como artritis degenerativa u osteoartritis), destrucción mecánica traumática del cartílago articular, destrucción mecánica

progresiva del cartílago articular, osteocondritis disecante, acondroplasia, costocondritis, hernia del disco vertebral, policondritis recidivante y enfermedad periodontal.

5 Las lesiones osteocondrales son frecuentes en articulaciones tales como la rodilla. Las lesiones del cartílago articular de la rodilla pueden ser condrales u osteocondrales, según tengan componente óseo o no, y se producen como consecuencia de fuerzas excesivas de compresión o de cizallamiento. Tanto si este tipo de lesiones son agudas o crónicas, tienden a evolucionar con el tiempo hacia procesos degenerativos artrósicos incapacitantes. Las lesiones agudas o "fracturas osteocondrales" suelen producirse como consecuencia de  
10 traumatismos directos o por torsión acompañando a diferentes lesiones meniscales y/o ligamentosas y/o fracturarias. Las lesiones crónicas o "condropatías" se relacionan con múltiples factores: mecánicos (desviaciones axiales en varo o valgo de rodilla, sobrepeso), reumáticos (artritis reumatoide, depósito de cristales o condrocalcinosis), microtraumáticos ("osteocondritis disecante") o vasculares ("necrosis avascular").

15

La presente invención contempla que el biomaterial de acuerdo a la invención sea implantado en un sujeto en presencia de diluyentes y portadores farmacéuticamente aceptables incluyendo, sin quedar limitados a, disoluciones tamponadoras acuosas salinas, solventes o medios de dispersión. Tales diluyentes y portadores son conocidos en el estado  
20 de la técnica y preferiblemente son estériles. Preferiblemente, el diluyente o el portador es estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y se conserva en ausencia de contaminación con microorganismos tales como bacterias y hongos mediante el uso de, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. Algunos ejemplos de materiales y soluciones que pueden servir como portadores farmacéuticamente  
25 aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa (3), y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol ; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua exenta de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de  
30 Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones de pH tamponado; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos, y (22) otras sustancias no tóxicas compatibles empleadas

35

en formulaciones farmacéuticas.

En una realización de la invención, la composición que comprende el biomaterial de la invención para su implante comprende además un adhesivo. En una realización particular  
 5 de la invención, el adhesivo es un adhesivo de base de fibrina, tal como un gel de fibrina o cola de fibrina o polímero basado en fibrina o adhesivo basado en fibrina, u otro adhesivo o cola de otro tejido, tal como, por ejemplo colágeno, cianoacrilato, trombina, y polietilen glicol. Otros materiales que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a alginato de calcio, agarosa, isoforma tipo I, II o IV de colágeno, el ácido poli-láctico/poli-glicólico, derivados de  
 10 hialuronato o de otros materiales.

En una realización de la invención, la composición que comprende el biomaterial de la invención para su implante comprende además un agente terapéutico tal como un agente analgésico (en el tratamiento de la inflamación y del dolor en el lugar del implante) o un  
 15 agente antiinfeccioso (en la prevención de infección en el lugar del implante).

En particular, ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos de utilidad de acuerdo a la invención incluyen las siguientes categorías terapéuticas: analgésicos, como los medicamentos anti-inflamatorios no esteroides, agonistas opiáceos y salicilatos; agentes  
 20 anti-infecciosos, tales como antihelmínticos, antianaeróbicos, antibióticos, antibióticos aminoglucósidos, antibióticos antifúngicos, cefalosporinas, antibióticos macrólidos, diversos antibióticos beta-lactámicos, penicilinas, antibióticos quinolonas, antibióticos sulfonamidas, antibióticos de tetraciclina, antimicobacterianos, antimicobacterianos antituberculosos, antiprotozoarios, antiprotozoarios antimaláricos, agentes antivirales, agentes anti-  
 25 retrovirales, escabicidas, agentes anti-inflamatorios, corticosteroides antiinflamatorios, antipruriginosos/anestésicos tópicos locales, antiinfecciosos, antimicóticos tópicos antiinfecciosos, antivirales tópicos antiinfecciosos, agentes electrolíticos y renales, tales como agentes acidificantes, agentes alcalinizantes, diuréticos, inhibidores de la anhidrasa carbónica, diuréticos, diuréticos de asa, diuréticos osmóticos, diuréticos ahorradores de  
 30 potasio, diuréticos de tiazida, suplementos de electrolitos, y agentes uricosúricos, enzimas, tales como enzimas pancreáticas y las enzimas trombolíticos, agentes gastrointestinales, tales como antidiarreicos, antieméticos, gastrointestinales agentes anti-inflamatorios gastrointestinales, el salicilato de agentes anti-inflamatorios, antiácidos anti-úlceras gástrica, agentes inhibidores de la bomba de ácido antiulcerosos agentes, mucosa gástrica  
 35 antiulcerosos agentes bloqueantes H<sub>2</sub>, antiulcerosos, agentes colestilíticos digestants, eméticos, laxantes y ablandadores de heces y agentes procinéticos, anestésicos generales

como los anestésicos inhalatorios halogenados anestésicos inhalatorios, anestésicos intravenosos, barbitúricos, benzodiazepinas anestésicos intravenosos anestésicos por vía intravenosa de opiáceos y anestésicos intravenosos agonistas, hormonas y modificadores hormonales, como abortivos, agentes corticosteroides suprarrenales, agentes suprarrenales, los andrógenos, antiandrógenos, inmunobiológicos agentes, tales como inmunoglobulinas, inmunosupresores, toxoides, y vacunas; anestésicos locales, tales como amida de los anestésicos locales y de los anestésicos locales de tipo éster, agentes musculoesqueléticos, tales como anti-gota agentes antiinflamatorios, corticosteroides anti-inflamatorios, agentes, compuestos de oro anti-inflamatoria agentes inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), agentes anti-inflamatorios salicilato, minerales y vitaminas, como la vitamina A, vitamina B, vitamina C, vitamina D, vitamina E y vitamina K.

En una realización particular, los agentes terapéuticos útiles según las categorías anteriores incluyen: (1) analgésicos en general, tales como lidocaína o sus derivados, y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) analgésicos, incluyendo diclofenaco, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno y, (2) analgésicos opiáceos agonistas, como la codeína, fentanilo, hidromorfona y la morfina, (3) analgésicos de salicilato, como la aspirina (ASA) (con cubierta entérica ASA), (4) bloqueadores H1 antihistamínicos, tales como terfenadina, clemastina y (5) agentes anti-infecciosos, tales como mupirocina; (6) antianaeróbicos anti-infecciosos, tales como cloranfenicol y clindamicina; (7) antifúngicos antibióticos antiinfecciosos, tales como anfotericina B, clotrimazol, fluconazol y ketoconazol; (8) contra el antibiótico macrólido -infecciosos, tales como la azitromicina y eritromicina; (9) diversos beta-lactámico antiinfecciosos, tales como aztreonam y imipenem; (10) antibiótico de penicilina antiinfecciosos, tales como nafcilina, oxacilina, penicilina G, penicilina V y; (11) quinolona antibióticos antiinfecciosos, tales como ciprofloxacina y norfloxacina; (12) antibiótico tetraciclina antiinfecciosos, tales como doxiciclina, minociclina y tetraciclina; (13) antituberculosos antimicobacterianos antiinfecciosos, tales como isoniazida (INH), rifampicina y; (14) antiprotozoarios antiinfecciosos, como atovaquona y dapsona; (15) antipalúdicos antiprotozoarios antiinfecciosos, tales como cloroquina y pirimetamina; (16) anti-retrovirales antiinfecciosos, tales como ritonavir y zidovudina; (17) contra el antiviral -infeccioso agentes, tales como aciclovir, ganciclovir, interferón alfa, y rimantadina; (18) antifúngicos tópicos antiinfecciosos, tales como anfotericina B, clotrimazol, miconazol, nistatina y; (19) antivirales tópicos antiinfecciosos, tales como el aciclovir; (20) agentes electrolíticas y renales, como la lactulosa; (21) diuréticos de asa, como la furosemida, (22) diuréticos ahorradores de potasio, como triamtereno; (23) diuréticos tiazídicos, tales como

hidrocortizida (HCTZ), (24) agentes uricosúricos, tales como probenecid; (25) enzimas, tales como RNasa y DNasa; (26) antieméticos, tales como proclorperazina; (27) salicilato gastrointestinales inflamatorias anti-agentes, tales como sulfasalazina; (28) de la bomba gástrica de ácido anti-inhibidor agentes de úlceras, tales como el omeprazol; (29)

5 bloqueantes H<sub>2</sub>, agentes anti-úlceras, tales como cimetidina, famotidina, nizatidina y ranitidina; (30) digestivos, tales como pancrelipase; (31) agentes procinéticos, tales como la eritromicina (32; éster) anestésicos locales, tales como benzocaína y procaína; (33) musculoesqueléticos corticosteroides anti-inflamatorios, agentes, tales como beclometasona, betametasona, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, y prednisona; (34)

10 musculoesqueléticos antiinflamatorios inmunosupresores, tales como azatioprina, ciclofosfamida y metotrexato; (35) musculoesqueléticos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como diclofenaco, ibuprofeno, ketoprofeno, ketorlac, y naproxeno; (36) minerales, tales como hierro, calcio y magnesio; (37) Los compuestos de vitamina B , tales como la cianocobalamina (vitamina B12) y la niacina (vitamina B3); (38) compuestos de

15 vitamina C, tales como ácido ascórbico, y (39) compuestos de vitamina D, tales como calcitriol.

