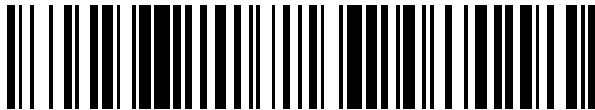


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 905 713**

(21) Número de solicitud: 202031030

(51) Int. Cl.:

A61L 27/14 (2006.01)
A61K 35/60 (2006.01)
A61K 38/39 (2006.01)
A61P 19/04 (2006.01)

(12)

SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación:

09.10.2020

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

11.04.2022

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE GRANADA (65.0%)
Hospital Real. Avda. del Hospicio s/n
18071 Granada (Granada) ES y
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (35.0%)

(72) Inventor/es:

ALAMINOS MINGORANCE, Miguel;
CARMONA MARTOS, Ramón;
CARRIEL ARAYA, Víctor Sebastián;
MARTÍN PIEDRA, Miguel Ángel;
ORTIZ ARRABAL, Olimpia;
GARCÍA GARCÍA, Óscar Darío y
FERNÁNDEZ VALADÉS, Ricardo

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

(54) Título: **NUEVO BIOMATERIAL PARA INGENIERÍA TISULAR**

(57) Resumen:

Nuevo biomaterial para ingeniería tisular.

La presente invención se refiere a un nuevo biomaterial para su uso como andamio (matriz, armazón o scaffold) en medicina regenerativa, al método de obtención, y a sus usos terapéuticos, principalmente en ingeniería tisular.

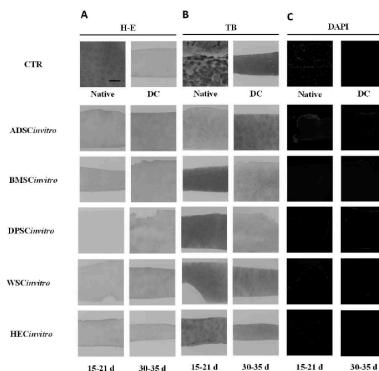


Figura 1

DESCRIPCIÓN

NUEVO BIOMATERIAL PARA INGENIERÍA TISULAR

CAMPO DE LA TÉCNICA

- 5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biomedicina e ingeniería tisular. Específicamente, se refiere a un nuevo biomaterial y un método *in vitro* de preparación del mismo. También se refiere a sus usos en medicina regenerativa.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

- 10 El cartílago es un tejido conectivo especializado que tiene un tipo de célula especial, llamado condrocito, responsable de sintetizar una matriz extracelular densa (MEC) compuesta principalmente de fibras de colágeno, o colágeno y elastina, y proteoglicanos. Hay tres tipos de cartílago en el cuerpo humano (hialino, elástico y fibroso) que se diferencian principalmente en la composición y estructura de la MEC, lo que resulta en diferentes propiedades y funciones. Los problemas comunes asociados con el cartílago son la degeneración de este tejido relacionada con la edad, las lesiones traumáticas o la formación de tumores. El cartílago tiene una capacidad de autorregeneración limitada debido a la falta de vasos sanguíneos y nervios y, en la mayoría de los casos, se genera fibrocartílago en lugar del tejido funcional nativo. Por esta razón, podría ser necesaria una corrección quirúrgica del defecto o daño,
- 15 20 aunque el resultado suele ser subóptimo.

La ingeniería de tejidos se ha convertido en una herramienta potencial para la reparación de tejidos y órganos mediante el uso de células, biomateriales y factores de crecimiento. En la reparación del cartílago, se han estudiado varios armazones, matrices o andamios (*scaffolds*) naturales y sintéticos como el ácido poliglicólico, ácido poliláctico, PEGDA, colágeno, quitosano, hialuronano, alginato, fibrina-agarosa, etc. Estos andamios deben ser capaces de promover la diferenciación celular, la migración y la proliferación y también deben ser degradables, biocompatibles y no tóxicos. Sin embargo, la mayoría de los biomateriales no son capaces de reproducir totalmente el microambiente de la MEC del cartílago nativo. Debido a estas limitaciones, actualmente se están estudiando y utilizando biomateriales naturales obtenidos de tejidos descelularizados. La descelularización es un proceso que permite obtener un producto compuesto por MEC que mantiene la estructura, composición y

propiedades mecánicas originales, proporcionando todos los estímulos necesarios para la proliferación y diferenciación celular, haciendo que este material sea apto para la ingeniería de tejidos. Además, las proteínas estructurales y funcionales de la MEC están altamente conservadas entre las especies, lo que permite su implantación con muy poca probabilidad 5 de rechazo inmunológico. Ya se han estudiado varios tejidos descelularizados para la generación de cartílago, incluido el tejido adiposo, el cordón umbilical, el propio cartílago y otros.

El tejido del cartílago muestra característicamente un bajo potencial de regeneración *in vivo*, y se necesitan nuevas tecnologías de reemplazo capaces de reparar las lesiones del cartílago. 10 Aunque se han propuesto numerosas terapias celulares y estrategias de ingeniería de tejidos, los resultados a largo plazo siguen siendo deficientes. Ninguno de estos biomateriales pudo imitar completamente el microambiente de este tejido, por lo que es necesario desarrollar nuevos biomateriales.

El esturión es un pez ancestral perteneciente al orden *Acipenseriformes*. El esqueleto del 15 esturión está compuesto principalmente de cartílago, siendo una buena fuente de este tejido para uso en investigación. Algunos trabajos previos han estudiado el colágeno y las moléculas de sulfato de condroitina de este animal, aunque la estructura y composición general de este cartílago es poco conocida. No se ha informado previamente de estudios que utilicen cartílago de esturión en la ingeniería de tejidos.

20

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Análisis histológico del cartílago de esturión nativo y descelularizado. A: Tinción con hematoxilina-eosina (H-E); B: tinción con azul de toluidina para la detección de proteoglicanos sulfatados (TB); C: marcaje de fluorescencia DAPI para detectar núcleos celulares (DAPI). Se muestran los resultados obtenidos en el cartílago control (CTR) tanto nativo (Native) como descelularizado (DC), así como en el cartílago recelularizado con células mesenquimales de distinto origen (ADSCinvitro, BMSCinvitro, DPSCinvitro, WSCinvitro) y con células de cartílago elástico humano (HECinvitro) entre 15 y 21 días y entre 30 y 35 días. Todas las imágenes tienen la misma escala. La barra de escala que muestra la imagen superior izquierda 25 representa 300 µm.

Fig. 2. Análisis histológico del cartílago de esturión nativo y descelularizado. A: Tinción con azul alcián para detectar proteoglicanos ácidos y polisacáridos (AB); B: tinción con rojo

picrosirius para detección de fibras de colágeno (P). Se muestran los resultados obtenidos en el cartílago control (CTR) tanto nativo (Native) como descelularizado (DC), así como en el cartílago recelularizado con células mesenquimales de distinto origen (ADSCinvitro, BMSCinvitro, DPSCinvitro, WSCinvitro) y con células de cartílago elástico humano (HECinvitro) entre 15 y 21 días y entre 30 y 35 días. Todas las imágenes tienen la misma escala. La barra de escala que muestra la imagen superior izquierda representa 300 µm.

Fig. 3. Histogramas que representan la preservación de la estructura del tejido para RCDinvitro determinado por azul de toluidina (A), azul alcián (B) y tinción de rojo Picrosirius (C). La conservación de la estructura también se determinó para RCDinvivo mediante tinción con azul de toluidina (D), azul alcián (E) y rojo Picrosirius (F). Las barras corresponden a la media ± desviación estándar. (a) representa diferencias significativas con NCTR. (b) representa diferencias significativas con DCD.

Fig. 4. Tinción con hematoxilina-eosina (H-E), azul de toluidina (TB), azul alcián (AB) y rojo picrosirius (P) de DCDinvivo (A) y ADSCinvivo (B) a los 12, 30 y 60 días. Todas las imágenes tienen la misma escala. La barra de escala que muestra la imagen superior izquierda representa 300 µm.

Fig 5. Tinción con hematoxilina-eosina (H-E), azul de toluidina (TB), azul alcián (AB) y rojo picrosirius (P) de BMSCinvivo (A) y DPSCinvivo (B) a los 12, 30 y 60 días. Todas las imágenes tienen la misma escala. La barra de escala que muestra la imagen superior izquierda representa 300 µm.

Fig. 6. Tinción con hematoxilina-eosina (H-E), azul de toluidina (TB), azul alcián (AB) y rojo picrosirius (P) de WSCinvivo (A) y HECinvivo (B) a los 12, 30 y 60 días. Todas las imágenes tienen la misma escala. La barra de escala que muestra la imagen superior izquierda representa 300 µm.

25

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención han demostrado el uso del cartílago de esturión como un nuevo andamio (*scaffold*) para la ingeniería de tejidos del cartílago. Primero, se generó un andamio derivado de cartílago descelularizado (DCD). Luego, el andamio se recelularizó con cuatro tipos diferentes de células madre mesenquimales humanas (MSC) derivadas de tejido adiposo (ADSC), médula ósea (BMSC), pulpa dental (DPSC) y gelatina de Wharton del cordón

umbilical (WSC) y con condrocitos elásticos humanos (HEC). Se realizaron estudios *in vitro* e *in vivo* para analizar histológicamente la estructura e integración de los diferentes sustitutos del cartílago. El DCD preservó las propiedades fundamentales del cartílago nativo después de haber sido sometido al método de descelularización, y los estudios de bioseguridad 5 demostraron que los cartílagos descelularizados y recelularizados eran muy biocompatibles *in vivo*, y los injertos fueron aceptados por todos los animales con total ausencia de alteraciones histológicas.

