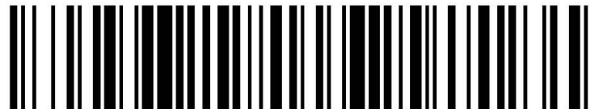


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 374**

21 Número de solicitud: 201731441

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0775** (2010.01)

**A61L 27/54** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 38/39** (2006.01)

**A61K 38/43** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**20.12.2017**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**20.06.2019**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)**

**C/ Serrano, 117  
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**RODRÍGUEZ PASCUAL, Fernando y  
ROSELL GARCÍA, Tamara**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

Observaciones:

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

54 Título: **Matriz extracelular y su uso para regular la diferenciación de células madre mesenquimales**

57 Resumen:

Matriz extracelular y su uso para regular la diferenciación de células madre mesenquimales.

La presente invención se refiere a una matriz extracelular que comprende células productoras de ECM, una lisil oxidasa (LOX), y proteína morfogenética ósea 1 (BMP1), y su uso para regular la diferenciación de células madre mesenquimales y aumentar la síntesis y/o depósitos de colágeno en una matriz extracelular. La presente invención también se refiere a un método para obtener dicha matriz extracelular que comprende incubar células en presencia de una composición que comprende una lisil oxidasa, o un fragmento de la misma, y proteína morfogenética ósea 1, o un fragmento de la misma.

ES 2 717 374 A1

## DESCRIPCIÓN

### MATRIZ EXTRACELULAR Y SU USO PARA REGULAR LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

5

La invención se refiere a una matriz extracelular (ECM) con un incremento en el depósito de colágeno que comprende una lisil oxidasa (LOX) y una proteína morfogenética ósea 1 (BMP1), y su uso para regular la diferenciación de células madre mesenquimales. La invención también describe un método *in vitro* para obtener dicha matriz extracelular. Por lo tanto, la presente invención se refiere a metodología de cultivo celular, más específicamente, a incrementar la formación de matrices extracelulares.

### **ESTADO DE LA TÉCNICA**

15

La ingeniería tisular está emergiendo como una poderosa estrategia terapéutica para tratar tejidos lesionados o degenerados mediante la implantación de elementos que imitan tejidos y órganos naturales, sintéticos o semisintéticos. Los biomateriales basados en células derivadas de ECM aprovechan la capacidad inherente de las células para crear estructuras supramoleculares altamente sofisticadas.

20

La matriz extracelular (ECM) es un microentorno dinámico que influye de manera importante en una amplia variedad de procesos celulares, que incluyen proliferación, adhesión, migración y diferenciación celular, así como que desempeña papeles fundamentales en la homeostasis y la regeneración de tejidos y órganos. La ingeniería tisular ha aprovechado estas propiedades y los biomateriales basados en ECM son actualmente una prometedora terapia para la reparación y regeneración de tejidos. En comparación con matrices artificiales, el uso de sustratos nativos de ECM permite una mejor conservación del microentorno de crecimiento celular apropiado, acelerando de ese modo la reparación del tejido dañado. Por lo tanto, sigue habiendo un gran interés en el desarrollo de técnicas y protocolos para mejorar la capacidad innata de las células para crear su propia ECM *in vitro*. Sin embargo, a pesar de los progresos significativos, aún faltan condiciones óptimas para una deposición rápida y eficaz de los componentes de la ECM, principalmente colágeno, la biomolécula estructural más importante. Este comportamiento se ha atribuido a los medios de cultivo diluidos que limitan en gran medida las modificaciones extracelulares post-traduccionales del colágeno, en particular la escisión del propéptido C, una reacción catalizada por la proteína C-proteinasa/proteína morfogenética ósea 1 (BMP1) y la formación de entrecruzamientos covalentes, iniciada por miembros de la familia de la lisil oxidasa (LOX). Estas actividades enzimáticas están íntimamente relacionadas ya que BMP1

35

también cataliza la activación proteolítica del precursor de LOX para producir la forma activa.

5 Con objeto de facilitar la deposición de colágeno en cultivos celulares se han desarrollado distintos protocolos, incluyendo ácido ascórbico y suplemento con suero. Se diseñó un método de interés basado en la adición de macromoléculas inertes en los medios de cultivo para imitar un espacio extracelular de alta densidad, un fenómeno biofísico conocido como aglomeración macromolecular. Bajo este principio, se ha descrito que la adición de sulfato de dextrano (DxS) o Ficoll™ aumenta la capacidad de depositar una abundante matriz extracelular en diferentes cultivos celulares, incluidos fibroblastos, queratinocitos, tenocitos o condrocitos.

10 Sin embargo, las condiciones convencionales de cultivo celular están lejos de ser ideales, por el hecho de que el microentorno diluido no favorece la producción de componentes de la ECM. Esto es particularmente evidente para el colágeno, la biomolécula estructural más importante, ya que su síntesis y deposición en la matriz está limitada enzimáticamente.

15 Las MSC constituyen interesantes candidatos para los protocolos biológicos de reparación tisular basados en células debido a su gran capacidad proliferativa en cultivo, a la vez que conservan su potencial de diferenciación a múltiples linajes mesenquimales. Además de su indudable interés científico, la posibilidad de monitorizar y controlar el proceso de diferenciación de MSC es un requisito regulador y clínico fundamental. Por esta razón, la regulación molecular de la diferenciación de MSC se ha estudiado ampliamente. La mayoría de los estudios son *in vitro*, ya que la identidad de las MSC en sus tejidos de origen *in vivo* permanece sin definir. Sobre la base de la información que obtenida a partir de estudios de biología del desarrollo de la esqueletogénesis embrionaria, se han investigado varias rutas de señalización y factores de transcripción y se ha demostrado que desempeñan un papel fundamental en la diferenciación de MSC. En particular, se sabe bien que las rutas de señalización de Wnt y del factor de crecimiento transformante  $\beta$ /proteína morfogenética ósea modulan la diferenciación molecular de las MSC en cartílago y hueso. De gran relevancia para el concepto emergente de nichos de células madre es la demostración de que los factores físicos también pueden participar en la regulación de la diferenciación de MSC. El conocimiento de la regulación de la diferenciación de MSC será fundamental en el diseño de sistemas de cultivo tridimensionales y biorreactores a través de modelos matemáticos aplicados a biología de sistemas y redes.

35 La solicitud de patente US2012/178159 se refiere a materiales y métodos para cultivar y expandir MSC de mamífero a la vez que se mantiene su fenotipo no diferenciado,



su capacidad de autorrenovación y/o potencial de diferenciación a múltiples linajes. En una realización, un método de la invención comprende i) sembrar MSC recién aisladas en una superficie plana, tal como placas de cultivo tisular de plástico, o en un armazón en 3-D y su posterior crecimiento en condiciones fisiológicas o con baja tensión de O<sub>2</sub> (por ejemplo, inferior a un 20 % de O<sub>2</sub>) durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de una red de ECM en 3-D; ii) descelularizar los cultivos en las placas o el armazón en 3-D para obtener matrices de ECM descelularizadas en los mismos; y iii) resembrar las matrices descelularizadas en las placas o armazón en 3-D con las MSC, por lo que las MSC resembradas crecen en la placa o armazón que comprende ECM en 3-D obtenidas a partir de células y que mantienen un fenotipo no diferenciado.