En una realización particular, el agente terapéutico puede ser un factor de crecimiento u otra molécula que afecta a la diferenciación celular y/o proliferación. Los factores de crecimiento

20 que inducen la diferenciación de estados finales son bien conocidos en la técnica, y puede ser seleccionado de cualquiera de esos factores que se ha demostrado que induce un estado de diferenciación final. Los factores de crecimiento para uso en los métodos aquí descritos pueden, en ciertas realizaciones, ser variantes o fragmentos de un factor de crecimiento de origen natural. Por ejemplo, una variante puede ser generada al hacer

25 cambios de aminoácidos conservadores y prueba de la variante resultante en uno de los ensayos funcionales descritos anteriormente u otro ensayo funcional conocido en la técnica. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo

30 de aminoácidos que tienen alifático-hidroxilo en sus cadenas laterales es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen que contiene amida en las cadenas laterales es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina, y un grupo de aminoácidos que tienen que contiene

35 azufre en las cadenas laterales es cisteína y metionina. Grupos preferidos de sustitución de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-

valina, y asparagina-glutamina.

Como los expertos en la técnica apreciarán, las variantes o fragmentos de factores de crecimiento de polipéptidos se pueden generar usando técnicas convencionales, tales como mutagénesis, incluyendo la creación de mutación de punto discreto (s), o por truncamiento. Por ejemplo, la mutación puede dar lugar a variantes que conservan sustancialmente la misma, o simplemente un subconjunto, de la actividad biológica de un factor de crecimiento polipeptídico de la que se derivó.

10

\*\*\*

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados en ningún caso como limitativos del alcance de la misma.

#### EJEMPLO 1

15

#### Diferenciación osteocondral de células madre mesenquimales sobre telas de carbón activo

##### 1. Materiales y métodos

##### 20 *Tela de carbón activado*

Se empleó una tela de carbón activado (TCA, Fig. 1A) comercial caracterizada por la adsorción de N<sub>2</sub> a -196 °C (Autosorb 1, Quantachrome) tras desgasificación (12-24 h a 110 °C en condiciones de vacío a 10<sup>-6</sup> mbar). La isoterma de adsorción del N<sub>2</sub> (Fig. 1B) se analizó usando la ecuación BET para obtener el área superficial y mediante el método de Dubinin-Radushkevich para conocer el volumen de microporos (poros de menos de 2 nm de diámetro). El volumen total de poros se obtuvo a partir de la cantidad absorbida a la presión relativa de 0.95. El pH de la superficie para el punto de carga cero se midió a través de la titulación potenciométrica, como se describe en Moreno-Castilla *et al.* 2004, Langmuir 20 (19):8142-8148. El contenido de oxígeno (1,7%) se obtuvo con un analizador de elementos (Fisons Carlo Erba 1108) y el contenido cenizas (0,2 %) se determinó quemando una porción de la TCA (810 °C) y pesando la masa restante.

35

##### *Células madre del estroma del cordón umbilical*

Las muestras de cordones umbilicales (UCs) se recogieron en el Departamento de

Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN, Granada) tras el parto de recién nacidos procedentes de embarazadas sanas. La recogida y todos los procedimientos necesarios para llevarla a cabo contaron con la aprobación del Comité Ético Institucional del HUVN. Los tejidos obtenidos se transportaron y procesaron de acuerdo con los procedimientos habituales.

Los tejidos fueron transportados en una solución fría de PBS que contenía 20 mM EDTA (Sigma), 2,5 mg/ml de anfotericina B (Gibco), 50 mg/ml de gentamicina (Gibco) y 1% de penicilina-estreptomicina (Hyclone) y fueron mantenidos a 4 °C . Las venas y arterias del cordón umbilical se separaron del estroma mediante extracción manual. Los vasos y su gelatina de Wharton circundante se digirieron enzimáticamente mediante una solución de digestión que contenía 1,38 mg/ml de dispasa (Worthington, 2104), 0,2 mg/ml de hialuronidasa (Sigma, H6254), y 0,8 mg/ml de colagenasa IV (Worthington, 4188). Los tejidos se sometieron a dos rondas durante 45 min de digestión a 37 °C en solución de digestión seguidas por una digestión durante 20 min en 0,25 % de tripsina-EDTA (Sigma). La digestión se detuvo mediante la adición de 10% de suero fetal bovino (FBS), y todas las suspensiones se almacenaron en hielo hasta que las incubaciones de digestión llegaron a conclusión. Las suspensiones se combinaron y se pasaron a través de una célula de filtro 70 micras (BD Falcon, 352350). Los glóbulos rojos se lisaron en un tampón de 15,5 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM KHCO<sub>2</sub>y 10 mM EDTA a temperatura ambiente durante 5 min. La suspensión celular resultante se lavó en medio de cultivo, las células se contaron en una cámara de Neubauer y se sembraron en matraces de 75 cm<sup>2</sup> (T-75). Típicamente, se obtuvieron alrededor de 10<sup>6</sup> células a partir de un cordón umbilical de 10-15 cm de longitud. Las células primarias así obtenidas requieren una etapa adicional de expansión *in vitro* para alcanzar un número mayor de células. Así, las células mesenquimales estromales obtenidas a partir de cordón umbilical se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de hipoxia (5% de CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub>), en medio de cultivo compuesto por 60 % v/v DMEM con 1 g/l de glucosa (Gibco, 11885092), 40 % v/v MCDB-201 (Sigma, M-6770), 2 % v/v suero bovino fetal (FBS), 0,8 mg/ml BSA (Sigma, A-1933), 1x LA-BSA (Sigma, L-9530), 1x ITS (Sigma I-3146), 1x penicilina-estreptomicina (HyClone, SH30010), 1·10<sup>-4</sup> mM ácido ascórbico (Sigma, A-8960), 5·10<sup>-9</sup> M dexametasona (Sigma, D-2915), 10 ng/ml de EGF (Sigma, E-9644), 10 ng/ml de PDGF (Peprotech, 100-14B) y 5·10<sup>-5</sup> M de beta-mercaptoetanol (Gibco, 31350-010), complementado con el 1 % v/v de concentrado de lípidos (Gibco, 11905) y renovándolo cada 3-4 días. En estas condiciones se favoreció tanto la adhesión de las células madre mesenquimales al soporte empleado para el cultivo, eliminándose otras células no adherentes, como la expansión de dichas células madre, como se describe en Farias *et al.*

2011 *Placenta* 32:86-95.

*Estudios de cinética del crecimiento*

5 Las células madre mesenquimales humanas derivadas del estroma del cordón umbilical o UCSSC ( $5 \times 10^5$ ) se sembraron en discos de TCA de 16 mm de diámetro y se colocaron en placas de 24 pocillos durante 24 horas. Tras esta etapa los discos se transfirieron a tubos estériles de 10 ml con 5 ml de medio de cultivo, compuesto por DMEM con 4,5 g/l de glucosa, 10% de suero bovino fetal, 1% de penicilina-estreptomicina, 1% de aminoácidos no  
 10 esenciales y 10 ng/ml de bFGF, y se incubaron a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub> y humedad saturada. La mitad del medio de cultivo se cambió cada 2 días.

Mediante microscopia de fluorescencia (Leica DM, excitación a 365 nm y emisión a 470 nm) se valoró la adhesión celular y los procesos de diferenciación y crecimiento tras 3, 7, 10, 14,  
 15 17 y 21 días (Fig. 2A y B). Las muestras se fijaron con paraformaldehído al 3,5% durante 20 min y se tiñeron con 85 µg/ml 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI Molecular Probes) durante 30 min a 37°C. Se obtuvieron entre 8 y 10 imágenes de cada muestra usando el objetivo de 10x y se analizaron con el software Image J (NIH). La población total de células se contó y se obtuvo la media de los resultados para cada TCA. Los experimentos se realizaron por  
 20 triplicado. La población celular relativa se calculó dividiendo el recuento total para cada día, por el total obtenido para el día 3. La duplicación relativa se representó en función del tiempo en cultivo.