BIOMATERIAL DE LA INVENCIÓN

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere a cartílago de organismos de la 10 subclase *Chondrostei*, de ahora en adelante “cartílago de la invención”, para su uso como medicamento o, alternativamente, para su uso en medicina.

Preferiblemente, este aspecto de la invención se refiere a cartílago de organismos del orden *Acipenseriformes*, de ahora en adelante cartílago de la invención, para su uso como medicamento o, alternativamente, para su uso en medicina.

15 Preferiblemente, el cartílago de la invención es de un organismo de la familia *Acipenseridae*, aún más preferiblemente, del género *Acipenser* y aún más preferiblemente, de la especie *Acipenser naccarii*.

En esta memoria, se entiende por “organismos del género *Acipenser*” a organismos celulares del superreino *Eukariota*, clado *Opisthokonta*, Reino *Metazoa*, Phylum *Chordata*, subphylum 20 *Craniata*, superclase *Actinopteri*, subclase *Chondrostei*, Orden *Acipenseriformes*, suborden *Acipenseroidei*, familia *Acipenseridae*, subfamilia *Acipenserinae*, tribu *Acipenserini*; género *Acipenser*.

Se han descrito numerosas especies dentro de este género. A modo de ejemplo no limitativo: 25 *A. baerii* (esturión siberiano), *A. brevirostrum* (esturión de nariz corta), *A. dabryanus* (esturión del Yangtze), *A. fulvescens* (esturión de lago), *A. gueldenstaedtii* (esturión de Rusia), *A. medirostris* (esturión verde), *A. mikadoi* (esturión de Sakhali), *A. naccarii* (esturión del Adriático), *A. nudiventris* (esturión barba de flecos), *A. oxyrinchus* (esturión del Atlántico), *A. oxyrinchus desotoi* (esturión del Golfo), *A. oxyrinchus oxyrinchus*, *A. persicus* (esturión de Persia), *A. ruthenus* (esterlete), *A. schrenckii* (esturión Amur), *A. sinensis* (esturión de China), 30 *A. stellatus* (esturión estrellado), *A. sturio* (esturión común), *A. transmontanus* (esturión blanco).

Alternativamente, "Acipenser" también se refiere al género de un organismo que tiene una secuencia nucleotídica homóloga de la región citocromo b del ADN mitocondrial con una identidad de al menos un 70% con la SEQ ID NO. 1, y más preferiblemente una identidad de al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con la SEQ ID NO: 1. Más 5 preferiblemente, la secuencia homóloga del citocromo b del ADN mitocondrial tiene una identidad del 100% con la SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1

Acipenser naccarii cytochrome c oxidase subunit II gene, partial cds (GenBank: AY547412.1)

```
tggcacatccatcacaattaggattccaagacgcggcctcacgtaatagaagaacttctccacttccatgaccacacactaatg  
10 attgtttccataatcagcactctagtactttacattattgtggccatgggtcaactaaactaacaacaaataatgtactggattccaa  
gaaattgaaattgtatgaacagtactcccagcagtaatttaatcttaattgccctaccccttcgaattttacctaatacgaga  
ttaatgaccccccacctgacaattaaagctataggacaccaatgatactgaagttatgaatatacgactatgaagacacctgggctc  
gactcctacataatccctacacaagacctcgccccaggcaattccgactcctgagaagcagaccatcgaaatggtagtgc  
15 gatatcccaattcgagttctagttccgcagaagacgtactccactcctgagcggtgccagccctggcataaaatagacgcag  
tgcccgacgcctaaatcaaacagccttattacctcacgaccggagtctattatggccatgttctgaaatctgcggagctaacc  
acagcttcatgccaattgttagtgtgaagcagtccctagaacacttggaaaactgat
```

El término "identidad", como se usa aquí, se refiere a la proporción de nucleótidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas cuando se comparan. Los métodos de comparación de las secuencias son conocidos en el estado del arte, e incluye, pero no se limita a, BLASTP, 20 BLASTN, y FASTA (S.F. Altschul *et al.*, "Basic Local Alignment Search Tool", *J. Mol Biol.* 1990, 215, 403-410).

El término "secuencia de nucleótidos homóloga", como se usa en este documento, se refiere a una secuencia que es equivalente al fragmento del citocromo b mitocondrial de secuencia SEQ ID NO: 1 de *Acipenser*, preferiblemente *Acipenser naccarii*. La expresión "una secuencia 25 que es equivalente" significa una secuencia de nucleótidos que está dentro del citocromo b o región equivalente en esa especie de *Acipenser* en particular, y realiza la misma función. La persona experta es capaz de identificar estas regiones equivalentes con protocolos de rutina.

El término "% de identidad", como se entiende en esta invención, se refiere al porcentaje (%) de identidad entre dos o más secuencias de nucleótidos o aminoácidos. El % de identidad es 30 un recuento del número de posiciones sobre la longitud de la alineación de dos secuencias donde todos los nucleótidos o aminoácidos en esa posición son idénticos. El % de identidad se calcula en base a secuencias homólogas de la misma longitud.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a cartílago de organismos del orden *Acipenseriformes* para aumentar, restaurar o reemplazar, parcial o completamente, la actividad funcional de un tejido u órgano enfermo o dañado. En una realización preferida, el tejido enfermo o dañado se selecciona de la lista que consiste en: cartílago que se encuentra 5 en las superficies articulares (cartílago articular), la oreja, la nariz y/o la tráquea, bronquios, epiglotis, costillas, síntesis del pubis, disco intervertebral, meniscos, o cualquiera de sus combinaciones.-.

El cartílago de la invención puede ser diluido, por ejemplo en ácido acético, y se puede volver 10 a solidificar, dándole la forma que se deseé. También puede encontrarse como polvo liofilizado que podría reconstituirse con la forma deseada. Dicho cartílago no solo poseerá colágeno, sino todos los componentes adicionales del cartílago.

Por tanto, en otra realización preferida, el cartílago de la invención se encuentra diluido o liofilizado.

Los procesos de obtención de cartílago líquido o liofilizado son conocidos en el estado del 15 arte. Por ejemplo, pero sin limitarnos, el cartílago se puede someter a hidrólisis ácida utilizando una solución al 0,7M de ácido acético ($\text{CH}_3\text{-COOH}$) a una temperatura cercana a los 15°C y con agitación constante, utilizando una proporción cartílago/solución de 1:10 (peso/volumen) durante 6-12 horas. Si se desea, se puede precipitar posteriormente el colágeno diluido mediante adición de una solución de cloruro sódico (NaCl) al 12% y filtrado posterior. En el 20 caso del cartílago liofilizado, el procedimiento consistiría, por ejemplo, pero sin limitarnos, a congelar el material a -20°C o, preferentemente, mediante inmersión en nitrógeno líquido, sometiendo posteriormente el producto congelado a una cámara de vacío capaz de extraer toda el agua del cartílago a temperaturas de congelación.

El cartílago que ha sido previamente diluido o liofilizado puede comprender otros 25 componentes de la MEC, principios activos y/o agentes terapéuticos.

Pueden incorporarse cápsulas, depósitos, liposomas, vesículas o implantes que liberan el agente terapéutico o principio activo *in situ* en un paciente.

Los agentes terapéuticos pueden incluir pequeñas moléculas orgánicas, proteínas, tales como anticuerpos, hormonas, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, virus, moléculas de 30 ácido nucleico, tales como aptámeros o moléculas supresoras antisentido o sentido, vectores, antibióticos o microorganismos.

En el cartílago de la invención diluido también puede incluir otros elementos, como nanotubos de carbono; partículas tales como partículas metálicas o nanopartículas de tejido duro, partículas magnéticas y partículas de formación de imágenes, tales como partículas radioopacas, reflectantes de ultrasonido o fluorescentes; fibras, como filamentos capilares; y vesículas tales como vesículas de lípidos/lípidos de fósforo, liposomas y vesículas de fármacos de liberación lenta. También puede comprender componentes de la MEC como ácido hialurónico, elastina, oxitalán, elaunina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, fibrina, fibronectina, seda u otros materiales nano-micro fibrosos y colágeno. También puede incluir partículas de tejido duro como cerámica porosa, fosfato tricálcico, silicona, vidrio, biovidrio, vidrio de fosfato, hidroxiapatita o preparaciones minerales óseas.

MÉTODO DE OBTENCIÓN DEL BIOMATERIAL DE LA INVENCIÓN

En otra realización preferida, el cartílago de la invención se ha obtenido por un método que comprende:

- a) inducir la lisis celular de las células del cartílago mediante choque osmótico,
- 15 b) eliminar el material citoplasmático y nuclear,
- c) promover la disociación de lípidos, y
- d) disociar las proteínas intracelulares.

Más preferiblemente, la lisis celular del paso a) se induce incubando el cartílago en agua bidestilada (bH_2O) a temperatura ambiente con agitación. En otra realización preferida la eliminación del material citoplasmático y nuclear del paso b) se realiza incubando el cartílago en una solución al 1% de sodio-dodecil-sulfato (SDS). En otra realización preferida, la disociación de lípidos del paso c) se realiza con una solución de Triton X-100 al 3%. En otra realización preferida, la disociación de las proteínas intracelulares del paso d) se realiza mediante la incubación del cartílago en una solución de desoxicolato de sodio (SDC) al 4%.

TEJIDO ARTIFICIAL DE LA INVENCIÓN

El cartílago de la invención puede albergar células. Las células son preferiblemente humanas, aunque pueden ser de cualquier otro organismo, preferiblemente de cualquier otro animal (por ejemplo, pero sin limitarnos, perros o caballos). Además, las células pueden ser células madre o células diferenciadas. Entre las células que no son células madre, por ejemplo, se pueden emplear condrocitos de cartílago hialino, elástico o fibroso humano, células hepáticas, células epiteliales (por ejemplo, queratinocitos), fibroblastos, o células vasculares, entre otras. Entre

las células madre, se pueden emplear células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre adultas o combinaciones de las mismas.