La solicitud de patente US2007/0269886 describe un producto de cultivo celular para propagar células madre embrionarias, y mantener en cultivo sus características de autorrenovación y pluripotencia durante periodos de tiempo prolongados. El producto de cultivo celular incluye un sustrato y una solución de revestimiento. La solución de revestimiento incluye una mezcla de proteínas de la matriz extracelular y un disolvente acuoso, en la que la concentración de proteína total en la solución de revestimiento puede variar de aproximadamente 10 µg/ml a 1 mg/ml. Aunque esta solicitud de patente describe un producto de cultivo celular que incluye una solución de revestimiento que funciona como un sustituto de la matriz extracelular, capaz de mantener el fenotipo no diferenciado de las células madre, esta matriz extracelular no presenta las características habituales de una matriz fisiológica, a niveles tanto cuantitativos, es decir, el alcance de los componentes de la matriz que forman un producto de este tipo, como cualitativos, tal como el entrecruzamiento apropiado del colágeno. Por lo tanto, en el estado de la técnica existe una necesidad de desarrollar una matriz más fisiológica que permita el cultivo de células madre, y, al mismo tiempo, que sea capaz de mantener su fenotipo no diferenciado.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han descubierto que implementar cultivos de fibroblastos con sobrenadantes ricos en LOX y BMP1 a partir de líneas estables de células HEK293, promueve un aumento de la deposición de colágeno sobre la matriz insoluble a expensas de la fracción soluble en el medio extracelular (Ejemplo 1). Usando protocolos de descelularización, los inventores también mostraron que las matrices obtenidas a partir de fibroblastos regulan la diferenciación adipogénica y osteogénica de células madre mesenquimales (MSC) humanas, y este efecto se moduló con LOX/BMP1 (Ejemplo 2). Estos resultados apoyan un protocolo conveniente para aumentar la capacidad de los cultivos celulares *in vitro* para depositar colágeno en la matriz extracelular, lo que representa



un enfoque prometedor para su aplicación en ingeniería tisular, además de proporcionar evidencias de que las matrices obtenidas a partir de fibroblastos son capaces de regular la diferenciación adipogénica y osteogénica de MSC humanas, una herramienta celular de enorme interés en medicina regenerativa.

5

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a una matriz extracelular (ECM), en lo sucesivo en el presente documento "ECM de la invención", que comprende una lisil oxidasa (LOX), o un fragmento de la misma, y una proteína 1 morfogenética ósea (BMP1), o un fragmento de la misma.

10

La expresión "matriz extracelular" o "ECM" se refiere a una colección de moléculas extracelulares secretadas por células de tejidos de mamíferos que proporciona un soporte estructural y bioquímico a las células circundantes, en particular células de tejido conectivo, por ejemplo células tales como fibroblastos, osteoblastos, condrocitos, células epiteliales, células del músculo liso, adipocitos, y células mesenquimales, y cuyo material *in vivo* rodea y soporta estas células. Por lo general, la ECM está formada por fibras embebidas en lo que comúnmente se denomina 'sustancia fundamental'. Las fibras están formadas por proteínas estructurales, generalmente colágeno y/o elastina. En aspectos de la presente invención, las fibras de la matriz son preferentemente colágeno. Los colágenos particularmente adecuados son colágenos formadores de fibrillas. Son particularmente preferentes colágeno de tipo I, colágeno de tipo II, colágeno de tipo III, colágeno de tipo IV o colágeno de tipo X. El más preferente es el colágeno de tipo I. La 'sustancia fundamental' está formada por proteoglicanos (o mucopolisacáridos) y puede comprender proteínas que proporcionan funcionalidad tales como fibrilina, fibronectina, y/o laminina. En aspectos de la invención, la ECM comprende de forma adecuada al menos un proteoglicano como un componente de la sustancia fundamental. El proteoglicano está formado por una proteína núcleo con ramas de moléculas de glicosaminoglicano (GAG). Los GAG adecuados son por ejemplo ácido hialurónico, 4-sulfato de condroitina, 6-sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de heparano, sulfato de heparina, y sulfato de queratano. Los GAG están unidos preferentemente a la proteína núcleo a través de un enlace trisacárido (por ejemplo, un enlace GalGalXyl). Ejemplos de proteoglicanos son decorina, biglicano, versicano y agrecano. Los proteoglicanos pueden estar opcionalmente interconectados por moléculas de ácido hialurónico. Como alternativa, múltiples proteoglicanos se pueden unir a una sola estructura principal de ácido hialurónico. En ambos casos, la sustancia fundamental forma una red de polímero o un gel capaz de retener agua. Esta red puede comprender además proteínas tales como: glicoproteínas, como por ejemplo. laminina, entactina, tenascina, fibrilina o fibronectina, para mejorar la integridad estructural de la red y para la unión de células a la ECM; osteocalcina (proteína Gla), como una proteína que se une al calcio

35

durante la mineralización; osteonectina, que cumple una función de formación de puentes entre colágeno y componente mineral; y sialoproteínas, tales como sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN), proteína 1 de matriz de dentina (DMP1), sialofosfoproteína de dentina (DSPP) y fosfoglicoproteína de matriz extracelular (MEPE). La matriz puede comprender adicionalmente citoquinas y factores de crecimiento. Las citoquinas y factores de crecimiento adecuados incluyen osteoprotegerina (OPG), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento de fibroblastos (bFGF, FGF-I y FGF-2), interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), interleuquinas (IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, e IL-11), factor de crecimiento obtenido a partir de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento transformantes (TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ), factores de necrosis tumoral (TNF), factores de crecimiento similares a insulina (IGF-I e IGF-II), factor de diferenciación de osteoclastos (ODF, también conocido como OPGL [ligando de osteoprotegerina], RANKL [activador receptor del ligando de NFB], TRANCE [citoquina inducida por activación relacionada con el TNF]) y factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). La mayoría de estos (IL-1, IL-4, IL-6, IL-11, TNF, EGF, bFGF, FGF-2, PDGF, y M-CSF) estimulan la resorción ósea. Algunos (IGF-1 e IGF-11, FGF-2 y TGF-3) mejoran la formación ósea, mientras que otros (OPG) inhiben la resorción ósea. Además otros (PDGF y TGF- $\beta$ ) también estimulan la proliferación y la diferenciación de las células productoras de colágeno.

La superficie sobre la que se deposita la ECM de la presente invención puede ser capaz de adherir las células a cultivar y ser capaz de liberar las células cuando el proceso de cultivo está completo. También se sabe que las células animales en particular se adhieren bien a las superficies que portan densidades elevadas de iones sodio. Por lo tanto, se adhieren a materiales que tienden a adquirir una carga negativa y así se unen a iones sodio. La superficie puede estar formada por un material al que las células se adhieren o puede ser fabricado a partir de un soporte inerte y revestido con material de este tipo. Los materiales adecuados incluyen plásticos, materiales tales como nailon, policarbonato, poliestireno, resinas epoxi, caucho de silicona, acetato de celulosa, nitrato de celulosa, celofán, tereftalato de polietileno, poliformaldehído, copolímero de etileno y propileno fluorado, óxido de polifenileno, mica de polipropileno, carbono, colágeno, óxidos de metales inertes insolubles, fosfatos, silicatos o carburos, carburo de silicio, metales inertes tales como acero inoxidable, aluminio, titanio o paladio, o cerámica o vidrio. En ocasiones es necesario modificar las características de la superficie aplicando un revestimiento de material menos adhesivo a las células, lo que facilita su retirada. Los materiales de revestimiento que hacen que sea más fácil retirar las células de las superficies de la matriz son hidrocarburos polifluorados tales como politetrafluoroetileno, o siliconas tales como polimetilhidrogenosiloxano. Por otro lado, una superficie de baja capacidad adhesiva se puede alterar para dar mejor adhesión mediante la aplicación de un revestimiento adecuado.