*Diferenciación osteogénica y condrogénica*

25 Tras lavar con PBS y fijar, los discos de TCA se tiñeron con Rojo Sirio (Sigma) al 0,1% para marcar el colágeno. El colorante excedente se lavó con ácido acético al 0,1 M y agua destilada antes de tomar las imágenes. La cinética de crecimiento se siguió marcando los núcleos con DAPI (Fig. 3, A y B)

30 Para confirmar el potencial osteogénico y condrogénico, las células UCSSC se sembraron en los discos de TCA y se cultivaron con medio de inducción osteogénica (Tabla 1), medio de inducción condrogénica (Tabla 2) o medio de cultivo sin suplementos específicos para diferenciación (Tabla 3). Al final de cada tiempo experimental, las células se fijaron en PFA  
 35 frío al 3,5% PFA durante 20 minutos y, tras ello, se incubaron a temperatura ambiente durante 45 minutos en solución de bloqueo (PBS 1x con FBS 1%). Las muestras en las que

se indujo la diferenciación osteogénica fueron inmunomarcadas durante toda la noche en una dilución 1:100 de anticuerpo primario frente a osteopontina (Abcam) a 4°C. El anticuerpo secundario, conjugado con Alexa 647 (Life Technologies), se utilizó en una dilución 1:1000 con agitación orbital a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Las muestras sometidas a diferenciación condrogénica se inmuno-marcaron en condiciones similares, utilizando una dilución 1:250 de anticuerpo primario frente al colágeno II humano (Abcam) y anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 (Life Technologies). Tras lavar tres veces con PBS 1X frío, las muestras se montaron en portas con ProLong®Gold con DAPI (Life Technologies) y las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal láser (Leica DMI6000).

Tabla 1. Medio de inducción “osteogénica” de diferenciación de células madre mesenquimales sobre un soporte de TCA

<b>Materiales</b>	<b>Referencia</b>	<b>Concentración final</b>
D-MEM (1 g/L glucosa)	Gibco 11885092	
FBS (suero fetal bovino)	PAA, Gold	10%
Penicilina-estreptomicina	Gibco, 15140	1×
Dexametasona	Sigma, D2915	0,1 µM
β-glicerofosfato	Fluka	10 mM
Acido Ascórbico	Sigma, A8960	0,05 mM

Tabla 2. Medio de inducción “condrogénica” de diferenciación de células madre mesenquimales sobre un soporte de TCA

<b>Materiales</b>	<b>Referencia</b>	<b>Concentración final</b>
DMEM 4,5 g/L glucosa	Gibco, 11885092	
Penicilina-estreptomicina	Gibco, 15140	1×
Dexametasona	Sigma, D 9215	0,1 µM
Acido Ascórbico	Sigma, A8960	0,05 mM

Tabla 3. Medio de cultivo “basal” sin suplementos específicos para la diferenciación de células madre mesenquimales sobre un soporte de TCA

<b>Componente</b>	<b>Referencia</b>	<b>Concentración final</b>
DMEM (1 g/L glucosa)	Gibco, 11885092	
FBS (suero fetal bovino)	PAA, Gold	10%
Penicilina-estreptomicina	Gibco, 15140	1X
Aminoácidos no esenciales (NEAA)	Gibco	1X
bFGF (basic Fibroblast Growth Factor)	Biomedal RP4936	0,01 µg/ml

La sonda XPS permite realizar medidas de 2-3 nm de profundidad, lo que proporciona información acerca de la química superficial y la composición del biomaterial. El equipo XPS utilizado fue un Escalab 200R (VG Scientific Co.) equipado con una fuente de rayos X de MgK\* ( $h\nu = 1253.6$  eV) y un analizador de electrones semiesférico. Las muestras se sometieron a alto vacío hasta la presión basal de  $10^{-9}$  mbar que se mantuvo durante la toma de datos. Se obtuvieron los espectros de los picos fotoelectrónicos de C<sub>1s</sub>, N<sub>1s</sub>, O<sub>1s</sub> y Ca<sub>2p</sub> y P<sub>2p</sub> (Fig. 4). Cada región de interés del espectro fue escaneada varias veces para obtener unos buenos ratios señal-ruido. Los espectros obtenidos y corregidos se ajustaron a curvas de Lorentzian y Gaussian, usando como control interno estándar el pico del C<sub>1s</sub> a 284.6 eV, para poder obtener el número, la posición y el área de cada uno de los picos (Fig. 5, Fig. 6 y Fig. 7).

#### *Microscopía Electrónica de Barrido*

La morfología de las TCAs tras el cultivo de UCSSC durante 3 y 5 semanas se observó usando un microscopio HRSEM (GEMINI, Carl Zeiss SMT). Una vez fijadas las muestras se trataron con tetróxido de osmio y se sometieron a secado (punto crítico). Las observaciones se realizaron a un voltaje de 15 kV (Fig. 8, Fig. 9 y Fig. 10).

#### *Análisis estadístico*

Los datos obtenidos se representaron en forma de histogramas teniendo en cuenta la media y la desviación estándar correspondientes. Las diferencias entre los múltiples puntos obtenidos en el transcurso de los experimentos se valoraron por el análisis de la varianza de un único factor (ANOVA) seguido por el test de comparación múltiple de Bonferroni o de Dunnett. Para determinar la relación entre el número de células y el tiempo de cultivo se realizó un análisis de regresión lineal. \*, \*\* y \*\*\* se refieren a los datos del valor de P inferior a 0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente.

## 2. Resultados

#### *Tela de carbón activado*

Las TCA usadas como sustrato en los experimentos tienen un área superficial BET de 2,089 m<sup>2</sup>/g y un volumen total de poros de 0,927 cm<sup>3</sup>/g, de los cuales 84% son microporos con una anchura media de 1,23 nm y el 16% restante son mesoporos de anchuras de entre 2 y 4 nm.

Una de las características de la porosidad de las TCA en comparación con otros carbones porosos es que los microporos son perpendiculares al eje axial de las fibras y están, por lo tanto, directamente abiertos a la superficie.

5 Puesto que las células mesenquimales tienen un tamaño del orden de algunas decenas de micrometros, dichas células permanecen sobre la superficie más externa de la TCA atrapadas entre el entramado de fibras de carbón activado que componen la estructura de la tela de carbón activado. Cabe la posibilidad de que algunas de las cadenas de proteínas que forman la membrana celular penetren en mayor o menor extensión en los poros de las  
10 fibras, interaccionando con sus paredes para actuar como anclaje de las células mesenquimales. El pH de la disolución usada para el cultivo de estas células (7,4) es muy cercano al del  $pH_{PCC}$ , por lo que la superficie de la TCA prácticamente estará desprovista de cargas electrostáticas. En estas condiciones predominan las interacciones no electrostáticas entre la TCA y las células mesenquimales.

15

*Cinética del crecimiento de UCSSC cultivadas en condiciones control*

El número medio del recuento de núcleos de 5 a 8 sitios diferentes en cada TCA tras la tinción con DAPI se utilizó para conocer la proliferación en las tres réplicas del experimento.  
20 En la Figura 2 se puede observar que las UCSSC proliferaron progresivamente en las TCA desde el día 3 al 17. Además, tras 17 días el recuento de núcleos fue significativamente más alto que a los días 3, 7 y 10. Entre los días 14 y 17 no se apreciaron diferencias significativas, sugiriendo que la tasa de proliferación celular había cambiado. Las diferencias significativas entre los valores medios de varias columnas aparecen con su significancia  
25 señalada con símbolos en la gráfica (Fig. 2). El tiempo de duplicación de las UCSSC cultivadas en TCA se puede calcular a partir de los datos resumidos en la Figura 2 y es  $TD \approx 88 \pm 15$  horas. El recuento de núcleos tras 21 días decreció sustancialmente hasta menos del 50% del número de núcleos encontrados tras 17 días. Esta disminución en el recuento de núcleos en el experimento de cinética de proliferación de UCSSC en TCA coincide con la  
30 secreción de proteínas de la ECM por las UCSSC, lo que se puede identificar por la tinción con Rojo Sirio y por su autofluorescencia.

35

*La cinética del crecimiento celular en medio de diferenciación osteogénica es significativamente diferente de la cinética en medio de diferenciación condrogénica*

Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 3A, en la cual se puede ver que la

cinética de proliferación se desarrolla en dos fases sucesivas: la inicial en la cual el número de núcleos se mantiene constante durante las dos primeras semanas, y la segunda, en la cual el recuento de células tras 17 y 21 días fue significativamente mayor.

5 Los resultados de la diferenciación condrogénica de células UCSSC se resumen en la Figura 3B, donde se puede ver que las células permanecen viables y proliferan lentamente hasta el día 14, a partir del cual su número decrece. El experimento muestra dos etapas: la inicial, en la cual el crecimiento celular es el proceso dominante, seguido de una segunda durante la cual hay una disminución constante en el número de células viables.

10

Cuando se comparan las cinéticas de crecimiento de las UCSSC en los tres experimentos, en condiciones control, condrogénicas y osteogénicas, el patrón de cada experimento varía (Figs 2A, 3A y 3B), demostrando las características intrínsecamente diferentes en cada tipo celular. Las células con el núcleo azul (DAPI) se pudieron ver ocupando áreas dispersas en todo el soporte y en todas las condiciones de cultivo, incluso tras 28 días, sugiriendo su estado de quiescencia con viabilidad conservada y, quizás, formando parte esencial de los nichos en el tejido osteocondral.