- Cuando el cartílago de la invención se encuentra diluido, las células se pueden distribuir 5 intersticialmente dentro del biomaterial en cualquier disposición. Por ejemplo, las células pueden distribuirse homogéneamente por todo el biomaterial o distribuirse en zonas, regiones o capas definidas dentro del biomaterial. La incorporación de células viables en la suspensión líquida del cartílago de la invención se realiza preferiblemente en condiciones adecuadas de temperatura, pH neutro, fuerza iónica y pura para mantener la viabilidad.
- 10 Las partículas de tejido duro pueden incorporarse al biomaterial junto con osteoblastos o condrocitos, para producir un hueso artificial o un tejido sustituto de cartílago calcificado. La relación de partículas a biomaterial y células dependerá del tamaño de partícula y las propiedades del tejido requeridas (por ejemplo, tejido duro denso o empacado suelto).

- En algunas realizaciones, las partículas de tejido duro como se describen en el presente 15 documento pueden incorporarse en los extremos de una construcción lineal producida a partir del biomaterial, para facilitar la unión de la construcción *in vivo*, por ejemplo atornillándola directamente en el hueso.

Por tanto, otro **aspecto** de la invención se refiere a un tejido artificial, de ahora en adelante “tejido artificial de la invención”, que comprende:

- 20 a) el cartílago de la invención, y
b) al menos una célula, de ahora en adelante “célula de la invención”.

En una realización preferida, la célula de la invención es una célula humana. En otra realización preferida la célula de la invención se selecciona de entre: condrocitos de cartílago hialino, elástico o fibroso humano, células hepáticas, células epiteliales (por ejemplo, queratinocitos), fibroblastos o células vasculares, entre otras, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida, la célula de la invención es una célula madre. Más preferiblemente la célula madre se selecciona de entre: células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre adultas o combinaciones de las mismas. Aún más preferiblemente, es una célula madre mesenquimal. Más preferiblemente, la célula madre mesenquimal se

obtiene 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.

Aún más preferiblemente, el tejido artificial de la invención comprende una población celular,
5 de ahora en adelante “población celular de la invención”.

Tanto la célula de la invención, como la población celular de la invención, pueden ser de origen autólogo, alogénico o xenogénico. Preferiblemente, son de origen autólogo.

Otro **aspecto** se refiere al tejido artificial de la invención para su uso en medicina, o alternativamente, para su uso como medicamento.

10 Otro **aspecto** de la invención se refiere al tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado. Más preferiblemente, el tejido enfermo o dañado se selecciona de la lista que consiste en: cartílago que se encuentra en las superficies articulares (cartílago articular), la oreja, la nariz y/o la tráquea, bronquios, epiglotis, costillas (cartílago hialino, que es el mismo
15 tipo), síntesis del pubis, disco intervertebral, meniscos o cualquiera de sus combinaciones.

Para reducir y/o prevenir la muerte o el daño celular, un biomaterial que comprende células viables puede almacenarse en condiciones que mantengan la viabilidad pero que no apoyen el crecimiento celular, hasta que esté listo para su uso. Por ejemplo, el biomaterial puede almacenarse a baja temperatura, por ejemplo, de 0 a 10°C o congelarse (<0°C) en presencia
20 de un crioprotector. El biomaterial se puede almacenar en medio de cultivo celular a 37°C durante cortos períodos de tiempo, o a temperaturas más bajas (por ejemplo, a 20°C) durante períodos más largos.

Si se desea, las células de cualquier aspecto de la invención pueden modificarse genéticamente mediante cualquier método convencional incluyendo, a modo de ilustración,
25 sin limitación, procesos de transgénesis, delecciones o inserciones en su genoma que modifiquen la expresión de genes que son importantes por sus propiedades básicas (proliferación, migración, diferenciación, etc.), o mediante la inserción de secuencias de nucleótidos que codifiquen proteínas de interés como, por ejemplo, proteínas con propiedades terapéuticas. Por tanto, en otra realización preferida, las células de cualquier aspecto de la
30 invención han sido modificadas genéticamente.

En ciertos casos, la progenie de una sola célula clonal puede expandirse mediante numerosos pasos, sin que aparentemente sufra ninguna anomalía cromosómica, o la pérdida de sus propiedades de crecimiento y diferenciación.

Por tanto, si se desea, las células de cualquier aspecto de la invención se pueden expandir 5 clonalmente usando un método adecuado para clonar poblaciones celulares. Por ejemplo, una población proliferada de células puede recolectarse físicamente y sembrarse en una placa separada (o en los pocillos de una placa de "múltiples pocillos"). Otra opción es que las células se pueden subclonar en una placa de "múltiples pocillos" en una relación estadística para facilitar la operación de colocar una sola célula en cada pocillo (por ejemplo, de 10 aproximadamente 0,1 a aproximadamente una célula / pocillo o incluso aproximadamente 0,25 a 0,5 células / pocillo, como 0,5 células / pocillo). Por supuesto, las células pueden clonarse a baja densidad (por ejemplo, en una placa de Petri u otro sustrato adecuado) y 15 aislarlas de otras células usando dispositivos tales como anillos de clonación. La producción de una población clonal se puede expandir en cualquier medio de cultivo adecuado. En cualquier caso, las células aisladas se pueden cultivar hasta un punto adecuado en el que se 20 pueda evaluar su fenotipo de desarrollo. Otro aspecto de la invención se refiere a un tejido artificial de la invención que comprende una población de células aisladas, que comprende al menos una célula de la invención, que, preferiblemente, es una célula adulta. En una realización preferida, la población celular empleada en la invención comprende al menos el 20%, preferiblemente el 40% e incluso más preferiblemente el 50%, 60%, 80%, 90%, 95% o 99% de células de la invención. En una realización preferida, la población celular empleada en la invención comprende al menos el 25% 20%, preferiblemente el 40% e incluso más preferiblemente el 50%, 60%, 80%, 90%, 95% o 99% de células de la invención.

El término "célula madre adulta" significa que la célula madre se aísla de un tejido u órgano 25 de una persona o animal en un estado de crecimiento después del estado embrionario. Preferiblemente, las células madre de la invención se han aislado en un estado posnatal. Preferiblemente, se han aislado de un mamífero y, más preferiblemente, de un ser humano, incluidos neonatos, jóvenes, adolescentes y adultos.

El término "sujeto" incluye cualquier animal, en particular, animales vertebrados, 30 preferiblemente mamíferos, tales como ratones, ratas, caballos, cerdos, conejos, gatos, ovejas, perros, vacas, seres humanos, etc. El término mamífero, como se entiende aquí, se refiere a cualquier organismo del superreino *Eukaryota*, reino *Metazoa*, Phylum *Chordata*, clase *Mammalia*. Por tanto, las células que se emplean en el tejido artificial de la invención

pueden pertenecer a cualquier animal, preferiblemente un mamífero. En otra realización incluso más preferida, el mamífero es el ser humano.

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,

5 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.

10 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 proteoglucanos, glucosaminoglucanos de bajo potencial osmótico y fibras (sobre todo, colágeno). La organización de este tipo celular en el cartílago difiere en función del tipo de cartílago y el tejido en donde se encuentre. En

15 referencia al hueso o al cartílago, las células madre mesenquimales (de origen mesodérmico) tienen capacidad para diferenciarse hacia el linaje osteocondrogénico. Durante el proceso de formación del cartílago (condrogénesis), las células madre mesenquimales proliferan y se acumulan en un conjunto denso de células condrogénicas en el centro de condrifacción. Estas células condrogénicas se diferencian posteriormente a condroblastos capaces de sintetizar la

20 matriz extracelular del cartílago, que comprende fundamentalmente 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 tiene muy escasa actividad metabólica y se denomina condrocito, que es generalmente inactivo pero aún puede secretar y degradar la matriz extracelular, dependiendo de las condiciones.

25 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* o *ex vivo*. En tal cultivo celular, las células proliferan, pero no se organizan en los tejidos per se.

30 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 de morfología elongada o fusiforme. 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 autorregenerarse, 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 y células madre hematopoyéticas), tejido adiposo, cartílago, epidermis, folículo piloso, músculo esquelético, músculo cardíaco, intestino, hígado, tejido nervioso, etc.

El término "célula madre embrionaria" o "ESC" se refiere a las células derivadas de la masa celular interna de embriones en estadio de blastocisto, con capacidad de auto-renovación y de diferenciación pluripotente 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 al linaje germinal.

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.

En otra realización preferida, las células madre de la invención no son células madre embrionarias.

- 5 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 linfoideas (linfocitos T, células B, células NK). Este tipo celular se encuentra fundamentalmente en la médula ósea.
- 10 El término "célula madre mesenquimal" o "MSC", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula estromal 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), entre otras. Los marcadores expresados por las células madre mesenquimales
- 15 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
- 20 (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 pulpa dental, de tejido adiposo subcutáneo o
- 25 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 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
- 30 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, así como de la pulpa dentaria, preferentemente, humana.

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), 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.

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.

Como se usa en este documento, el término "ingrediente activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" o "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico o la curación o que logre mitigar, tratar o prevenir una enfermedad, o que afecte la estructura o función del cuerpo humano o de otros animales. Los ejemplos de ingredientes activos de origen biológico incluyen factores de crecimiento, hormonas y citocinas. Se conocen en la técnica una variedad de agentes terapéuticos y pueden identificarse por sus efectos. Ciertos agentes terapéuticos son capaces de regular la proliferación y diferenciación celular. Los ejemplos incluyen nucleótidos quimioterapéuticos, medicamentos, hormonas, etc.