Por lo tanto el revestimiento de la superficie en particular que se usa dependerá del tipo de células a cultivar y de si se necesita la recogida de la matriz. Un revestimiento o combinación de revestimientos adecuados para cualquier aplicación en particular se puede determinar por vía empírica. Los materiales que pueden ser adecuados para la formación de matrices para su uso en la presente invención incluyen policarbonato, nailon 6, nailon 11, nailon 12, vidrio, poliformaldehído, polipropileno y óxido de 2,6-dimetilfenileno. Las matrices revestidas que pueden ser adecuadas para la formación de matrices para su uso en la presente invención incluyen policarbonato revestido con politetrafluoroetileno, silicona, polimetilhidrogenosiloxano; vidrio revestido con silicona, politetrafluoroetileno o ácido esteárico; o tereftalato de polietileno, nailon 6, nailon 11 y nailon 12, cada uno revestido con politetrafluoroetileno. En cualquier aplicación específica del presente método, el material de elección en particular se puede determinar mediante factores adicionales tales como el método mediante el cual se va a esterilizar la matriz.

La ECM de la invención comprende una proteína lisil oxidasa (LOX). La proteína LOX, también conocida como proteína lisina 6-oxidasa, es una proteína que, en seres humanos, está codificado por el gen LOX. En seres humanos, el gen LOX está situado en el cromosoma 5q23.3-31.2. La secuencia de ADN codifica un polipéptido de 417 aminoácidos, cuyos primeros 21 restos constituyen un péptido señal, con un peso de aproximadamente 32 kDa. El extremo carboxi terminal contiene el ion cobre (II) activo, restos de lisina, tirosina y cisteína que comprenden el sitio catalíticamente activo. Aunque se han descrito formas de corte y empalme (*splicing*) alternativas para dar lugar a múltiples variantes de transcritos, la presente mención solamente se refiere a la isoforma 1 de la proteína LOX (preproteína, Secuencia de Referencia de NCBI NP\_002308.2 (SEQ ID NO: 1)), la única que mantiene el sitio de procesamiento mediante la proteasa BMP1, y por lo tanto se procesa y activa por vía proteolítica con BMP1.

SEQ ID NO: 1

```

1   MRFAWTVLLL GPLQLCALVH CAPPAAGQQQ PPREPPAAPG AWRQQIQWEN NGQVFSLLSL
61  GSQYQPQRRR DPGAAVPGAA NASAQQPRTF ILLIRDNRTA AARTRTAGSS GVTAGRPRPT
121 ARHWFQAGYS TSRAREAGAS RAENQTAPGE VPALSNLRPP SRVDGMVGGDD PYNPKYSDD
181 NPYYNYDYDY ERPRPGGRYR PGYGTGYFQY GLPDLVADPY YIQASTYVQK MSMYNLRCAA
241 EENCLASTAY RADVRDYDHR VLLRFPQRVK NQGTSDFLPS RPRYSWEWHS CHQHYSMDE
301 FSHYDLLDAN TQRRVAEGHK ASFCLEDTSC DYGYHRRFAC TAHTQGLSPG CYDTYGADID
361 CQWIDITDVK PGNYILKVSV NPSYLVPESD YTNMVVRCDI RYTGHHAYAS GCTISPY

```

En una realización en particular de la ECM de la invención, la proteína LOX comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o un 99 % con la SEQ ID NO: 1.



En la presente invención, se entiende que "identidad" o "identidad de secuencia" hace referencia al grado de similitud entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos obtenidas mediante alineamiento de las dos secuencias. Dependiendo del número de restos comunes entre las secuencias alineadas, se obtendrá un grado de identidad diferente, expresado como un porcentaje. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos de alineamiento de secuencias convencionales conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo, BLAST [Altschul S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 5 de Oct; 215 (3): 403-10]. Los programas BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX, y TBLASTX, BLASTP y TBLASTN, se encuentran en el dominio público en la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI). El experto en la materia comprende que las mutaciones en la secuencia de nucleótidos de genes que dan lugar a sustituciones de aminoácidos conservativas en posiciones no críticas para la funcionalidad de la proteína son mutaciones evolutivamente neutras que no influyen en su estructura global o en su funcionalidad. Por lo tanto, las variantes de la proteína LOX de SEQ ID NO: 1 están incluidas dentro del contexto de la presente invención. Aparte de seres humanos, otras fuentes a partir de las que se pueden obtener variantes de la proteína LOX incluyen, pero no se limitan a, animales no humanos tales como primates no humanos, cerdos, ratones y ratas entre otros. En una realización más particular, la proteína LOX comprende la secuencia SEQ ID NO: 1. La presente invención también incluye fragmentos de la proteína LOX, siendo considerados dichos fragmentos variantes de la proteína LOX. Como se usa en el presente documento, la expresión "fragmento de la proteína LOX" o "fragmento de proteína LOX" se refiere a un polipéptido que tiene uno o más (varios) aminoácidos delecionados del extremo amino y/o carboxilo terminal de la proteína LOX; o una secuencia homóloga del mismo; en la que el fragmento tiene actividad de lisil oxidasa. Por lo tanto, las variantes de la proteína LOX muestran actividad de lisil oxidasa. Ensayos para evaluar la actividad de lisil oxidasa de una proteína dada (o variante) se conocen ampliamente en el estado de la técnica. Ejemplos de estos ensayos incluyen, pero no se limitan a, un método basado en la medición de agua tritiada liberada por acción enzimática sobre lisina e hidroxilisina unidas a proteínas marcadas (Melet, J. *et al.* 1977. Analytical Biochemistry, vol. 77 (1): 141-146) y un ensayo de fluorescencia que utiliza 1,5-diaminopentano como sustrato y que libera peróxido de hidrógeno que se detecta usando rojo Amplex en reacciones acopladas a peroxidasa de rábano picante (Palamakumbura AH1 y Trackman PC. 2002. Anal Biochem, 300 (2): 245-51). Además, para medir la actividad de lisil oxidasa también se pueden usar kits comerciales, tal como el Kit de Ensayo de Actividad de Lisil Oxidasa de BioVision, Inc., San Francisco, o Abcam PLC, Cambridge, Reino Unido.