15

#### *Identificación positiva de marcadores de diferenciación*

20

Se emplearon marcadores osteogénicos y condrogénicos para determinar la eficiencia en la diferenciación osteo y condrogénica de las UCSSC: la osteopontina (OPN) se utilizó para representar los precursores osteogénicos, y el colágeno tipo II (COL2A) para representar la actividad condrogénica funcional.

25

En imágenes de microscopía confocal de las UCSSC comprometidas con la diferenciación hacia osteocitos, los núcleos se tiñeron con DAPI a los días 7, 14 y 21, la señal verde de autofluorescencia se observó tras la excitación con luz blanca y el marcador de osteoblasto osteopontina se marcó en rojo. Para los mismos periodos de tiempo se tomaron imágenes de la diferenciación hacia condrocito; los núcleos teñidos con DAPI, el marcador específico de condroblastos, colágeno tipo II tinción en verde y la superposición de las imágenes. Se debe tener en cuenta que la tinción en verde se concentró alrededor del núcleo indicando así la localización intracelular del colágeno II.

30

35 *Análisis superficial de la ECM a diferentes días en condiciones control y en condiciones específicas de cultivo*

El análisis superficial de la ECM a diferentes días, en condiciones de diferenciación condrocítica, se llevó a cabo por espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS). Los espectros XP representativos de la región de C<sub>1s</sub>, O<sub>1s</sub>, N<sub>1s</sub>, Ca<sub>2p</sub>, y P<sub>2p</sub> fueron obtenidos bajo condiciones experimentales diferentes y pueden observarse en la Figura 5. Se ha obtenido el espectro XP de la ECM producida por las UCSSC tras cultivarlas sobre TCA en condiciones específicas de estimulación de diferenciación a linaje condroblástico (tiempos comprendidos entre 3 y 21 días) y en algunos casos se ha seguido el experimento para obtener datos a 28 y 35 días tras la siembra (Fig. 4). Los espectros XP de N<sub>1s</sub> y O<sub>1s</sub> dieron una huella precisa de la adsorción de proteínas en la superficie de la TCA. Además, su deconvolución nos da la información sobre el estado químico del N y el O y su variación en el tiempo. El grupo amida que forma el enlace peptídico en las proteínas mostró un componente en el espectro del O<sub>1s</sub> a una energía de ligación de  $532,4 \pm 0,3$  eV y otro componente en el espectro a nivel del N<sub>1s</sub> a  $400,6 \pm 0,3$  eV. Además, el componente a la energía de ligación de  $399,2 \pm 0,2$  eV en este espectro, se asignó al grupo amino en la proteína de la ECM (Fig. 5 A y B). Las cantidades relativas del oxígeno y del nitrógeno ligados al enlace peptídico aumentan en función del tiempo de cultivo (Fig. 6 A, B y C). En los experimentos de evolución en el tiempo de los grupos amida (Fig. 6B) se observó una cinética de dos fases, la primera (del día 3 al 7) más rápida, mientras que la segunda se ajusta a una línea recta. La evolución de los grupos amina en las proteínas (Fig. 6C) mostró un valor más alto al principio, probablemente debido a la retención de aminoácidos en la superficie de la TCA, para después decrecer rápidamente, entre los días 3 y 10, y mantenerse finalmente más o menos constante, reflejando la proporción de estos grupos en las cadenas de proteína retenidas en la superficie de las TCA.

Un estudio de las proporciones atómicas de C/N, O/N y Ca/P en función del tiempo (Fig. 6D, E y F) demostró claramente cambios importantes.

#### *Estudios SEM de la matriz extracelular revelan la formación de estructuras suprafibrilares de colágeno*

La morfología de la superficie de las TCA cuando sobre ellas se cultivan UCSSC se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) I (Fig. 7 y 8). Las muestras fueron células UCSSC cultivadas en: 1) medio control durante tres semanas; 2) medio de diferenciación condrogénica y osteogénica durante tres semanas; y 3) muestras de una combinación de los dos tratamientos anteriores que se cultivan durante dos semanas adicionales en medio de diferenciación osteogénica. En este experimento se ha demostrado

que las células UCSSC mantienen su capacidad para crecer y diferenciarse durante al menos 5 semanas de cultivo sobre el mismo soporte, y que la interacción entre los dos tipos celulares promueve niveles superiores en la organización y la estructura final de las fibras del colágeno, incluyendo la presencia de mineral. De hecho se ha observado que las fibrillas de colágeno que se forman gracias a la influencia fisico-química de la matriz de TCA dan origen a estructuras suprafibrilares (Figuras 7 y 8). Estos resultados demuestran que es posible identificar tres tipos diferentes de fibrillas en la ECM: tipo I, que parecen tener un papel importante en la unión de las células en los poros de la TCA, promoviendo el crecimiento de las células e iniciando la ruta de diferenciación; tipo II, que tienen  $140 \pm 7$  nm de diámetro; y tipo III, cuyo diámetro medio mide  $448 \pm 29$  nm de diámetro. Considerando el tamaño de unas y otras, los inventores consideran que las fibrillas de tipo III pueden formar a partir de la unión de tres de las fibrillas de tipo II.

*La diferenciación de las células UCSSC cultivadas sobre TCA hacia linajes osteoblásticos es un proceso espontáneo*

Las células UCSSC cultivadas en medio de cultivo control durante 21 días fueron positivas para osteopontina y en las imágenes se pudo discernir con claridad la presencia de mineralización de la ECM. En efecto, los inventores observaron cristales de carbonato de calcio-magnesio (Fig.10) y de hidroxiapatita así como la presencia de los átomos de P y Ca en cantidades apreciables (Fig. 4); además, la relación Ca/P encontrada en los ensayos de XPS (Fig. 6) sugiere la presencia predominante de mineral tipo hidroxiapatita amorfo. Las imágenes de colágeno, la presencia de osteopontina y de los componentes minerales en la MEC prueban de manera concluyente la actividad funcional de las UCSSC diferenciadas a osteoblastos a causa de su cultivo sobre TCA. Estas células son parte imprescindible de la producción del osteoide, compuesto básicamente de dichas células, colágeno tipo I y de sustancia mineral y responsables del crecimiento *ex vivo* del tejido óseo formado.

**REIVINDICACIONES**

- 5
1. Método de obtención de un biomaterial que comprende un soporte de fibras de carbón activado, células de linaje osteocondral y matriz extracelular, en donde dicho método comprende
- (i) poner en contacto el soporte de fibras de carbón activado con células madre en condiciones estándar de adhesión celular de las células madre sobre el soporte de fibras de carbón activado, y
- 10 (ii) mantener el cultivo celular obtenido en la etapa (i) en presencia de un medio de cultivo para el cultivo celular de células madre y durante el tiempo suficiente para la diferenciación de las células madre en células de linaje osteocondral y la formación de una matriz extracelular, en donde dicho medio de cultivo comprende suero para el cultivo celular y en donde dicho medio de cultivo no ha sido suplementado con ningún factor para la diferenciación de células madre a
- 15 células de linaje osteocondral adicional o diferente a los presentes en el suero en donde las células madre no son células madre obtenidas por métodos que destruyan o utilicen embriones humanos como materia prima.
- 20
2. Método según la reivindicación 1 en donde los poros del soporte de fibras de carbón activado son perpendiculares al eje de la fibra y están abiertos hacia la superficie de dicho soporte.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el soporte de
- 25 fibras de carbón activado tiene un área superficial de al menos  $1500 \text{ m}^2/\text{g}$ .
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el soporte de fibras de carbón activado tiene un volumen de microporos de entre el 70 y el 90% respecto al volumen total de los poros existentes.
- 30
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde los microporos del soporte de fibras de carbón activado tienen una anchura media menor de 2 nm.
- 35
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el pH del punto cero de carga de la superficie del soporte de fibras de carbón activado tiene un valor comprendido entre 6 y 9.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el soporte de fibras de carbón activado se selecciona del grupo que comprende telas de carbón activado, fieltros de carbón activado y cuerdas de carbón activado.
- 5
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el factor para la diferenciación de células madre en células de linaje osteocondral se selecciona del grupo que comprende dexametasona, beta-glicerofosfato, ácido ascórbico, insulina-transferrina-selenito sódico (ITS), TGF-beta1, TGF-beta2, BMP, IGF-I, prolina, piruvato sódico, osteogenina y vitamina D.
- 10
9. Método según la reivindicación 8 en donde el medio de cultivo no ha sido suplementado con dexametasona, beta-glicerofosfato, ácido ascórbico e insulina-transferrina-selenito sódico (ITS).
- 15
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el medio de cultivo es suplementado con aminoácidos no esenciales y/o bFGF.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde las células de linaje osteocondral se seleccionan del grupo que comprende osteoblastos, osteocitos, condroblastos y condrocitos.
- 20
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la matriz extracelular comprende colágeno.
- 25
13. Método según la reivindicación 12 en donde la matriz extracelular comprende, adicionalmente, osteopontina, hidroxiapatita, carbonato cálcico y/o carbonato magnésico.
- 30
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde las células madre se cultivan en condiciones estándar de expansión celular previamente a su puesta en contacto con el soporte de fibras de carbón activado.
- 35
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde las células madre son seleccionadas del grupo que comprende células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre adultas o combinaciones de las mismas, en

donde las células madre no son células madre obtenidas por métodos que destruyan o utilicen embriones humanos como materia prima.