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y las variantes de 5 la misma no pretenden excluir otras características técnicas, suplementos, componentes o pasos. Para los expertos en la técnica, otros objetos, ventajas y características de la invención se entenderán en parte a partir de la descripción y en parte a partir de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar la presente invención.

10

EJEMPLOS DE LA INVENCIÓN

Los siguientes ejemplos específicos proporcionados en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen sólo con fines 15 ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes de la invención que se reivindica en este documento. Por tanto, los ejemplos descritos a continuación ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Materiales y métodos.

*Obtención de cartílago del esturión (*Acipenser naccarii*) y descelularización*

Este estudio se realizó utilizando cartílago obtenido de la región de la cabeza de *Acipenser naccarii* (esturión) que fue proporcionado por la piscifactoría ubicada en Riofrío, Granada, 20 España. Los esturiones se sacrificaron, se extrajo el cartílago, se limpió y se congeló inmediatamente a -20 °C hasta el momento de su procesamiento.

Antes del proceso de descelularización, el cartílago se descongeló a temperatura ambiente 25 (TA). Se obtuvieron discos de cartílago (n = 40) con un diámetro de 8 mm y un grosor aproximado de 1 mm utilizando un punzón de biopsia (Kay Medical) y cuchillas quirúrgicas del nº 10. Estos discos se sumergieron en una solución que constaba de 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS; Sigma-Aldrich; D8662) con antibióticos / antimicóticos (Sigma-Aldrich; A5955) [Pu L et al. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2018;106(2):619-31] durante 10 minutos. Algunos de estos discos (n = 7) se 30 almacenaron como controles nativos (NCTR). El resto de discos inició el proceso de descelularización.

El protocolo de descelularización utilizado fue una combinación de varios protocolos descritos previamente [Vinatier C et al. Trends in Biotechnology. 2009;27(5):307-14, Oliveira et al. PLOS ONE. 2013;8(6):e66538, Philips C et al. Annals of Biomedical Engineering. 2018;46(11):1921-37] optimizados para la descelularización del cartílago basada en el uso de diferentes tipos de detergentes y un tratamiento enzimático. En primer lugar, los discos se incubaron en agua bidestilada (bH₂O) a temperatura ambiente con agitación durante 24 h para inducir la lisis celular mediante choque osmótico [Pu L et al. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2018;106(2):619-31]. Luego, los discos se transfirieron a una solución al 1% de sodio-dodecil-sulfato (SDS) (Invitrogen; 24730020) [Zhang X et al. Gene. 2016;579(1):8-16] para eliminar el material citoplasmático y nuclear. Para eliminar el SDS, se realizaron 3 lavados de 30 minutos cada uno con bH₂O a 4°C y luego los discos se transfirieron a una solución de Tritón X-100 al 3% (Sigma-Aldrich; X100-500ML) [Philips C et al. Annals of Biomedical Engineering. 2018;46(11):1921-37] para promover la disociación de lípidos. Posteriormente, se repitieron los 3 lavados y los discos se incubaron en una solución de desoxicolato de sodio (SDC) al 4% (Sigma-Aldrich; D6750-100G) [Philips C et al. Annals of Biomedical Engineering. 2018;46(11):1921-37] para disociar las proteínas intracelulares. Finalmente, se repitieron los 3 lavados y el tratamiento enzimático se realizó por duplicado. En este tratamiento, se utilizaron 100 mg / L de DNasa (Sigma-Aldrich; DN25-1G) y 20 mg / L de RNasa (Sigma-Aldrich; R4875-500MG) [Philips C et al. Annals of Biomedical Engineering. 2018;46(11):1921-37] en PBS a pH 7,5 y 37 °C durante 45 minutos. Para detener la reacción, se utilizó PBS frío. Luego, se realizaron 5 lavados con PBS durante 15 minutos cada uno para eliminar los residuos de detergente y enzima [Pu L et al. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2018;106(2):619-31]. Los discos de cartílago descelularizado (DCD) se almacenaron en PBS a 4°C para su uso posterior. Todos los detergentes se diluyeron en bH₂O para evitar la pérdida de agua durante el proceso, ya que la estructura del tejido puede verse afectada [Badylak SF et al. Acta Biomaterialia. 2009;5(1):1-13]. Todas las incubaciones con los detergentes se realizaron a TA, con agitación y durante 24 h.

Evaluación de ADN residual en discos de cartílago descelularizado (DCD)

Para probar la eficiencia del proceso de descelularización, se extrajo ADN de NCTR y DCD usando QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante, por triplicado y cuantificado midiendo la absorbancia a 260/280 nm usando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Cultivo de MSC y HEC

MSC (células mesenquimales humanas) y HEC (condrocitos de cartílago elástico humano) se obtuvieron previamente a partir de cultivos primarios que estaban disponibles en el Grupo de Ingeniería de Tejidos del Departamento de Histología de la Universidad de Granada. Se 5 cultivaron ADSC (células madre derivadas del tejido adiposo), BMSC (células madre derivadas de la médula ósea) y DPSC (células madre derivadas de la pulpa dental) utilizando medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich; D6429) complementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (Sigma-Aldrich; F7524) y antibióticos / antimicóticos al 1%. Las WSC (células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical) 10 se cultivaron en medio AmnioMAX™ (Gibco; 17001-074) como se describió anteriormente [Horvai A. Anatomy and Histology of Cartilage. In: Link TM, editor. Cartilage Imaging: Significance, Techniques, and New Developments. New York, NY: Springer New York; 2011. p. 1-10]. Se cultivaron HEC con medio de expansión compuesto de FBS al 10%, L-glutamina 15 2 mM (Sigma-Aldrich; G7513), 88% de medio de Eagle modificado de Dulbecco / mezcla de nutrientes F-12 HAM (DMEM-F12) (Sigma-Aldrich; D8437) y 1% de antibióticos / antimicóticos. Los cultivos se incubaron a 37°C y 5% CO₂ y el medio se cambió 3 veces por semana. Las células se disociaron antes de alcanzar la confluencia usando una solución de tripsina-etilendiaminotetraacético al 0,05% (Gibco; 25300062).

Recelularización del cartílago

20 Para la recelularización de DCD, fue necesario crear moldes a base de agarosa tipo I al 3,5% (Sigma-Aldrich; A4718) en PBS en placas de 24 pocillos (Sigma-Aldrich; CLS3527) utilizando un punzón de biopsia para obtener el tamaño de los DCD, y se colocó un DCD en cada uno de estos moldes. Tras ello, se cultivaron 30.000 células de cada tipo por DCD (n = 7 para cada tipo de célula) para generar DCD recelularizados (RCD), que pasaron a denominarse RCD- 25 ADSC, RCD-BMSC, RCD-DPSC, RCD-WSC y RCD-HEC, según el tipo celular utilizado para la recelularización. Los RCD se incubaron a 37°C con un 5% CO₂ durante 2-3 h para permitir la adhesión celular. Luego, se agregó 1 mL de cada medio específico a cada pocillo y los RCD se incubaron durante 24 h. Se utilizó un DCD no recelularizado como control negativo. Todas estas muestras se cultivaron hasta los 15-21 días (t1) y 30-35 días (t2), cambiando el medio 30 dos veces por semana.

Evaluación in vivo

Para el análisis *in vivo*, se injertaron 3 DCD y 3 RCD de cada tipo celular (RCD *in vivo*) ($n = 18$) en animales de laboratorio. Cada muestra se cortó por la mitad antes de la cirugía y se injertó en seis ratones *Foxn1nu* desnudos atípicos inmunodeficientes machos de 6 semanas de edad ($n = 6$ muestras por ratón). Brevemente, los animales se anestesiaron profundamente con ketamina y acepromazina y los diferentes sustitutos de cartílago se injertaron subcutáneamente en la zona dorsal de cada animal. Cada ratón se injertó con una muestra de cada tipo (DCD *in vivo*, ADSC *in vivo*, BMSC *in vivo*, DPSC *in vivo*, WSC *in vivo* y HEC *in vivo*). Después de 12, 30 o 60 días, los animales fueron sacrificados y los diferentes implantes fueron recolectados para análisis histológico.

10 *Análisis histológico*

Todas las muestras (NCTR, DCD, RCD *in vitro*, DCD *in vivo* y RCD *in vivo*) se fijaron en formaldehído al 4% durante 24 horas a TA y en agitación para análisis histológico. Luego, las muestras se deshidrataron mediante una serie de alcoholes (70-100%) y xilol y se embebieron en parafina. Las muestras se seccionaron a 5 μm de espesor utilizando un micrótomo, se rehidrataron y tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) para evaluar la estructura general de las diferentes muestras de cartílago. Para detectar la presencia de núcleos celulares, las muestras se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Vector Laboratories). Para evaluar la presencia de fibras de colágeno, las muestras se tiñeron con rojo picrosirius (P). La histoquímica de azul alcián (AB) [Alfonso-Rodríguez C-A et al. PLOS ONE. 2014;9(11):e112457] y azul de toluidina (TB) se utilizó para identificar los proteoglicanos del cartílago. Después de la tinción, se obtuvieron imágenes de microscopía óptica utilizando un microscopio Eclipse 90i (Nikon) con un aumento de 100x. Las imágenes se procesaron más con ImageJ para cuantificar la señal de tinción para TB, AB y P.