La ECM de la invención también comprende una proteína morfogenética ósea 1 o BMP1. BMP1 es una proteína que en seres humanos está codificada por el gen BMP1. El locus BMP1 codifica una proteína que es capaz de inducir la formación de cartilago *in vivo*. La proteína BMP1 escinde los propéptidos C-terminales del procolágeno I, II, e III y su actividad aumenta con la proteína potenciadora de endopeptidasa C de procolágeno. El gen BMP1 se expresa como variantes de corte y empalme (*splicing*) alternativo que comparten un dominio de proteasa N-terminal pero que se diferencian en su región C-terminal. Existen cinco isoformas de la proteína creada mediante corte y empalme alternativo: precursor de la isoforma 3 (Secuencia de Referencia de NCBI: NP\_006120 (SEQ ID NO: 2)), precursor de la isoforma 1 (Secuencia de Referencia de NCBI: NP\_001190 SEQ ID NO: 3)), isoforma X2 (Secuencia de Referencia de NCBI: XP\_016869227, SEQ ID NO: 4)), isoforma X3 (Secuencia de Referencia de NCBI: XP\_011542919 (SEQ ID NO: 5)), isoforma X1 (Secuencia de Referencia de NCBI: XP\_006716449 (SEQ ID NO: 6))

## 15 SEQ ID NO: 2

```

1   MPGVARLPLL LGLLLLPRPG RPLDLADYTY DLAEEDDSEP LNYKDPCAAA AFLGDIALDE
61  EDLRAFQVQQ AVDLRRHTAR KSSIKAAVPG NTSTPSCQST NGQPORGACG RWRGRSRSRR
121 AATSRPERVW PDGVIPFVIG GNFTGSQRAV FRQAMRHWEK HTCVTFLERT DEDSYIVFTY
181 RPCGCCSYVG RRGGGPQAIS IGKNCDFGI VVHELGHVVG FWHEHTRPDR DRHVSIVREN
241 IQPGQEYNFL KMPEQEVESL GETYDFDSIM HYARNTFSRG IFLDTIVPKY EVNGVKPPIG
301 QRTRLSKGGDI AQARKLYKCP ACGETLQDST GNFSSPEYPN GYSAHMHCWV RISVTPGEKI
361 ILNFTSLDLY RSRLCWYDYV EVRDGFWRKA PLRGRFCGSK LPEPIVSTDS RLWVEFRSSS
421 NWWGKGFFAV YEAI CGGDVK KDYGHISPN YPDDYRPSKV CIWRIQVSEG FHVGLTFQSF
481 EIERHDS CAY DYLEVRDGH S ESSTLIGRYC GYEKPDDIKS TSSRLWLK FV SDGSINKAGF
541 AVNFFKEVDE CSRPNRGGCE QRCLNTLGSY KCSCDPGYEL APDKRRCEAA CGGFLT KLNG
601 SITSPGWPK E YPPNKNCIWQ LVAPTQYRIS LQDFDFETEG NDVCKYDFVE VRSGLTADSK
661 LHGKFCGSEK PEVITSQYNN MRVEFKSDNT VSKKGFKAHF FSDKDECSKD NGGCQQDCVN
721 TFGSYEQCR SGFVLHDNKH DCKEAGCDHK VTSTSGTITS PNWPKYPSK KECTWAISST
781 PGHRVKLTFM EMDIESQPEC AYDHLEVFDG RDAKAPVLGR FCGSKKPEPV LATGSRMFLR
841 FYSDMSVQRK GFQASHATEC GGQVRADVKT KDLYSHAQFG DNNYPGGVDC EWVIVAE EGY
901 GVELVFQTFE VEEETDCGYD YMELFDGYDS TAPRLGRYCG SGPPEEVYSA GDSVLVKFHS
961 DDTITKGFH LRYTSTKFQD TLHSRK

```

ES 2 717 374 A1

SEQ ID NO: 3

1 MPGVARLPLL LGLLLLPRPG RPLDLADYTY DLAEEDDSEP LNYKDPCKAA AFLGDIALDE  
61 EDLRAFQVQQ AVDLRRHTAR KSSIKAAVPG NTSTPSCQST NGQPORGACG RWRGRSRRR  
121 AATSRPERVW PDGVIPFVIG GNFTGSQRAV FRQAMRHWEK HTCVTFLERT DEDSYIVFTY  
181 RPCGCCSYVG RRGGGPQAIS IGKNCDFKFI VVHELGHVVG FWHEHTRPDR DRHVSIVREN  
241 IQPGQEYNFL KMPEQEVESL GETYDFDSIM HYARNTFSRG IFLDTIVPKY EVNGVKPPIG  
301 QRTRLSKEDI AQARKLYKCP ACGETLQDST GNFSSPEYPN GYSAHMHCVW RISVTPGEKI  
361 ILNFTSLDLY RSRLCWYDYV EVRDGFWRKA PLRGRFCGSK LPEPIVSTDS RLWVEFRSSS  
421 NUVGKGFFAV YEAIICGGDVK KDYGHIQSPN YPDDYRPSKV CIWRIQVSEG FHVGLTFQSF  
481 EIERHDS CAY DYLEVRDGHS ESSTLIGRYC GYEKPDDIKS TSSRLWLKVF SDGSINKAGF  
541 AVNFFKEVDE CSRPNRGGCE QRCLNTLGSY KCSCDPGYEL APDKRRCEAA CGGFLTKLNG  
601 SITSPGWPKY YPPNKNCIWQ LVAPTQYRIS LQFDFFETEG NDVCKYDFVE VRSGLTADSK  
661 LHGKFCGSEK PEVITSQYNN MRVEFKSDNT VSKKGFKAHF FSEKRPALQP PRGRPHQLKF  
721 RVQKRNRTPQ

SEQ ID NO: 4

1 MPGVARLPLL LGLLLLPRPG RPLDLADYTY DLAEEDDSEP LNYKDPCKAA AFLGDIALDE  
61 EDLRAFQVQQ AVDLRRHTAR KSSIKAAVPG NTSTPSCQST NGQPORGACG RWRGRSRRR  
121 AATSRPERVW PDGVIPFVIG GNFTGSQRAV FRQAMRHWEK HTCVTFLERT DEDSYIVFTY  
181 RPCGCCSYVG RRGGGPQAIS IGKNCDFKFI VVHELGHVVG FWHEHTRPDR DRHVSIVREN  
241 IQPGQEYNFL KMPEQEVESL GETYDFDSIM HYARNTFSRG IFLDTIVPKY EVNGVKPPIG  
301 QRTRLSKEDI AQARKLYKCP ACGETLQDST GNFSSPEYPN GYSAHMHCVW RISVTPGEKI  
361 ILNFTSLDLY RSRLCWYDYV EVRDGFWRKA PLRGRFCGSK LPEPIVSTDS RLWVEFRSSS  
421 NUVGKGFFAV YEAIICGGDVK KDYGHIQSPN YPDDYRPSKV CIWRIQVSEG FHVGLTFQSF  
481 EIERHDS CAY DYLEVRDGHS ESSTLIGRYC GYEKPDDIKS TSSRLWLKVF SDGSINKAGF  
541 AVNFFKEVDE CSRPNRGGCE QRCLNTLGSY KCSCDPGYEL APDKRRCEAA CGGFLTKLNG  
601 SITSPGWPKY YPPNKNCIWQ LVAPTQYRIS LQFDFFETEG NDVCKYDFVE VRSGLTADSK  
661 LHGKFCGSEK PEVITSQYNN MRVEFKSDNT VSKKGFKAHF FSGGELFGLL GHPPRRP