5 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde las células madre son células madre mesenquimales.

10 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde las células madre mesenquimales son obtenidas a partir de médula ósea, tejido adiposo, hígado, bazo, testículos, sangre menstrual, fluido amniótico, páncreas, periostio, membrana sinovial, músculo esquelético, dermis, pericitos, hueso trabecular, cordón umbilical, pulmón, pulpa dental y sangre periférica.

15 18. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde las células madre mesenquimales son humanas.

19. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde las células madre son células madre mesenquimales procedentes de cordón umbilical humano.

20 20. Biomaterial obtenible mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

21. Uso de un biomaterial según la reivindicación 20 para preparar un medicamento.

25 22. Uso de un biomaterial según la reivindicación 20 para preparar un medicamento para el tratamiento de una patología ósea, de una patología condrogénica, de una patología que cursa con una lesión condral, de una patología que cursa con una lesión ósea o de una patología que cursa con una lesión osteocondral.

30

35

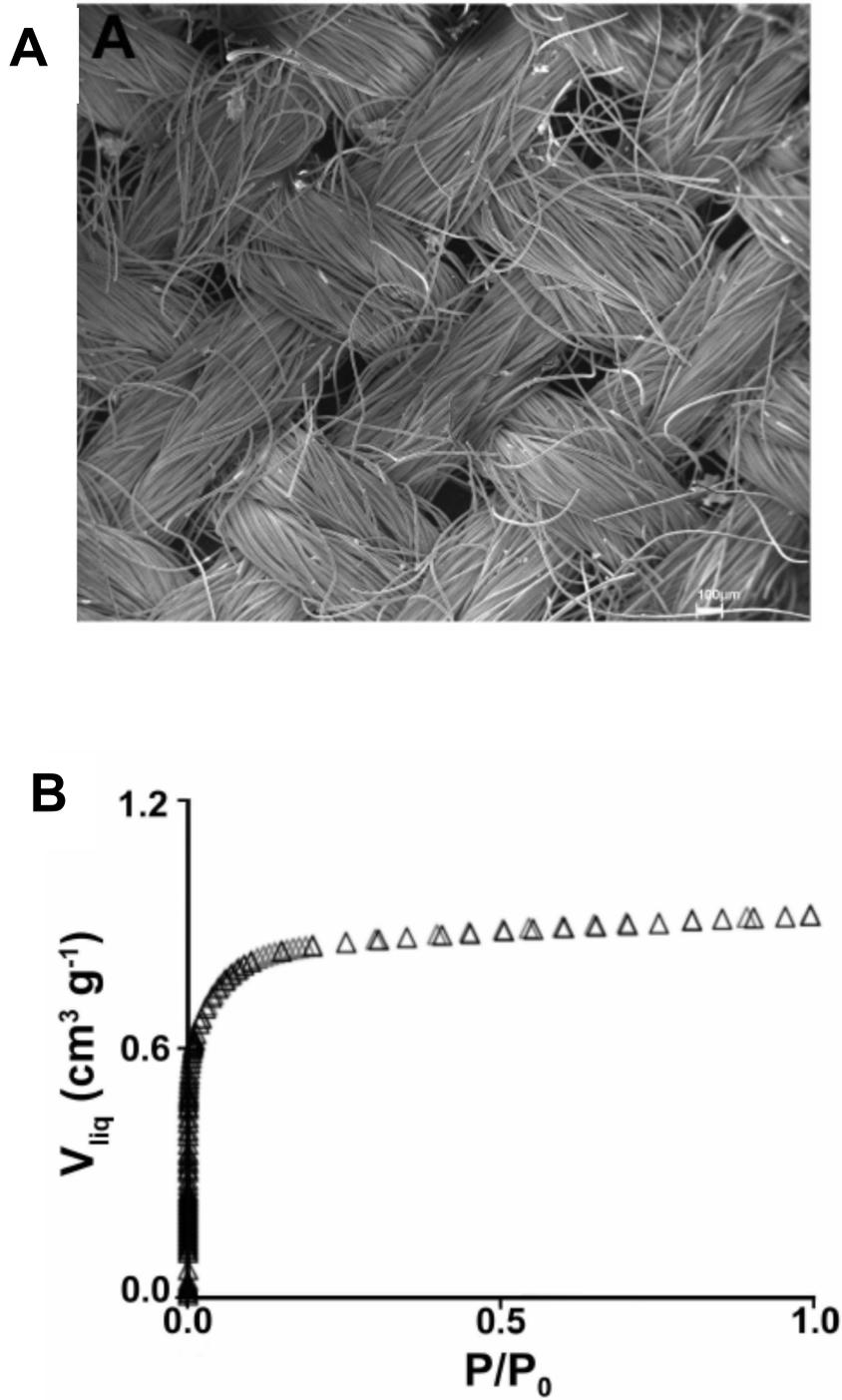


Fig. 1

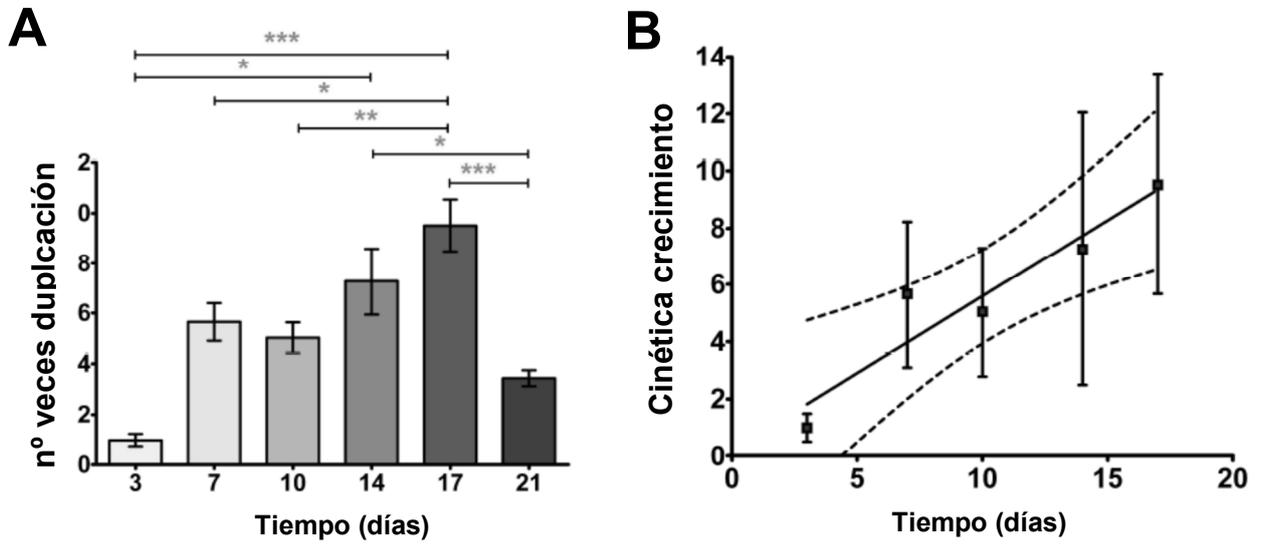


Fig. 2

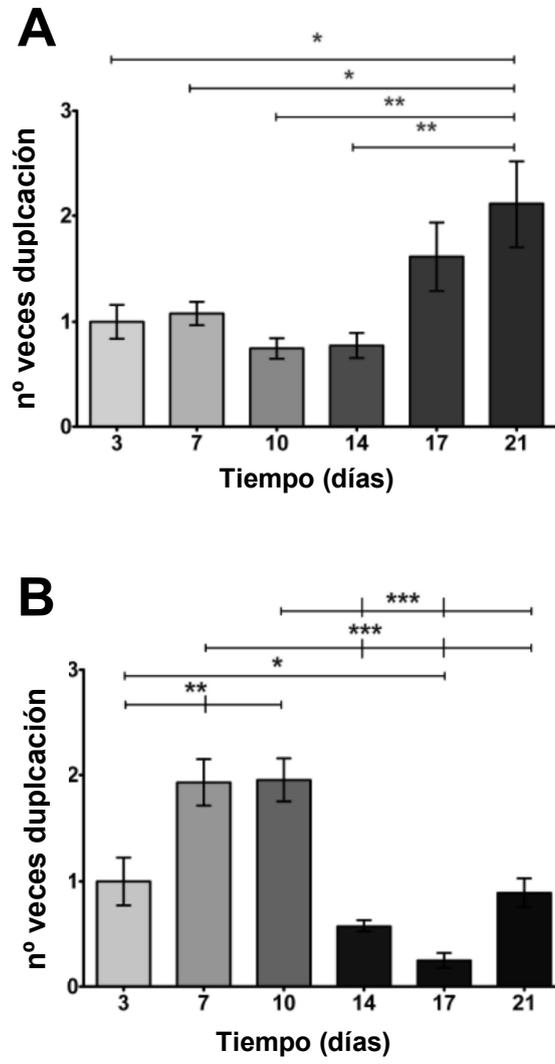


Fig.3

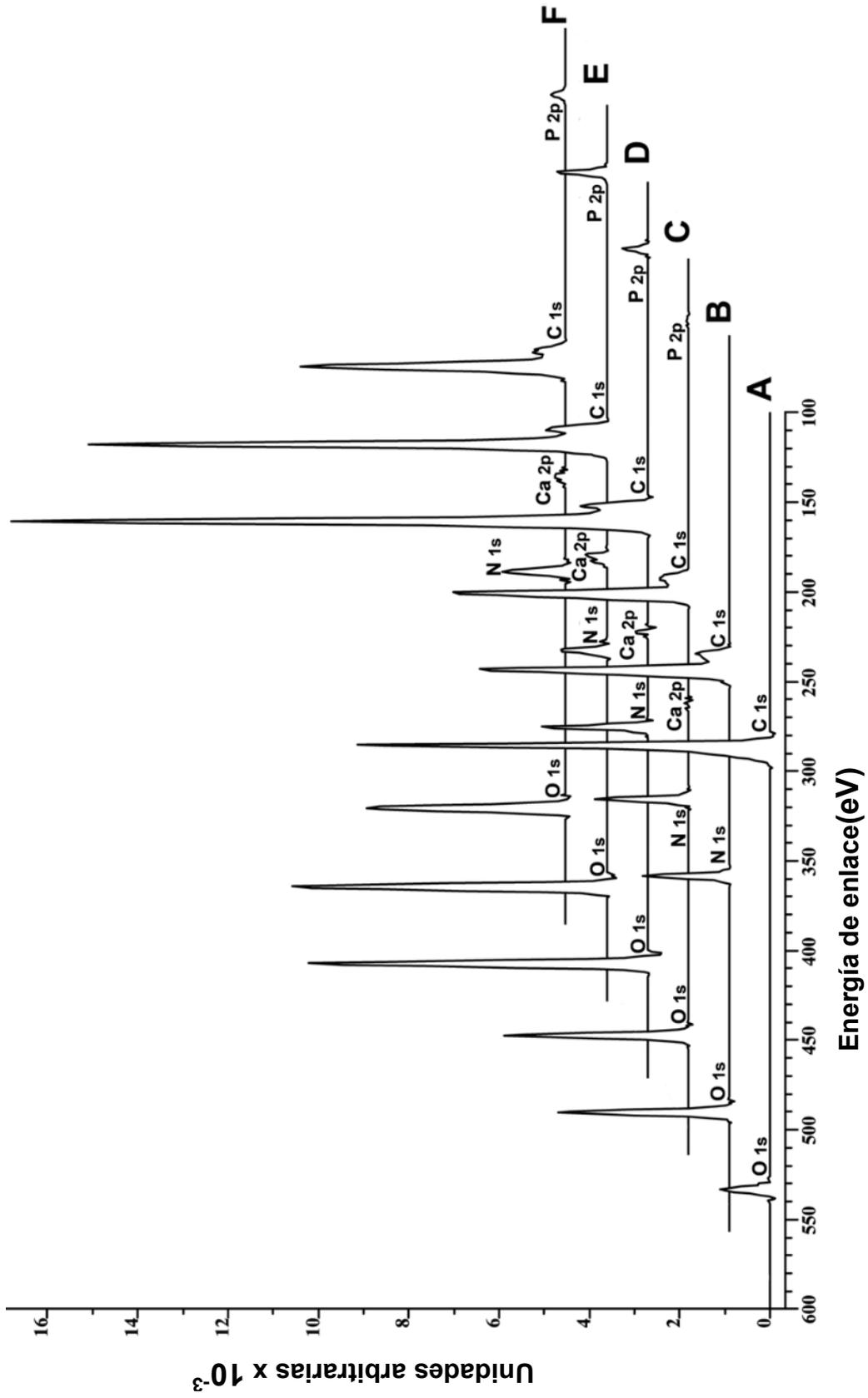


Fig. 4

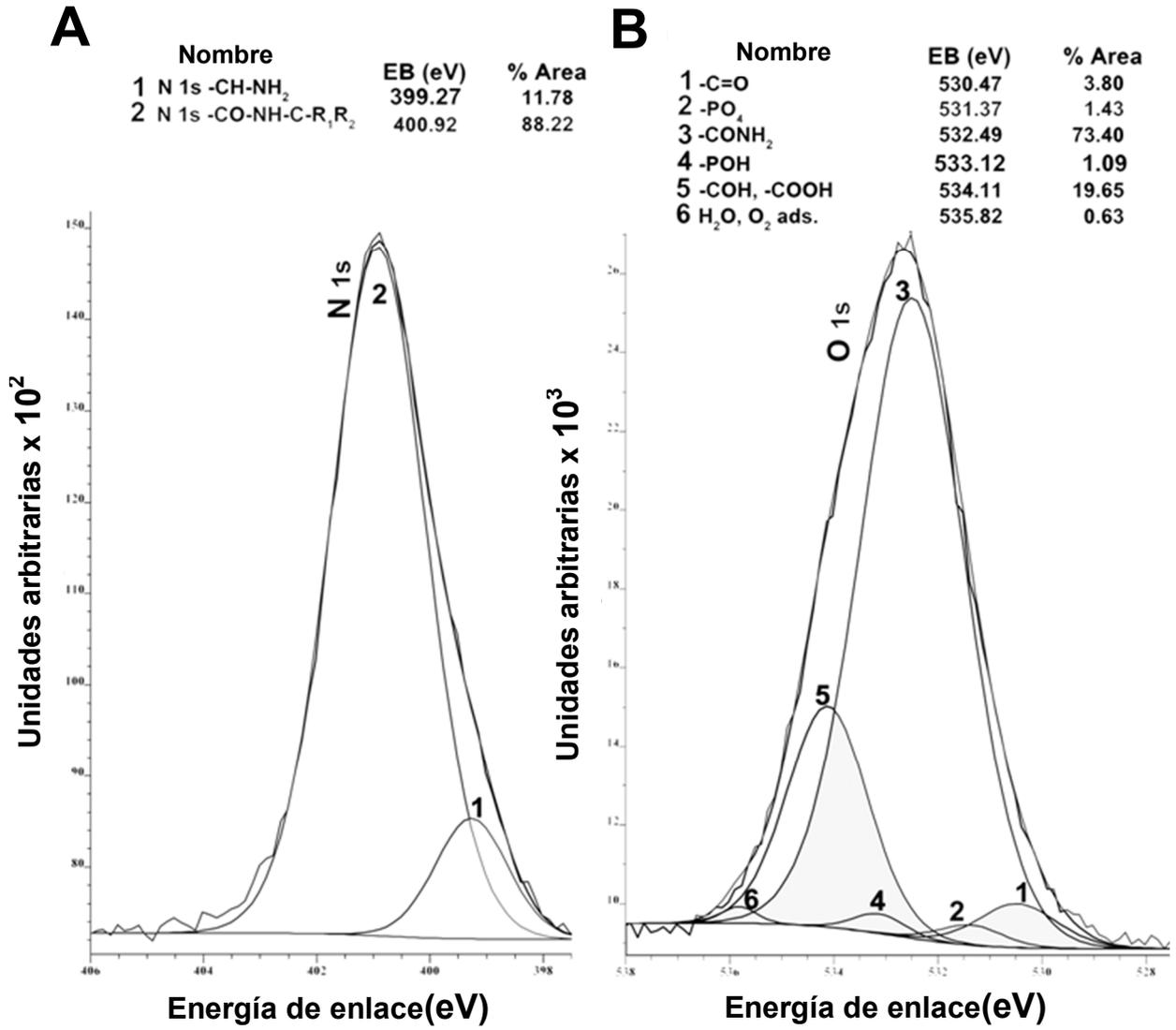


Fig. 5

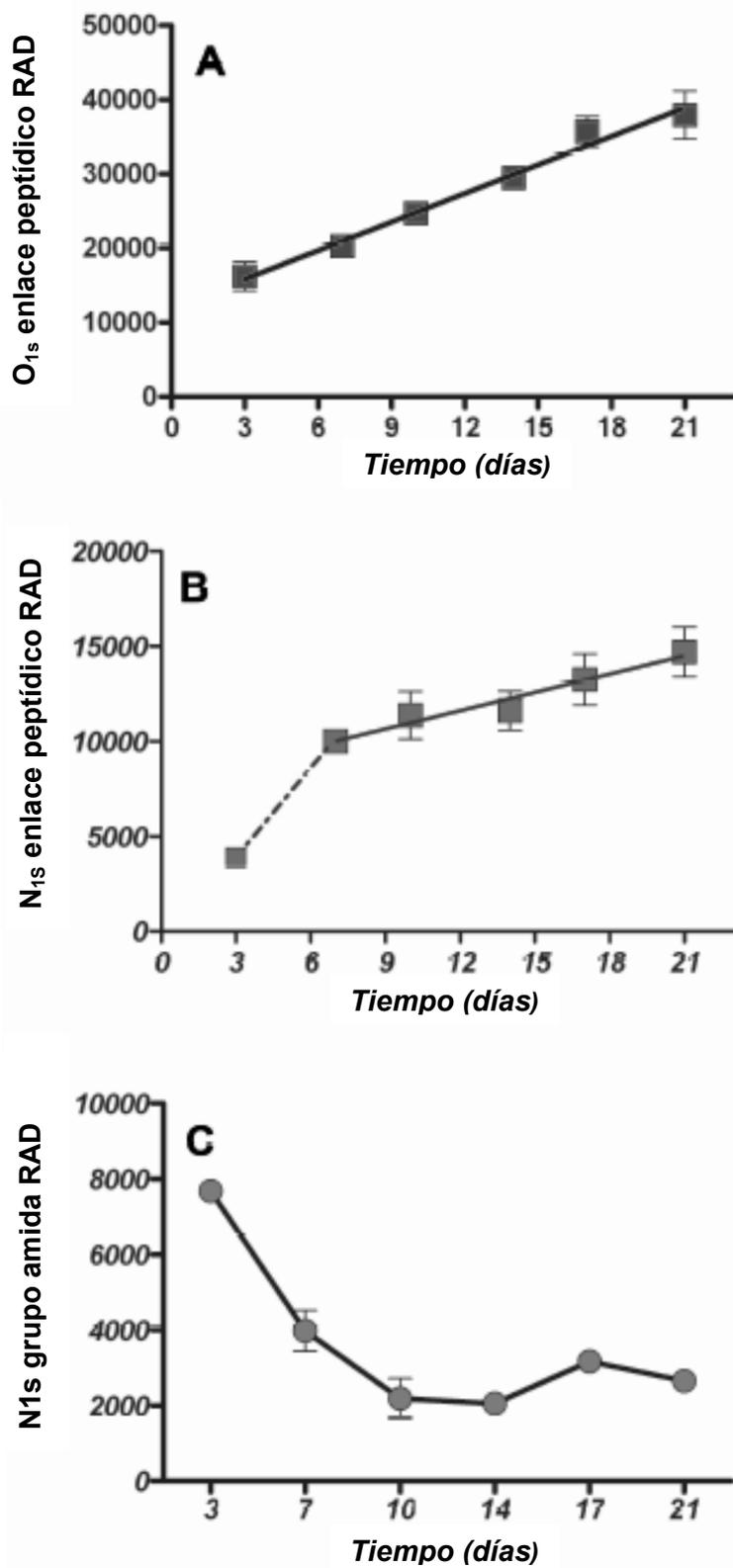


Fig. 6

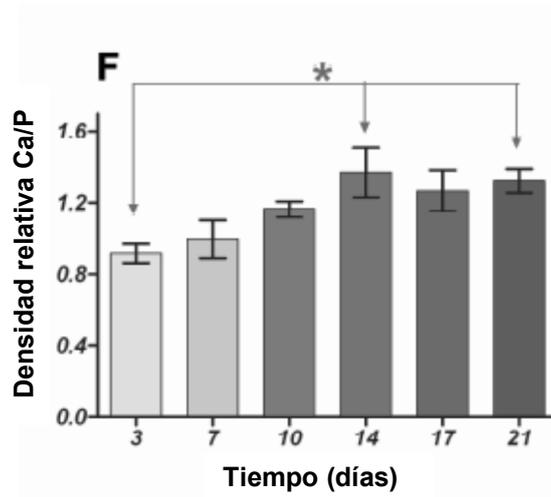
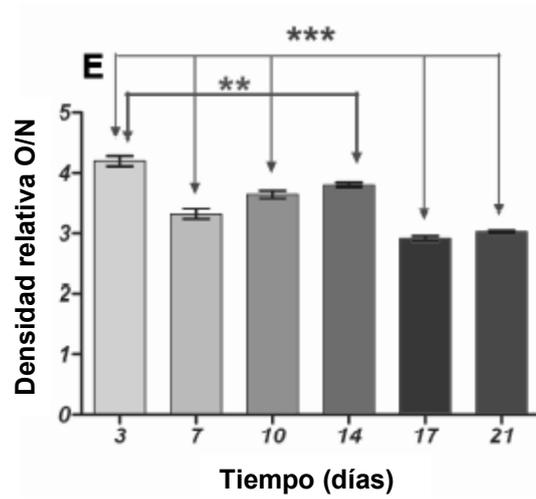
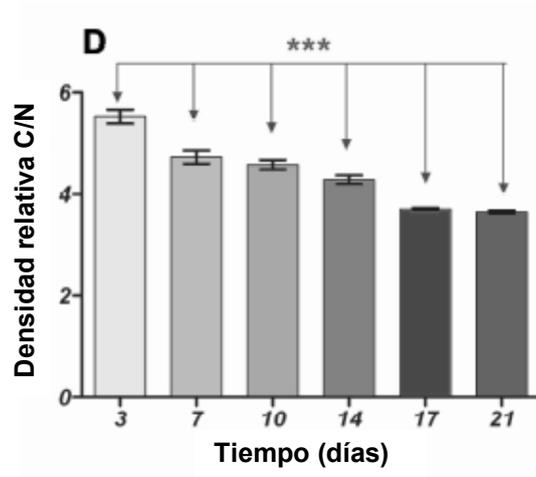


Fig. 6 (cont.)