Análisis estadístico

25 Para cada grupo de muestras específico y global, se calcularon las medias \pm desviación estándar. Además, cuando se consideraron varios tiempos de estudio (dos tiempos *in vitro* y tres tiempos *in vivo*), se calcularon las medias \pm desviación estándar para el grupo global de muestras correspondientes al mismo tipo de tejido en diferentes períodos de tiempo (por ejemplo, muestras ADSC*invitro* correspondiente a t1 y t2). El análisis estadístico se realizó 30 utilizando el software SPSS Statistics 23 (IBM). Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de cada distribución y la prueba de Mann-Whitney se utilizó para detectar diferencias específicas entre dos grupos. $P < 0,0001$ definió diferencias

estadísticamente significativas, ajustadas por la corrección del valor de p de Bonferroni ya que en este estudio se realizaron más de 300 comparaciones simultáneamente.

RESULTADOS

Descelularización del cartílago

- 5 La eficiencia de la descelularización se evaluó mediante la cuantificación del ADN residual en los tejidos descelularizados y con H-E y DAPI. El contenido de ADN obtenido para la DCD fue de $19,92 \pm 5,79$ ng / mg de tejido, lo que concuerda con los requisitos de los tejidos descelularizados [Crapo PM. Biomaterials. 2011;32(12):3233-43]. H-E y DAPI mostraron que el proceso fue capaz de eliminar todos los núcleos del tejido en comparación con NCTR (Fig. 1A y 1C), confirmando así el resultado de cuantificación y mostrando que el proceso de descelularización se llevó a cabo con éxito. Además, H-E reveló que el cartílago conserva su estructura general después de la descelularización. El análisis de la composición de ECM en DCD reveló que TB y AB permanecieron estables después de la descelularización, aunque P mostró una disminución significativa de la tinción en DCD ($p<0,0001$) (Fig. 1A-B, 2, 3A-C).
- 10 15 *Análisis histológico de muestras de DCD recelularizadas mantenidas in vitro*

- Se analizaron histoquímicamente RCD in vitro para determinar si las células eran capaces de adherirse al cartílago descelularizado en t1 y t2. H-E y DAPI mostraron que en todas las muestras de RCD in vitro las células estaban adheridas a la superficie y tendían a crecer y formar una capa delgada irregular. RCD in vitro con ADSC (ADSCinvitro) fue el que presentó 20 mayor número de células en t1 y RCD in vitro con DPSC (DPSCinvitro) en t2, mientras que RCD in vitro con BMSC (BMSCinvitro) fue el que menos células tuvo en superficie en t1 y RCD in vitro con HEC (HECinvitro) en t2 (Fig. 1A y 1C).

- Se analizaron las posibles variaciones en RCD in vitro ECM utilizando tinciones TB, AB y P. TB mostró que NCTR no presentó diferencias significativas en el contenido de proteoglicanos 25 al compararlo con el resto de los grupos globales (ADSCinvitro, BMSCinvitro, DPSCinvitro, WSCinvitro y HECinvitro) (Tabla 1). Sin embargo, se observó que existían algunas diferencias si se comparaba con cada grupo específico (Fig. 1B). DPSCinvitro-t2 mostró la mayor reducción en la cantidad de proteoglicanos en comparación con NCTR ($p<0,0001$) (Fig. 3A). También se realizó una comparación global para DCD, revelando que hubo una disminución 30 significativa en ADSCinvitro, DPSCinvitro, WSCinvitro y HECinvitro (Tabla 1). En este caso, DPSCinvitro-t2 también tuvo el contenido más bajo en proteoglicanos (Fig. 3A).

También se midieron las variaciones en la composición de proteoglicanos con AB. En general, no se encontraron diferencias estadísticas cuando se compararon los grupos globales con NCTR o DCD (Tabla 1). Sin embargo, algunos grupos específicos fueron estadísticamente diferentes a los controles, con WSCinvitro-t2 mostrando la mayor reducción significativa de estas moléculas y HECinvitro-t1 el mayor aumento ($p<0,0001$) (Fig. 2A y 3B).

La cuantificación de las fibras de colágeno mediante tinción P reveló que los grupos globales WSCinvitro y HECinvitro tenían significativamente menos tinción de colágeno que NCTR ($p<0,0001$) (Tabla 1). Sin embargo, la comparación con grupos específicos mostró que BMSCinvitro-t2 fue el que presentó menor señal P ($p<0,0001$). Por otro lado, se observó que los grupos globales ADSCinvitro, WSCinvitro y HECinvitro tenían un contenido de colágeno significativamente mayor que el DCD ($p<0,0001$) (Cuadro 1). Específicamente, HECinvitro-t2 mostró el mayor aumento en la intensidad del colágeno (Fig. 2B y 3C).

Finalmente, también se realizó una comparación entre los tiempos dentro de cada grupo. En general, la cantidad de proteoglicanos determinada por TB tendió a caer entre t1 y t2 excepto para ADSCinvitro en el que hubo un aumento. Para HECinvitro, el contenido de estas moléculas no se alteró con el tiempo (Fig. 1B). Para la tinción AB, todos los resultados también tendieron a disminuir, excepto para DPSCinvitro, que mostró un aumento de proteoglicanos (Fig. 2A). No se observaron diferencias significativas en el contenido de colágeno presente en ADSCinvitro, WSCinvitro y HECinvitro entre t1 y t2, pero hubo una disminución en el caso de BMSCinvitro y DPSCinvitro (Fig. 2B) ($p<0,0001$).

Análisis histológico de muestras de DCD recelularizadas injertadas in vivo

Después de 12, 30 y 60 días *in vivo*, se evaluó la biocompatibilidad, integración y alteraciones estructurales en DCD *in vivo* y RCD *in vivo*. Ninguno de los animales presentó signos de necrosis o inflamación. H-E reveló que ninguno de los constructos presentaba alteraciones histológicas (oncogénesis, inflamación, hemorragia, fibrosis, etc.). Además, no hubo infiltración de las células huésped en las construcciones. En cambio, los tejidos tendían a ser encapsulados por tejido conectivo del hospedador. No se observó vascularización del tejido (fig. 4, 5 y 6).

Para todas las construcciones *in vivo*, también se realizó un análisis de alteración de ECM en grupos globales y específicos. TB determinó que solo el grupo global BMSC *in vivo* tuvo una disminución significativa en el contenido de proteoglicanos en comparación con NCTR ($p<0,0001$) (Tabla 1). Para grupos específicos, observamos que DCD *in vivo*-12d fue el grupo

con el mayor aumento de proteoglicanos, mientras que BMSC *in vivo*-60d mostró la mayor disminución. Los grupos globales BMSC *in vivo*, WSC *in vivo* y HEC *in vivo* exhibieron una reducción significativa con respecto a DCD (Tabla 1). Específicamente, DCD *in vivo*-12d y BMSC *in vivo*-60d también mostraron el mayor incremento y reducción de proteoglicanos (Fig. 5 3D, 4A y 5A).

Los resultados correspondientes a la tinción AB revelaron que no existían diferencias entre NCTR y DCD con el resto de grupos en general. DCD *in vivo*-12d fue el que mostró una mayor disminución en la intensidad de AB en comparación con NCTR y DCD, mientras que BMSC *in vivo*-12d mostró el mayor aumento de proteoglicanos en comparación con NCTR (10 $p<0,0001$) (Fig. 3E, 4A y 5A).

Se encontraron resultados similares en la tinción de colágeno entre NCTR y grupos globales, sin diferencias estadísticamente significativas (Tabla 1). Sin embargo, hubo un incremento en el contenido de colágeno en los grupos globales DPSC *in vivo*, WSC *in vivo* y HEC *in vivo* en comparación con DCD ($p<0,0001$) (Tabla 1). Para grupos específicos, ADSC *in vivo*-12d (15) mostró una mayor reducción en el contenido de colágeno en comparación con NCTR ($p<0,0001$). ADSC *in vivo*-12d y HEC *in vivo*-60d fueron los que presentaron una elevación y una disminución de la señal P en comparación con DCD, respectivamente ($p<0,0001$) (Fig. 3F, 4B y 6B).

Una comparación del curso temporal de las muestras *in vivo* mostró algunas diferencias entre 20 los grupos. En general, se encontró un aumento significativo en el contenido de colágeno según lo determinado por P entre las muestras de 12 y 60 días ($p<0,0001$), pero esta tendencia no fue clara para los proteoglicanos (Fig. 4-6).

Grupo de muestras	TB	AB	P
NCTR	146.5 ± 19.07	135.7 ± 8.26	156.9 ± 6.44
DCD	145.7 ± 8.43	148.1 ± 16.6	139.4 ± 3.47 ^{a,b}
ADSC <i>invitro</i>	116.45 ± 21 ^b	136 ± 13.44	149.95 ± 1.20 ^b
BMSC <i>invitro</i>	122.2 ± 27.72	138.9 ± 23.48	146.25 ± 13.22 5
DPSC <i>invitro</i>	117.95 ± 26.09 ^b	129.3 ± 16.97	147.55 ± 9.69
WSC <i>invitro</i>	125.8 ± 10.75 ^b	129.85 ± 23.97	147.7 ± 3.39 ^{a,b}
HEC <i>invitro</i>	117.6 ± 8.49 ^b	157.05 ± 3.23	155.8 ± 0.57 ^{a,b}
DCD <i>invivo</i>	135.8 ± 39.52	126.17 ± 28.24	153.67 ± 17.44
ADSC <i>invivo</i>	126.2 ± 22.54	130.13 ± 5.73	156.5 ± 24.19 10
BMSC <i>invivo</i>	101.63 ± 5.84 ^{a,b}	149.2 ± 1.22	148.87 ± 17.86
DPSC <i>invivo</i>	148.83 ± 2.52	137.6 ± 34.05	155.93 ± 10.57 ^b
WSC <i>invivo</i>	115.8 ± 21.17 ^b	141.27 ± 2.10	163.63 ± 4.20 ^b
HEC <i>invivo</i>	119.3 ± 19.30 ^b	141.2 ± 15.06	161 ± 10.45 ^b

Tabla 1. Análisis de componentes de la matriz extracelular determinados mediante tinción con azul de toluidina (TB), azul alcián (AB) y rojo picrosirius (P) en cada grupo global de muestras. Los valores corresponden a medias ± desviaciones estándar. a: las diferencias con NCTR son estadísticamente significativas. b: las diferencias con DCD son estadísticamente significativas.