## SEQ ID NO: 5

```

1   MPGVARLPLL LGLLLLPRPG RPLDLADYTY DLAEEDDSEP LNYKDPCKAA AFLGDIALDE
61  EDLRAFQVQQ AVDLRRHTAR KSSIKAAVPG NTSTPSCQST NGQPQRGACG RWRGRSRSRR
121 AATSRPERVW PDGVIPFVIG GNFTGSQRAV FRQAMRHWEK HTCVTFLERT DEDSYIVFTY
181 RPCGCCSYVG RRGGGPQAIS IGKNCDFGI VVHELGHVVG FWHEHTRPDR DRHVSIVREN
241 IQPGQEYNFL KMEPQEVESL GETYDFDSIM HYARNTFSRG IFLDTIVPKY EVNGVKPPIG
301 QRTRLSKEDI AQARKLYKCP ACGETLQDST GNFSSPEYPN GYSAHMHCVW RISVTPGEKI
361 ILNFTSLDLY RSRLCWYDYV EVRDGFWRKA PLRGRFCGSK LPEPIVSTDS RLWVEFRSSS
421 NWWGKGFFAV YEAICGGDVK KDYGHIOQSPN YPDDYRPSKV CIWRIQVSEG FHVGLTFQSF
481 EIERHDSWAY DYLEVRDGHG ESSTLIGRYC GYEKPDDIKS TSSRLWLKVF SDGSINKAGF
541 AVNFFKEVDE CSRPNRGGCE QRCLNTLGSY KCSCDPGYEL APDKRRCEGC YDLQVGKPLL
601 WDRHCFRLST HGPEMLGTAL RG

```

## SEQ ID NO: 6

```

1   MPGVARLPLL LGLLLLPRPG RPLDLADYTY DLAEEDDSEP LNYKDPCKAA AFLGDIALDE
61  EDLRAFQVQQ AVDLRRHTAR KSSIKAAVPG NTSTPSCQST NGQPQRGACG RWRGRSRSRR
121 AATSRPERVW PDGVIPFVIG GNFTGSQRAV FRQAMRHWEK HTCVTFLERT DEDSYIVFTY
181 RPCGCCSYVG RRGGGPQAIS IGKNCDFGI VVHELGHVVG FWHEHTRPDR DRHVSIVREN
241 IQPGQEYNFL KMEPQEVESL GETYDFDSIM HYARNTFSRG IFLDTIVPKY EVNGVKPPIG
301 QRTRLSKEDI AQARKLYKCP ACGETLQDST GNFSSPEYPN GYSAHMHCVW RISVTPGEKI
361 ILNFTSLDLY RSRLCWYDYV EVRDGFWRKA PLRGRFCGSK LPEPIVSTDS RLWVEFRSSS
421 NWWGKGFFAV YEAICGGDVK KDYGHIOQSPN YPDDYRPSKV CIWRIQVSEG FHVGLTFQSF
481 EIERHDSWAY DYLEVRDGHG ESSTLIGRYC GYEKPDDIKS TSSRLWLKVF SDGSINKAGF
541 AVNFFKEVDE CSRPNRGGCE QRCLNTLGSY KCSCDPGYEL APDKRRCEAA CGGFLTKLNG
601 SITSPGWPKY YPPNKNCIWQ LVAPTQYRIS LQFDFFETEG NDVCKYDFVE VRSGLTADSK
661 LHGKFCGSEK PEVITSQYNN MRVEFKSDNT VSKKGFKAHF FSGGLNGDQQ PLAQPLSADP
721 PPGDLPFFV NHSALHPGSW RGQGTDTIY QAWSYCSAPM PWSTLCPHP QPCTETHPT
781 RTHMCTHIAP SHKKPAEDPH WGRGSALRA RGI

```

5

En el contexto de la presente invención se puede usar cualquier isoforma de la proteína BMP1, incluyendo miembros adicionales de la familia BMP1/similar a toloide (*tolloid-like*), tal como similar a toloide 1 (TLL1) o similar a toloide 2 (TLL2), que muestran un grado de homología muy elevado con BMP1 en su extremo N-terminal catalítico. Existen cuatro isoformas de proteína TLL1 creadas mediante corte y empalme alternativo, y una de TLL2: isoforma X1 de proteína similar a toloide 1 (Secuencia de Referencia de NCBI: XP\_016864059.1 (SEQ ID NO:7)), isoforma X2 de proteína similar a toloide 1 (Secuencia de Referencia de NCBI: XP\_011530516.1 (SEQ ID NO: 8)), isoforma 2 de proteína similar a toloide 1 (Secuencia de Referencia de NCBI: NP\_001191689.1 (SEQ ID NO: 9)), isoforma 1 de proteína similar a toloide 1 (Secuencia de Referencia de

15

NCBI: NP\_036596.3 (SEQ ID NO: 10)), precursor de proteína similar a toloide 2 (Secuencia de Referencia de NCBI: NP\_036597 (SEQ ID NO: 11)).

## SEQ ID NO: 7

1 MRGGQSQSVF WGDIALDDED LNIFQIDRTI DLTQNPFGNL GHTTGGLGDH AMSKKRGALY  
 61 QLIDRIRRIG FGLEQNNTVK GKVPLQFSGQ NEKNRVPRAA TSRTERIWPV GVIPYVIGGN  
 121 FTGSQRAMFK QAMRHWEKHT CVTFIERSDE ESYIVFTYRP CGCCSYVGRR GNGPQAISIG  
 181 KNCDFKGIWV HELGHVIGFW HEHTRPDRDN HVTIIRENIQ PGQEYNFLKM EPGEVNSLGE  
 241 RYDFDSIMHY ARNTFSRGMF LDTILPSRDD NGIRPAIGQR TRLSKGDIAQ ARKLYRCPAC  
 301 GETLQESNGM LSSPGFPNGY PSYTHCIWRV SVTPGEKIVL NFFTMDLYKS SLCWYDYIEV  
 361 RDGYWRKSPL LGRFCGDKLP EVLTSTDSRM WIEFRSSSNW VGKGFAAVYE AICGGEIRKN  
 421 EGQIQSPNYP DDYRPMKECV WKITVSESYH VGLTFQSFEI ERHDNCAVDY LEVRDGTSEN  
 481 SPLIGRFQCY DKPEDIRSTS NTLWMKFVSD GTVKNAGFAA NFFKEEDECA KPDRGGCEQR  
 541 CLNTLGSYQC ACEPGYELGP DRRSCEAACG GLLTKLNGTI TTPGWPKEYP PNKNCVWQVW  
 601 APTQYRISVK FEFFELEGNE VCKYDYVEIW SGLSSESKLH GKFCGAEVPE VITSQFNNMR  
 661 IEFKSDMTVS KKGFKAHFFS DKDECSKDNM GCQHECVNTM GSYMCCQCRNG FVLHDNKHDC  
 721 KEAECEQKIH SPSGLITSPN WPKYPSRKE CTWEISATPG HRIKLAFSEF EIEQHQCAY  
 781 DHLEVFDGET EKSPILGRLC GNKIPDPLVA TGNKMFVRFV SDASVQRKGF QATHSTECGG  
 841 RLKAESKPRD LYSHAQFGDN NYPGQVDCEW LLVSEGRSRL ELSFQTFEVE EEADCGYDYV  
 901 ELFDGLDSTA VGLGRFCGSG PPEEISIGD SVLIHFHTDD TINKKGFHIR YKSIRYPTT  
 961 HTKK