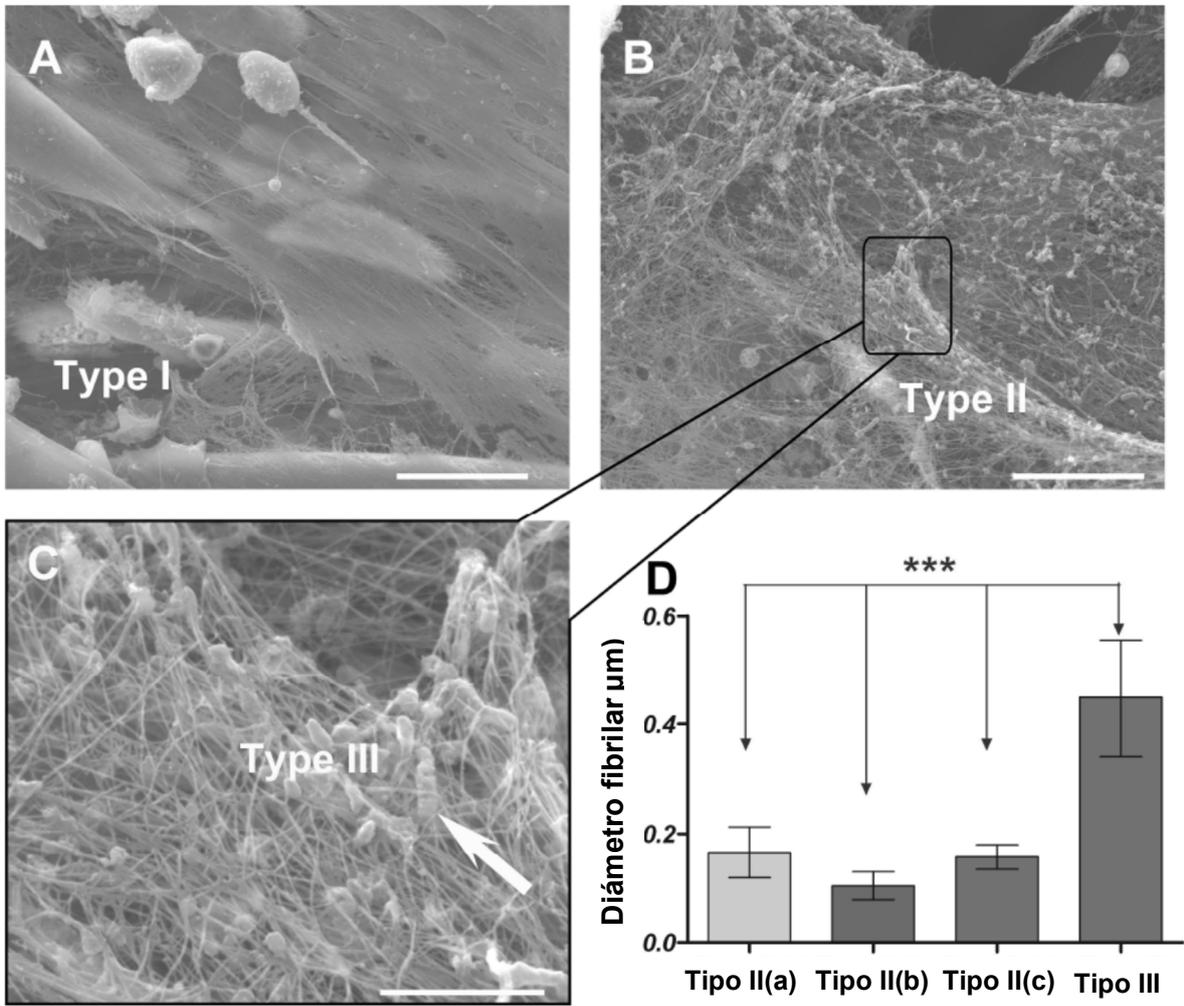


Fig. 7

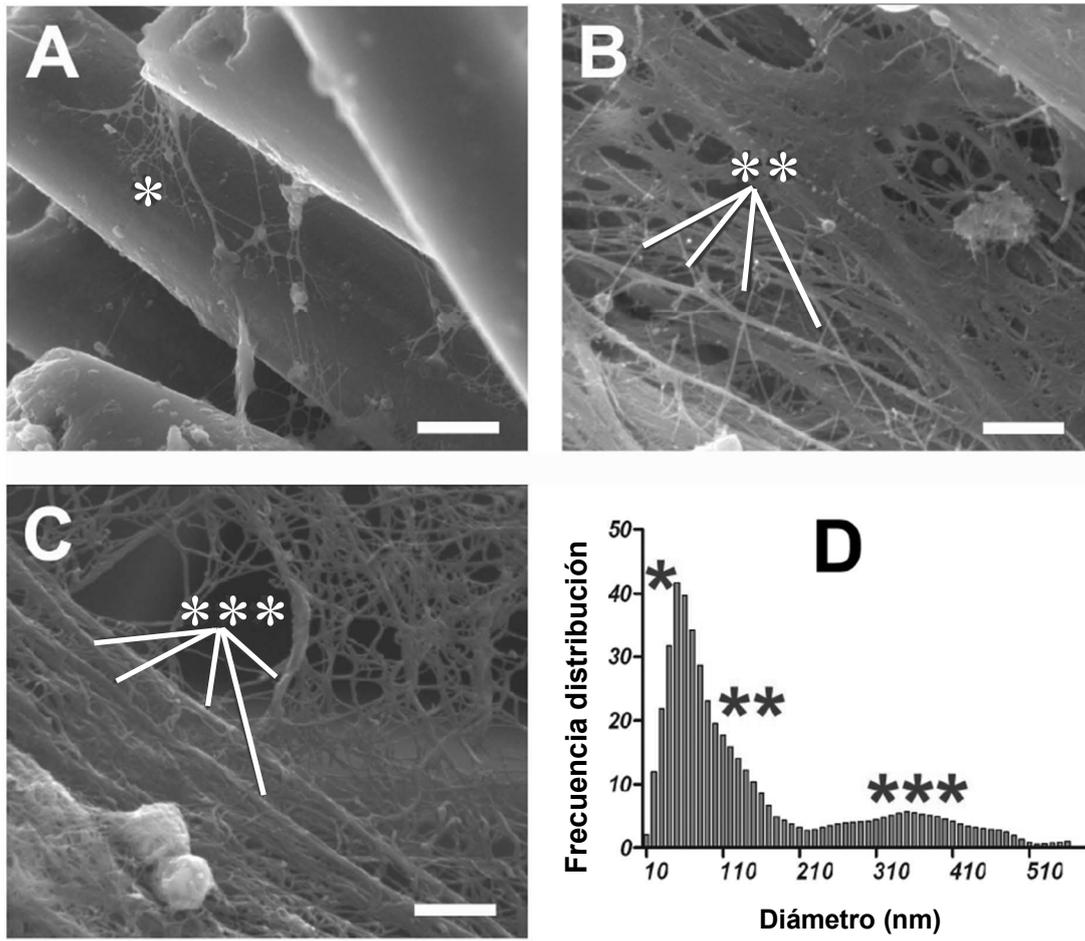


Fig. 8

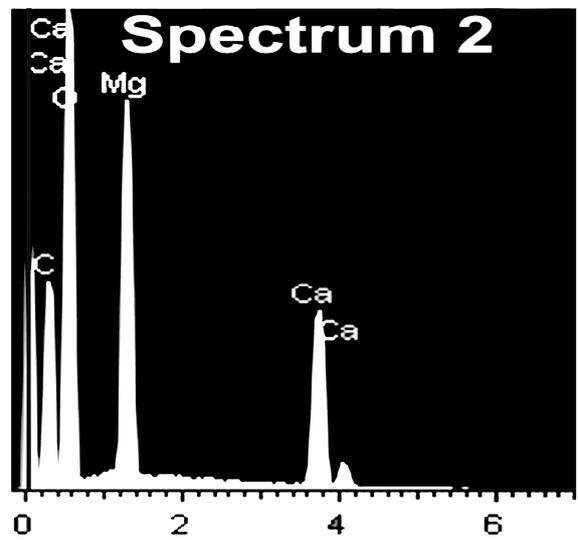
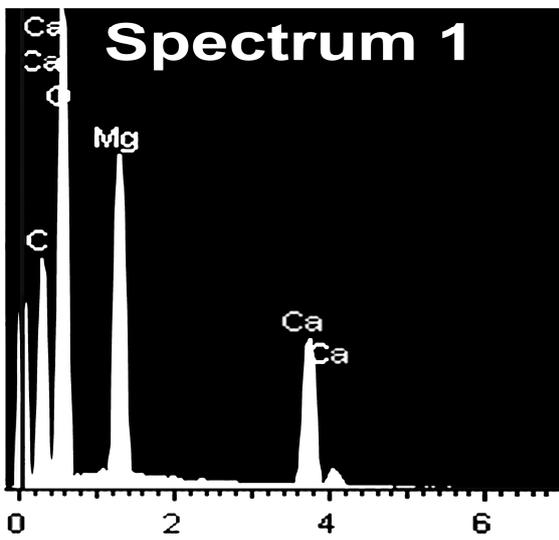
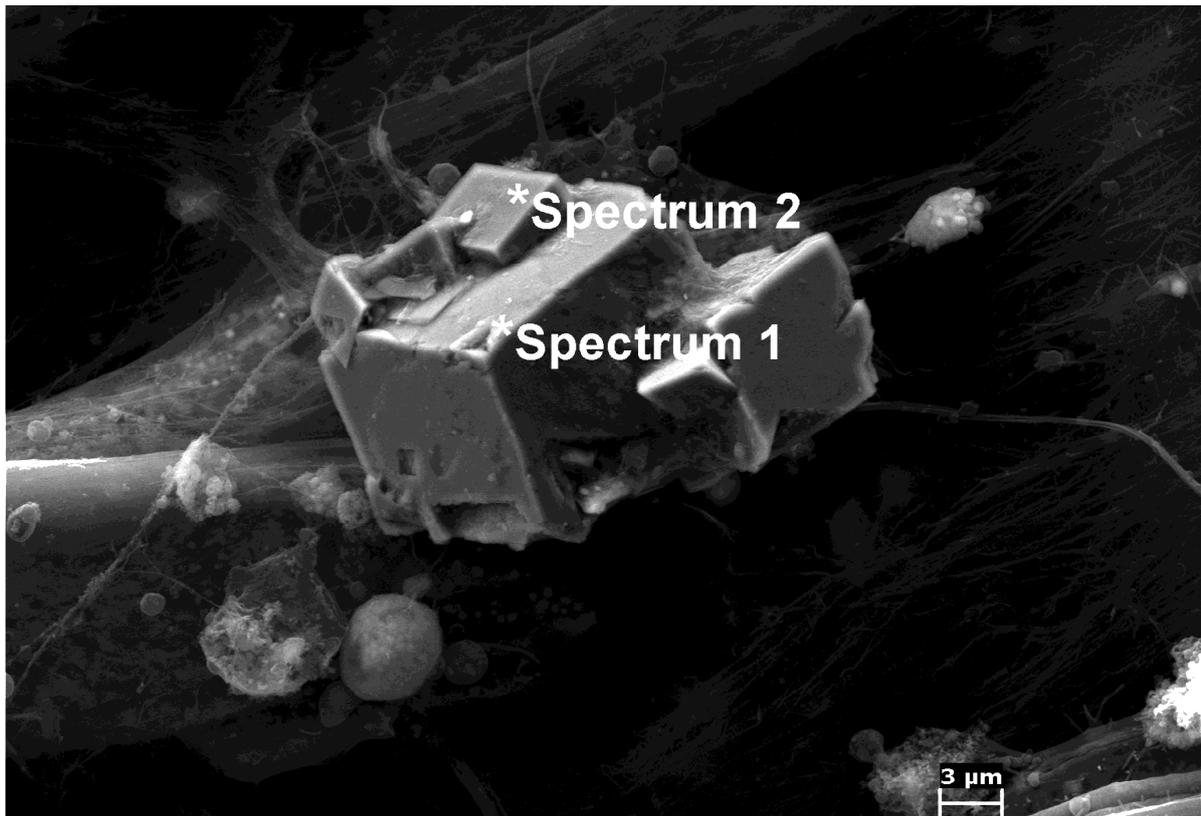


Fig. 9