REIVINDICACIONES

- 1.- Cartílago de organismos del orden *Acipenseriformes* para su uso como medicamento.
- 2.- El cartílago para su uso según la reivindicación anterior, donde el organismo pertenece a
5 la familia *Acipenseridae*.
- 3.- El cartílago para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el organismo pertenece al género *Acipenser* y más preferiblemente es la especie *Acipenser naccarii*.
- 4.- El cartílago para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo
10 o dañado.
- 5.- El cartílago para su uso según la reivindicación 4, donde el tejido o un órgano enfermo o dañado se selecciona de la lista que consiste en: cartílago que se encuentra en las superficies articulares (cartílago articular), la oreja, la nariz y/o la tráquea, bronquios, epiglotis, costillas, sínfisis del pubis, disco intervertebral, meniscos, o cualquiera de sus combinaciones.
- 15 6.- El cartílago para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que se encuentra diluido o liofilizado.
- 7.- El cartílago para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que se ha obtenido por un procedimiento que comprende:
 - a) inducir la lisis celular de las células del cartílago mediante choque osmótico,
 - 20 b) eliminar el material citoplasmático y nuclear,
 - c) promover la disociación de lípidos, y
 - d) disociar las proteínas intracelulares.
- 8.- El cartílago obtenido por el método según la reivindicación 7, donde la lisis celular del paso
a) se induce incubando el cartílago en agua bidestilada (bH₂O) a temperatura ambiente con
25 agitación.
- 9.- El cartílago obtenido por el método según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde la eliminación del material citoplasmático y nuclear del paso b) se realiza incubando el cartílago en una solución al 1% de sodio-dodecil-sulfato (SDS).

- 10.- El cartílago obtenido por el método según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, donde la disociación de lípidos del paso c) se realiza con una solución de Tritón X-100 al 3%.
- 11.- El cartílago obtenido por el método según cualquiera de las reivindicaciones 7-10, donde la disociación de las proteínas intracelulares del paso d) se realiza mediante la incubación del 5 cartílago en una solución de desoxicolato de sodio (SDC) al 4%.
- 12.- Tejido artificial que comprende:
- a) cartílago según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-11, y
 - b) al menos una célula.
- 13.- El tejido artificial según la reivindicación 12, donde la célula es una célula madre que se 10 selecciona de entre: células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre adultas o combinaciones de las mismas.
- 14.- El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 12-13, donde la célula madre es una célula madre mesenquimal.
- 15 15.- El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, donde la célula madre mesenquimal se obtiene 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.
- 20 16.- El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 12-15, para su uso como medicamento.
- 17.- El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 12-15, para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado.
- 25 18.- El tejido artificial según la reivindicación 17, donde el tejido o un órgano enfermo o dañado se selecciona de la lista que consiste en: cartílago que se encuentra en las superficies articulares (cartílago articular), la oreja, la nariz y/o la tráquea, bronquios, epiglotis, costillas, síntesis del pubis, disco intervertebral, meniscos, o cualquiera de sus combinaciones.