## SEQ ID NO: 8

1 MFKQAMRHWE KHTCVTFIER SDEESYIVFT YRPGCCSYV GRRGNGPQAI SIGKNCDFG  
 61 IVVHELGHVI GFWHEHTRPD RDMHVTIIRE NIQPGQEYNF LKMEPGEVNS LGERYDFDSI  
 121 MHYARNTFSR GMFLDTILPS RDDNGIRPAI GQRTRLSKGD IAQARKLYRC PACGETLQES  
 181 NGMLSSPGFP NGYPSYTHCI WRVSVTPGEK IVLNFTTMDL YKSSLCWYDY IEVRDGYWRK  
 241 SPLLGRFCGD KLPEVLTSTD SRMWIEFRSS SNWVGKFAA VYEAICGGEI RKNEGQIQSP  
 301 NYPDDYRPMK ECVWKITVSE SYHVGLTFQS FEIERHDNCA YDYLEVRDGT SENSPLIGRF  
 361 CGYDKPEDIR STSNTLWMKF VSDGTVNKAG FAANFFKEED ECAKPDGGC EQRCLNTLGS  
 421 YQCACEPGYE LGPDRSCEA ACGLLTKLM GTITTPGWPK EYPPNKNCWV QVWAPTQYRI  
 481 SVKFEFFELE GNEVCKYDYV EIWSGLSSES KLHGKFCGAE VPEVITSQFN NMRIEFKSDN  
 541 TVSKKGFKAH FFSKDECSK DMGGCQHECV NTMGSYMCQC RNGFVLHDNK HDCKEAECEQ  
 601 KIHSPSGLIT SPNWPDKYPS RKECTWEISA TPGHRIKLAF SEFEIEQHQE CAYDHLEVFD  
 661 GETEKSPILG RLCGNKIPDP LVATGNKMFV RFVSDASVQR KGFQATHSTE CGGRLKAESK  
 721 PRDLYSHAQF GDMNYPGQVD CEWLLVSEGR SRLELSFQTF EVEEEADCGY DYVELFDGLD  
 781 STAVGLGRFC GSGPPEEISY IGDSVLIHFH TDDTINKKGF HIRYKSIRYP DTTHTKK

ES 2 717 374 A1

SEQ ID NO: 9

1 MGLGTLSPRM LVWLVASGIV FYGELWVCAG LDYDYTFDGN EEDKTETIDY KDPCKAAVFW  
 61 GDIALDDEDL NIFQIDRTID LTQNPFGNLG HTTGGGLGDHA MSKKRGALYQ LIDRIRRIGF  
 121 GLEQNNTVKG KVPLQFSGQN EKNRVPRAAT SRTERIWPGG VIPYVIGGNF TGSQRAMFKQ  
 181 AMRHWEKHTC VTFIERSDEE SYIVFTYRPC GCCSYVGRRG NGPQAISIGK NCDKFGIVVH  
 241 ELGHVIGFWH EHTRPDRDNH VTIIRENIQP GQEYNFLKME PGEVNSLGER YDFDSIMHYA  
 301 RNTFSRGMFL DTILPSRDDN GIRPAIGQRT RLSKGDIAQA RKLYRCPACG ETLQESNGNL  
 361 SSPGFPNGYP SYTHCIWRVS VTPGEKVVFS LC

SEQ ID NO: 10

1 MGLGTLSPRM LVWLVASGIV FYGELWVCAG LDYDYTFDGN EEDKTETIDY KDPCKAAVFW  
 61 GDIALDDEDL NIFQIDRTID LTQNPFGNLG HTTGGGLGDHA MSKKRGALYQ LIDRIRRIGF  
 121 GLEQNNTVKG KVPLQFSGQN EKNRVPRAAT SRTERIWPGG VIPYVIGGNF TGSQRAMFKQ  
 181 AMRHWEKHTC VTFIERSDEE SYIVFTYRPC GCCSYVGRRG NGPQAISIGK NCDKFGIVVH  
 241 ELGHVIGFWH EHTRPDRDNH VTIIRENIQP GQEYNFLKME PGEVNSLGER YDFDSIMHYA  
 301 RNTFSRGMFL DTILPSRDDN GIRPAIGQRT RLSKGDIAQA RKLYRCPACG ETLQESNGNL  
 361 SSPGFPNGYP SYTHCIWRVS VTPGEKIVLN FTTMDLYKSS LCWYDYIEVR DGYWRKSPLL  
 421 GRFCGDKLPE VLTSTDSRMW IEFRSSSNWV GKGFAAVYEA ICGGEIRKNE GQIQSPNYPD  
 481 DYRPMKECVW KITVSESYHV GLTFQSFEIE RHDNCAYDYL EVRDGTSEMS PLIGRFCGYD  
 541 KPEDIRSTSN TLWMMFVSDG TVNKAGFAAN FFKEEDECAK PDRGGCEQRC LNTLGSYQCA  
 601 CEPGYELGPD RRSCEAACGG LLTKLNGTIT TPGWPKEYPP NKNCVWQVVA PTQYRISVKF  
 661 EFFELEGNEV CKYDYVEIWS GLSSES KLHG KFCGAEVPEV ITSQFNMRI EFKSDNTVSK  
 721 KGFKAHFFSD KDECSKDNGG CQHECVNTMG SYMCQCRNGF VLHDNKHDCK EAECEQKIHS  
 781 PSGLITSPNW PDKYPSRKEC TWEISATPGH RIKLAFSEFE IEQHQCAYD HLEVFDGETE  
 841 KSPILGRLCG NKIPDPLVAT GNKMFVRFVS DASVQRKGFQ ATHSTECGGR LKAESKPRDL  
 901 YSHAQFGDNN YPGQVDCEWL LVSERGSRLE LSFQTFEVEE EADCGYDYVE LFDGLDSTAV  
 961 GLGRFCGSGP PEEIYSIGDS VLIHFHTDDT INKKGPHIRY KSIRYPDTH TKK



SEQ ID NO: 11

```

1 MPRATALGAL VSLLLLLPLP RGAGGLGERP DATADYSELD GEEGTEQQLE HYHDPCKAAV
61 FWGDIALDED DLKLFHIDKA RDWTKQTVGA TGHSTGGLEE QASESSPDTT AMDTGTKEAG
121 KDGRENTTLL HSPGTLHAAA KTFSPRVRRR TTSRTERIWP GGVIPYVIGG NFTGSQRAIF
181 KQAMRHWEKH TCVTFIERTD EESFIVFSYR TCGCCSYVGR RGGGPQAISI GKNCKDFGIV
241 AHELGHVVGF WHEHTRPDRD QHVTTIIRENI QPGQEYNFLK MEAGEVSSLG ETYDFDSIMH
301 YARNTFSRGV FLDTILPRQD DNGVRPTIGQ RVRLSQGDIA QARKLYKCPA CGETLQDTTG
361 NFSAPGF PNG YPSYSHCVWR ISVTPGEKIV LNFTSMDLFK SRLCWYDYVE VRDGYWRKAP
421 LLGRFCGDKI PEPLVSTDSR LUVEFRSSSN ILGKGFFAA Y EATCGDMNK DAGQIQSPNY
481 PDDYRPSKEC VWRITVSEGF HVGLTFQAFE IERHDS CAYD YLEVRDGPTE ESALIGHFCG
541 YEKPEDVKSS SNRLWMKFVS DGSINKAGFA ANFFKEVDEC SWPDHGGCEH RCVNTLGSYK
601 CACDPGYELA ADKKMCEVAC GGFITKLNGT ITSPGWPKEY PTNKNCVWQV VAPAQYRISL
661 QFEVFELEGN DVCKYDFVEV RSGLSPDAKL HGRFCGSETP EVITSQSNNM RVEFKSDNTV
721 SKRGFRAHFF SDKDECAKDN GGCQHECVNT FGSYLCRCRN GYWLHENGHD CKEAGCAHKI
781 SSVEGTLASP NWPDKYPSRR ECTWNISSTA GHRVKLTFNE FEIEQHQECA YDHLEMYDGP
841 DSLAPILGRF CGSKKPDPTV ASGSSMFLRF YSDASVQRKG FQAVHSTECG GRLKAEVQTK
901 ELYSHAQFGD MNYPSEARCD WVIVAEDGYG VELTFRTFEV EEEADCGYDY MEAYDGYDSS
961 APRLGRFCGS GPLEEIYSAG DSLMIRFRD DTINKKGFHA RYTSTKFQDA LHMKK

```

5 En una realización particular de la ECM de la invención, la proteína BMP1 comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o un 99 % con la SEQ ID NO: 2.

10 El término "identidad" se ha definido en párrafos anteriores. Por lo tanto, dentro del contexto de la presente invención están incluidas variantes de la proteína BMP1 de SEQ ID NO: 2. Aparte de seres humanos, otras fuentes a partir de las que se pueden obtener variantes de la proteína BMP1 incluyen, pero no se limitan a, animales no humanos tales como primates no humanos, cerdos, ratones y ratas entre otros. En una realización más particular, la proteína BMP1 comprende la secuencia SEQ ID NO: 2. La presente invención también incluye fragmentos de la proteína BMP1, siendo considerados dichos fragmentos  
15 variantes de la proteína BMP1. Como se usa en el presente documento, la expresión "fragmento de proteína BMP1" o "fragmento de BMP1" se refiere a un polipéptido que tiene uno o más (varios) aminoácidos delecionados del extremo amino y/o carboxilo terminal de la proteína BMP1; o una secuencia homóloga del mismo; en la que el fragmento tiene actividad de BMP1. Por lo tanto, la presente invención también incluye variantes de la proteína BMP1  
20 que muestran la misma función que la proteína BMP1, es decir escisión de los propéptidos C-terminales del procolágeno I, II, y III. Ensayos para evaluar la actividad de BMP1 de una proteína dada se conocen ampliamente en el estado de la técnica. Ejemplos de ensayos

para medir la actividad de BMP1 incluyen, pero no se limitan a, ensayo de procolágeno (Hartigan, N., Garrigue-Antar, L. y Kadler, K.E. 2003. The Journal of Biochemical Chemistry, 278(20): 18045–18049; ensayo de procesamiento de pro-lisil oxidasa (Uzel MI, Scott IC, Babakhanlou-Chase H, Palamakumbura AH, Pappano WN, Hong HH, Greenspan DS, Trackman PC. J Biol Chem. 2001; 276 (25): 22537-43). Además, para medir la actividad de BMP1 también se pueden usar sustratos comerciales, tal como el Ensayo de BMP-1/PCP Humano Recombinante de R&D Systems.

En una realización particular, la ECM de la invención comprende células productoras de ECM. Existen muchos tipos de células que contribuyen al desarrollo de los diversos tipos de matriz extracelular. Los fibroblastos son el tipo de célula más común en la ECM del tejido conectivo, en la que sintetizan, mantienen y proporcionan un marco estructural; los fibroblastos secretan los componentes precursores de la ECM, incluyendo la sustancia fundamental. Los condrocitos se encuentran en el cartílago y producen la matriz cartilaginosa. Los osteoblastos son responsables de la formación ósea. Por lo tanto, en una realización particular de la ECM de la invención, las células productoras de ECM son fibroblastos, queratinocitos, tenocitos, condrocitos y/o cualquier combinación de los mismos. Las células se obtienen preferentemente a partir de un ser humano vivo; aunque como alternativa se pueden usar donantes humanos o animales recién fallecidos. En otra realización particular, las células productoras de ECM son fibroblastos.

Los fibroblastos se pueden obtener a partir de un tendón del paciente. Por ejemplo, un tendón de *palmaris longus* se podría extraer de un brazo del paciente. Pero para la adición del material de la ECM, los fibroblastos obtenidos se aíslan y se cultivan usando técnicas convencionales, por ejemplo, las células recogidas se pueden cultivar en medio de cultivo F-12 de Hamm, suero de ternero fetal al 10 %, L-glutamina (292  $\mu\text{g}/\text{cc}$ ), penicilina (100  $\text{u}/\text{cc}$ ), estreptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{cc}$ ), y ácido ascórbico (5  $\mu\text{g}/\text{cc}$ ) a 37 °C.

Las células productoras de ECM se pueden modificar genéticamente para producir la enzima LOX, o un fragmento de la misma, y la proteína BMP1, o un fragmento de la misma. En el estado de la técnica se conocen ampliamente métodos para modificar células genéticamente. Por lo tanto, en una realización particular de la ECM de la invención, las células productoras de ECM se modifican genéticamente para producir la enzima LOX recombinante y/o BMP1 recombinante. Esto significa que, en una realización particular, las células productoras de ECM comprenden la sobreexpresión de las secuencias de nucleótidos que codifican la enzima LOX y la proteína BMP1, es decir, aumenta la cantidad de enzima LOX y BMP1 producidas por la célula. Las secuencias de aminoácidos que codifican la enzima LOX y BMP1 se describen más abajo. Como sabe el experto en la



materia, la sobreexpresión de un gen se puede conseguir, por ejemplo, aumentando el número de copias de los genes que codifican la enzima LOX y la proteína BMP1, o expresando estos genes bajo las secuencias reguladoras apropiadas tales como un promotor. En el estado de la técnica se conocen las secuencias de nucleótidos que codifican la enzima LOX y la proteína BMP1 y se pueden recuperar a partir de bases de datos públicas.

En otra realización particular, la ECM puede comprender adicionalmente otras células, por ejemplo células madre, aparte de las que contribuyen comúnmente al desarrollo de la matriz extracelular. La ECM se puede usar como sustrato para cultivar células, tales como, pero no limitadas a, células madre mesenquimales, células de músculo liso y cardiomiocitos. Por lo tanto, en una realización particular de la ECM de la invención, la ECM comprende adicionalmente células madre mesenquimales.

La ECM también puede comprender un “agente bioactivo” o un “compuesto bioactivo”. En el presente documento estos términos se usan para hacer referencia a un compuesto o entidad que altera, inhibe, activa o influye de algún otro modo en procesos biológicos o químicos. Ejemplos de agentes bioactivos pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas o péptidos osteogénicos o condrogénicos, sustancias anticáncer, antibióticos, inmunosupresores, sustancias antivirales, inhibidores enzimáticos, hormonas, neurotoxinas, opioides, sustancias hipnóticas, antihistamínicos, lubricantes, agentes antiespasmódicos y agentes de contracción muscular incluyendo bloqueadores de canales, agentes mióticos y anticolinérgicos, compuestos antiparasitarios y/o antiprotozoarios, moduladores de interacciones entre célula-matriz extracelular incluyendo inhibidores del crecimiento celular y moléculas antiadhesión, agentes vasodilatadores, inhibidores de la síntesis de ADN, ARN o proteínas, agentes antihipertensivos, analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios esteroides y no esteroideos, factores antiangiogénicos, factores angiogénicos, factores antiseoretos, agentes anticoagulantes y/o antitrombóticos, anestésicos locales, prostaglandinas y agentes antidepresivos. En ciertas realizaciones, el agente bioactivo es un fármaco. En ciertas realizaciones, el agente bioactivo es una molécula pequeña. Los agentes bioactivos adicionales incluyen ARN, tales como ARNsi, y factores estimulantes de osteoclastos. En algunas realizaciones, el agente bioactivo puede ser un factor que detiene, secuestra, o reduce la actividad de inhibidores de crecimiento óseo. En algunas realizaciones, el agente bioactivo es un factor de crecimiento, citoquina, molécula de matriz extracelular o un fragmento o derivado de la misma, por ejemplo, una secuencia de unión celular tal como RGD. En una realización en particular, el agente bioactivo se selecciona entre factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), sulfato de dextrano, ascorbato y combinaciones de los mismos. La ECM puede comprender más de un agente bioactivo. Por