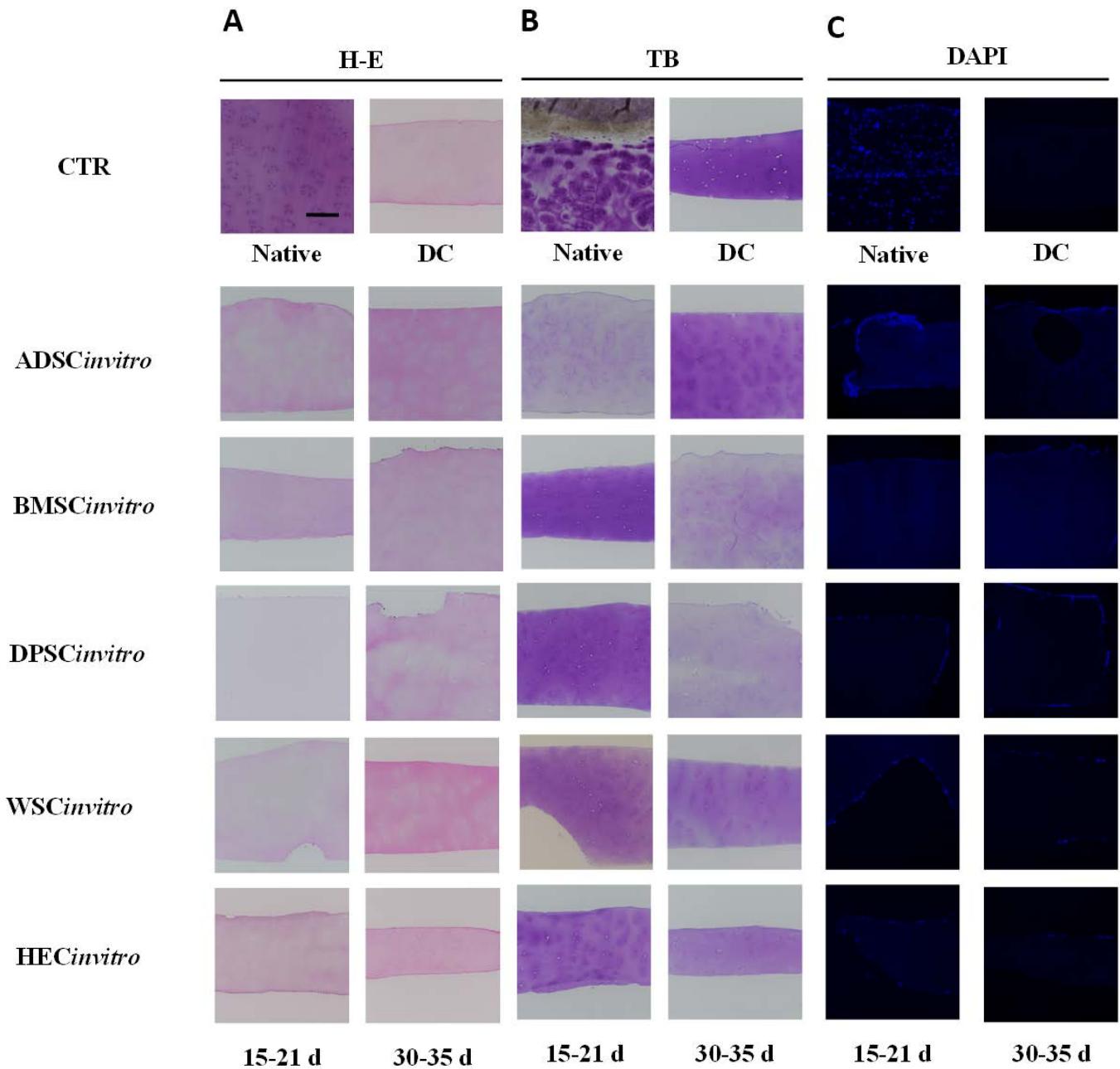


Figura 1

ES 2 905 713 A1

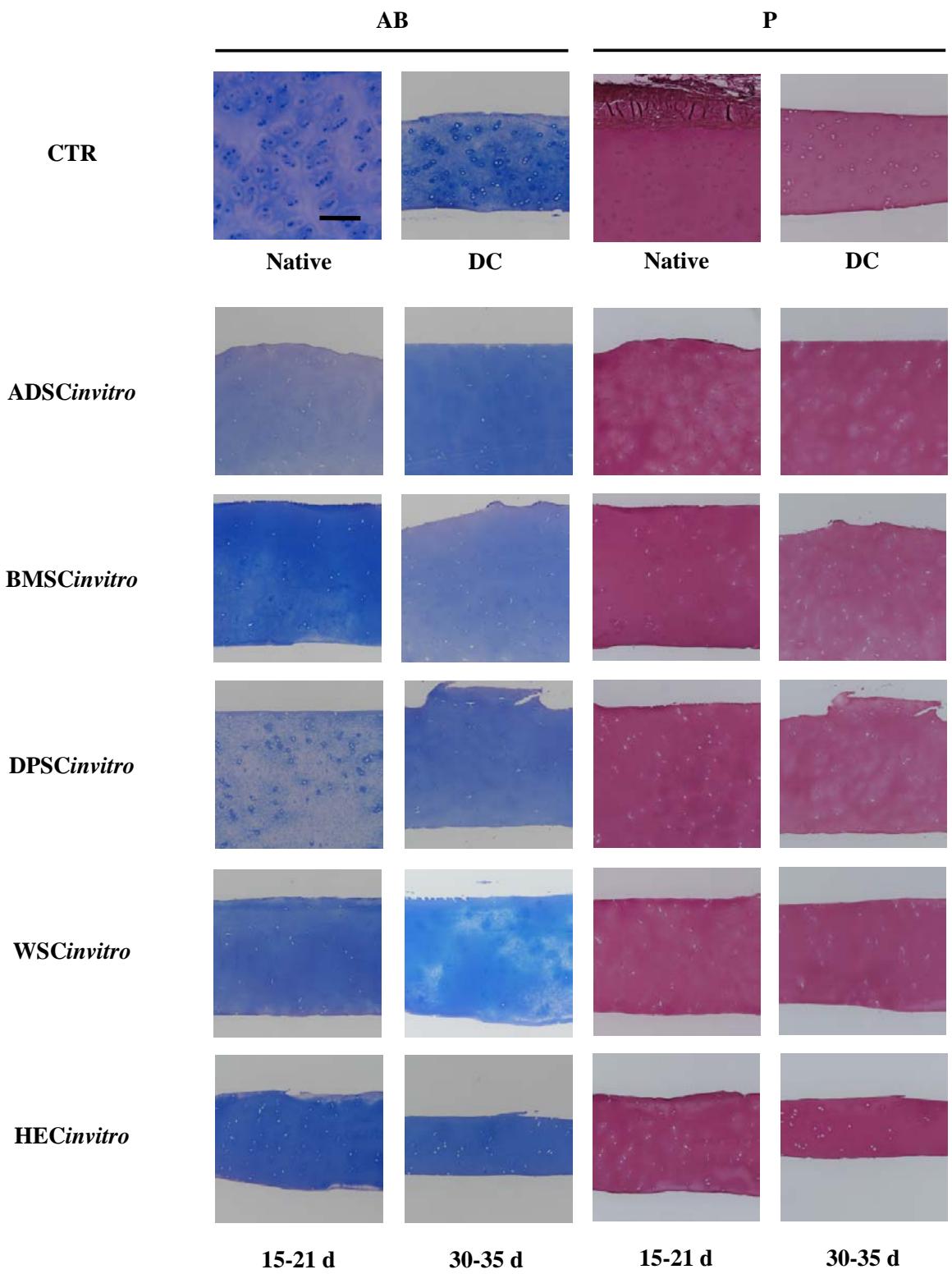


Figura 2

ES 2 905 713 A1

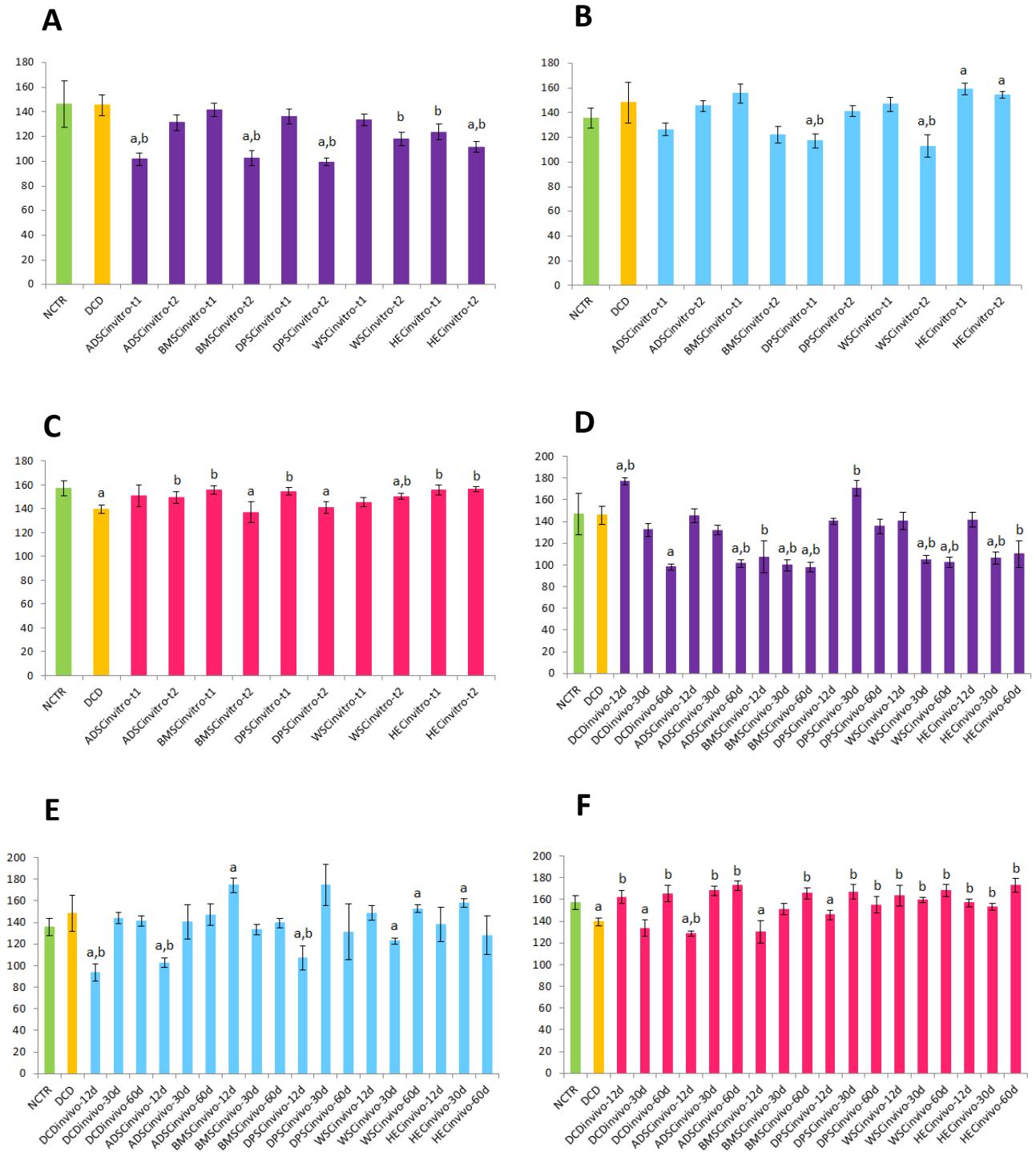


Figura 3

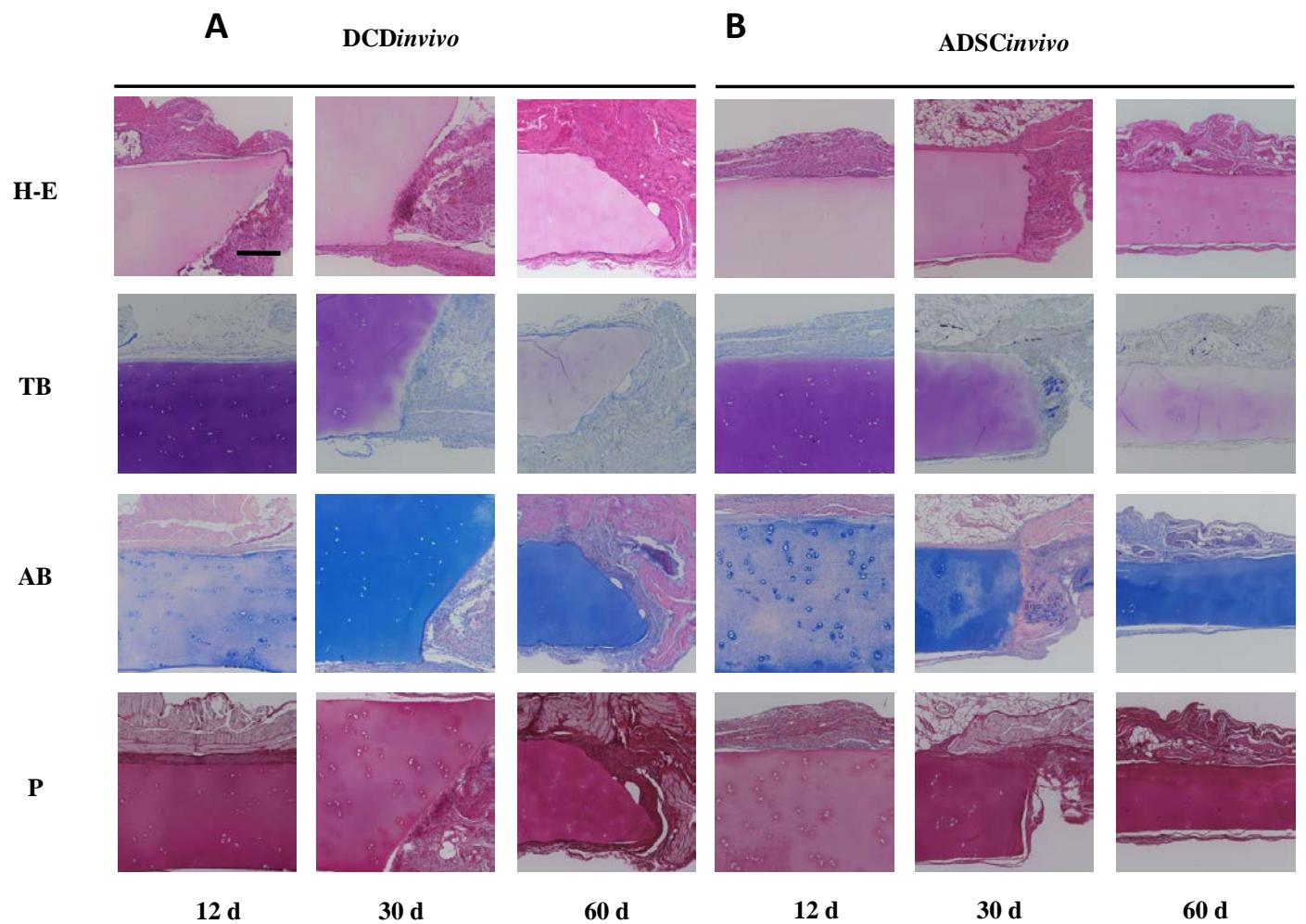


Figura 4

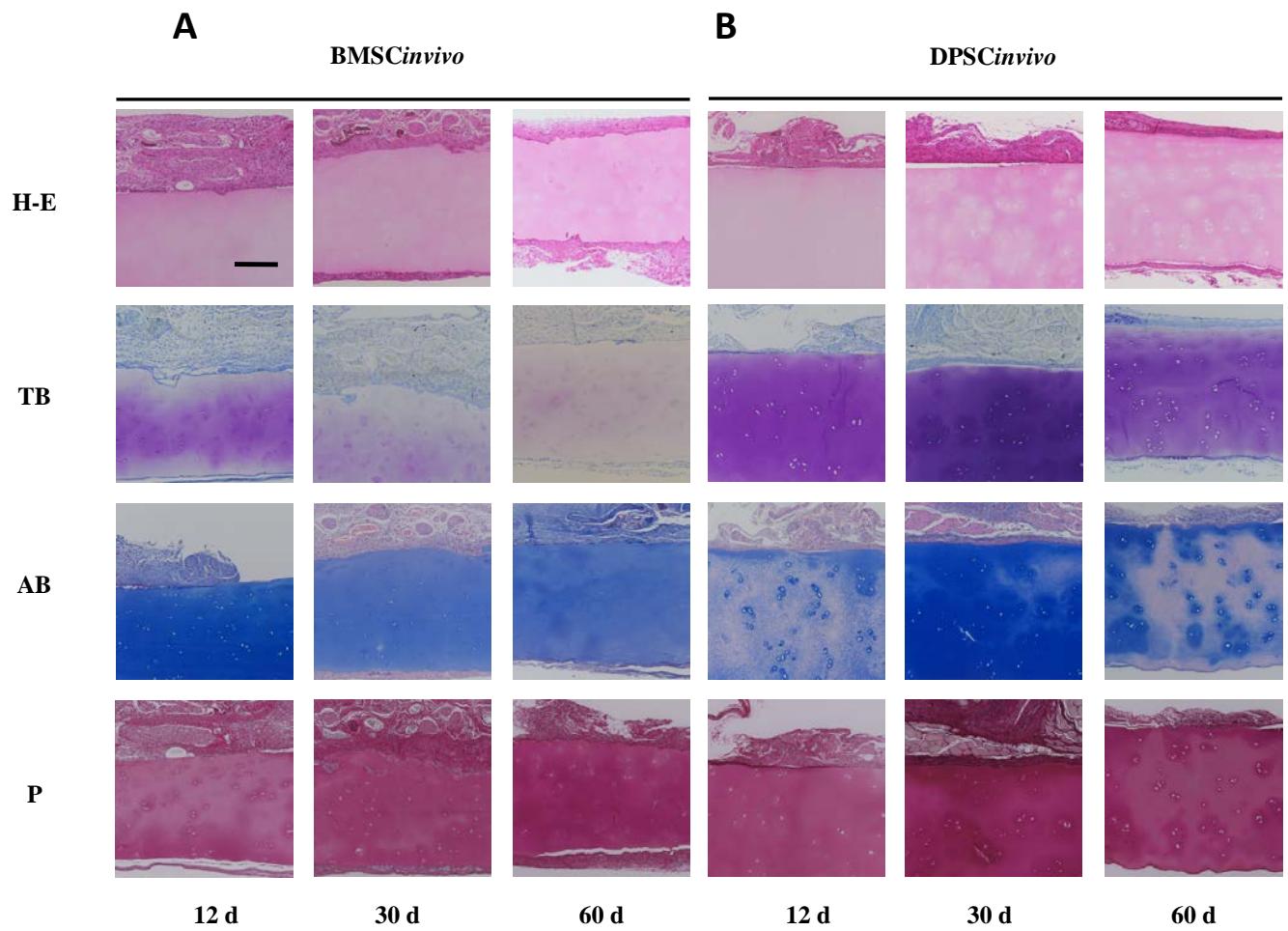


Figura 5

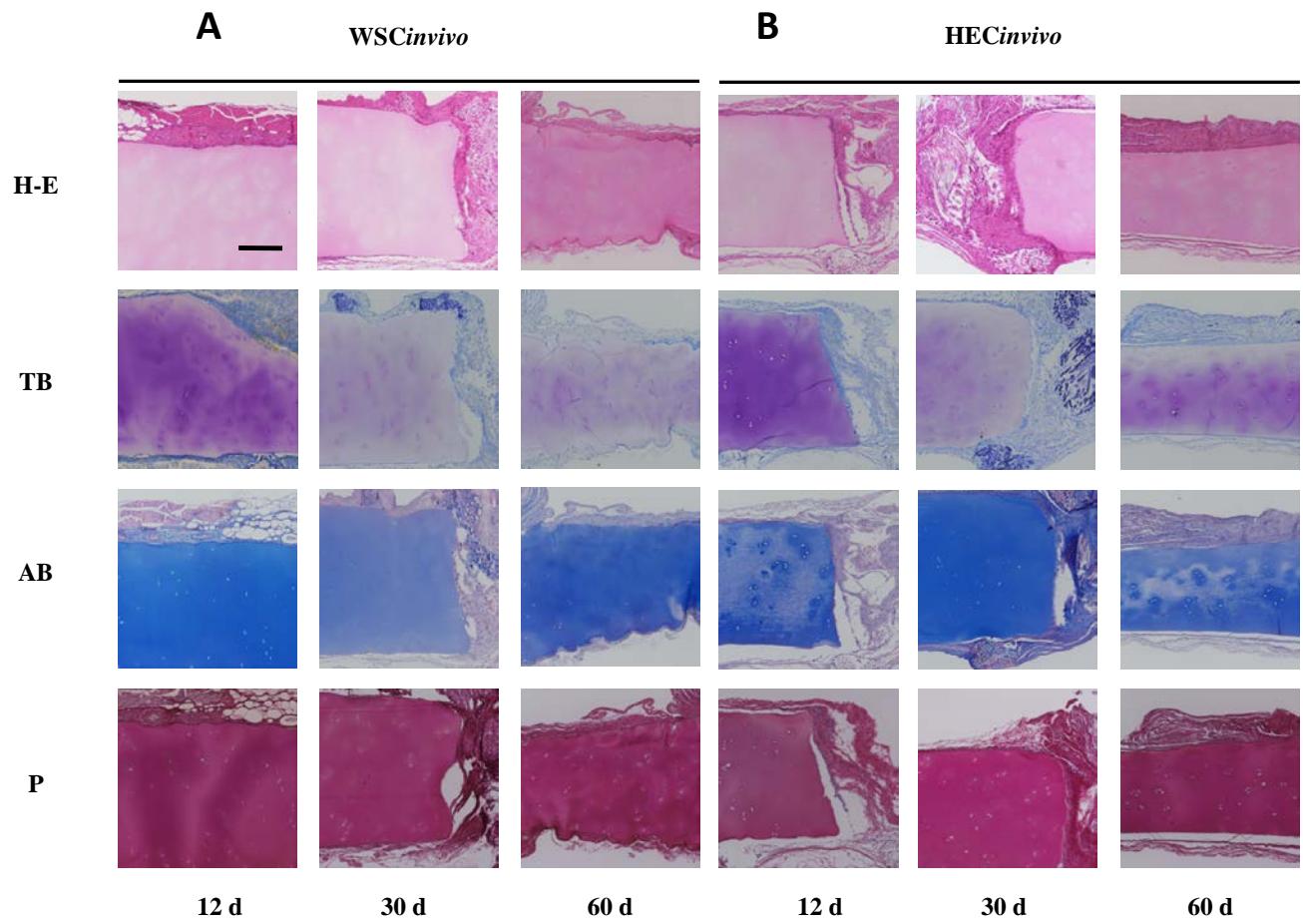


Figura 6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 202031030

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 09.10.2020

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2212310T T3 (ABBOTT LAB) 16/07/2004, página 5, líneas 1-5, 11-13, 32-34, 39-40.		1-11
X	TW 201904591 A (DENG WIN PING) 01/02/2019, (resumen) (en línea) (recuperado el 16/07/2021) recuperado de EPO EPODOC Database.		1,2
A	SUTHERLAND AMANDA <i>et al.</i> The Bioactivity of Cartilage Extracellular Matrix in Articular Cartilage Regeneration. Advanced Healthcare Materials.07/01/2015, Vol. 4, Páginas 1-25, ISSN 2192-2659(electronic), <DOI: doi:10.1002/adhm.201400165> resumen; página 2, tercer, cuarto párrafos; página 3, cuarto párrafo; página 4, primer párrafo.		1-18
A	EHAB KHEIR <i>et al.</i> Development and characterization of an acellular porcine cartilage bone matrix for use in tissue engineering. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 20111119 John Wiley & Sons, 19/11/2011, Vol. 99A, Páginas 283 - 294, ISSN 1549-3296, <DOI: doi:10.1002/jbm.a.33171>; resumen.		1-18
A	ZHANG XI <i>et al.</i> Biochemical characterisation and assessment of fibril-forming ability of collagens extracted from Bester sturgeon Huso huso x <i>Acipenser ruthenus</i> . FOOD CHEMISTRY, 20140324 Elsevier Ltd, NL. 4/03/2014, Vol. 160, Páginas 305 - 312, ISSN 0308-8146, <DOI: doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.075>. resumen; página 306, columna izquierda, tercer, cuarto, párrafos; página 306, columna derecha, segundo, cuarto párrafos; página 311, columna derecha, segundo párrafo; página 312, columna izquierda, primer párrafo.		1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 21.07.2021	Examinador S. González Peñalba	Página 1/2
--	-----------------------------------	---------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61L27/14 (2006.01)**A61K35/60** (2006.01)**A61K38/39** (2006.01)**A61P19/04** (2006.01)

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

A61L, A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC , WPI, BIOSIS, NPL, MEDLINE, EMBASE, INTERNET