lo tanto, en otra realización particular, la ECM comprende adicionalmente un factor de crecimiento y moléculas de matriz extracelular. En una realización más particular, la ECM comprende adicionalmente TGF-beta, sulfato de dextrano y ascorbato, siendo estos agentes bioactivos capaces de estimular la síntesis de componentes de la matriz extracelular. Otros agentes bioactivos capaces de estimular la síntesis de componentes de la matriz extracelular también incluyen citoquinas profibróticas tales como factor alfa de necrosis tumoral (TNF-alfa), péptidos bioactivos tales como angiotensina II o proteínas tales como factor de crecimiento del tejido conector (CTGF). Las moléculas con capacidad para aumentar la densidad del medio extracelular tales como Ficoll™ también pueden estar comprendidas como agentes bioactivos.

Adicionalmente, la ECM de la invención se puede combinar con el aspirado de médula ósea procedente de un autoinjerto, hueso de autoinjerto, preparaciones de células de autoinjerto seleccionadas, células de autoinjerto que contienen genes de estimulación ósea antes de su implantación en un sitio defectuoso.

En una realización particular, la matriz extracelular de la invención comprende una cantidad de colágeno insoluble depositado en la matriz de, al menos,  $3 \mu\text{g}/10^6$  células, más de cuatro veces la cantidad acumulada en ausencia de LOX y BMP1 como se puede observar en la figura 4.

Como se ha explicado al comienzo de la presente descripción, los inventores han descubierto que la realización de cultivos de fibroblastos con sobrenadantes enriquecidos en LOX y BMP1 a partir de líneas de células HEK293 estables aumentaba en gran medida la deposición de colágeno sobre la matriz insoluble a expensas de la fracción soluble en el medio extracelular. Por lo tanto, en una realización particular, la ECM de la invención está descelularizada.

Adicionalmente, en otro aspecto, la presente invención también incluye una ECM descelularizada que comprende un aumento de la cantidad de colágeno en comparación con una ECM que no se ha producido mediante cultivo de fibroblastos con LOX y BMP1. Por lo tanto, la presente invención se refiere a una matriz extracelular descelularizada que comprende la cantidad de colágeno insoluble depositado en la matriz de, al menos,  $3 \mu\text{g}/10^6$  células, más de cuatro veces la cantidad acumulada en ausencia de LOX y BMP1.

### Usos de la invención

Adicionalmente, los autores de la presente invención también han descubierto que la

realización de cultivos de fibroblastos con sobrenadantes enriquecidos en LOX y BMP1 incrementa en gran medida la deposición de colágeno sobre la matriz insoluble a expensas de la fracción soluble en el medio extracelular (Ejemplo 1). Estos resultados apoyan un protocolo conveniente para aumentar la capacidad de los cultivos de células *in vitro* de depositar colágeno en la matriz extracelular, lo cual representa un enfoque prometedor para su aplicación en ingeniería tisular.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un uso *in vitro* de una composición que comprende una lisil oxidasa (LOX), o un fragmento de la misma, y proteína morfogenética ósea 1 (BMP1), o un fragmento de la misma, en lo sucesivo en el presente documento “primer uso de la invención”, para aumentar la síntesis y/o depósito de colágeno en una matriz extracelular.

Las expresiones “Lisil oxidasa” y “proteína morfogenética ósea 1” y fragmentos de la misma se han definido en párrafos anteriores. Como se ha explicado anteriormente, en una realización en particular, la proteína LOX comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o un 99 % con la SEQ ID NO: 1. En otra realización en particular, la proteína BMP1 comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o un 99 % con la SEQ ID NO: 4. El término “identidad” se ha definido anteriormente.

Como se puede observar en los ejemplos de la presente descripción, una composición que comprende la LOX, o un fragmento de la misma, y BMP1, o un fragmento de la misma, en lo sucesivo en el presente documento “composición de la invención”, puede aumentar la síntesis y/o depósito de colágeno en una matriz extracelular. La presente composición, además de comprender las proteínas LOX y BMP1, puede comprender otro tipo de compuestos que favorecen la actividad de LOX y BMP1. Ejemplos de estos compuestos son cualquiera de los agentes bioactivos mencionados anteriormente. Por lo tanto, en una realización en particular, el agente bioactivo se selecciona entre factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), sulfato de dextrano, ascorbato y combinaciones de los mismos. La ECM puede comprender más de un agente bioactivo. Por lo tanto, en otra realización particular, la ECM comprende adicionalmente un factor de crecimiento y moléculas de la matriz extracelular. En una realización más particular, la ECM comprende adicionalmente TGF-beta, sulfato de dextrano y ascorbato.

Para aumentar la síntesis y/o depósito de colágeno en una matriz extracelular, la composición de la invención se puede poner en contacto con las células productoras de ECM y a continuación estas células se pueden depositar sobre una superficie para su cultivo



o, como alternativa, la composición de la invención se puede poner en contacto directamente con una ECM o una superficie como las descritas anteriormente que ya comprenden células productoras de ECM.

5 Los ejemplos de células productoras de ECM, que se pueden cultivar junto con la composición de la invención o que pueden estar presentes en la ECM, incluyen, pero no se limitan a, células de fibroblasto, células de queratinocito, células de tenocito, células de condrocito y/o cualquier combinación de las mismas. Por lo tanto, en una realización en particular, la matriz extracelular comprende células de fibroblasto, células de queratinocito,  
10 células de tenocito, células de condrocito y/o cualquier combinación de las mismas. El medio y las condiciones (pH, medio, temperatura, etc.) para cultivar estas células se conocen ampliamente en el estado de la técnica.

Como se ha explicado anteriormente en la presente invención, los inventores han  
15 descubierto que las matrices obtenidas a partir de fibroblastos regulan la diferenciación adipogénica y osteogénica de células madre mesenquimales (MSC) humanas, y que este efecto se moduló con LOX y BMP1 (véase el Ejemplo 2). Estos resultados proporcionaron evidencias de que las matrices obtenidas a partir de fibroblastos son capaces de regular la diferenciación adipogénica y osteogénica de MSC humana, una potente herramienta celular  
20 en medicina regenerativa.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un uso *in vitro* de la matriz extracelular de la invención, en lo sucesivo en el presente documento “segundo uso de la invención”, para regular la diferenciación de células madre, preferentemente células  
25 madre mesenquimales, en la que la ECM está descelularizada.

Como se usa en el presente documento, el término “que regula” o “regula” se refiere al control de la capacidad de las células madre para diferenciarse a un tipo de célula más especializada. En biología de desarrollo, la diferenciación celular es el proceso por el que  
30 una célula cambia de un tipo celular a otro. Como sabe el experto en la materia, las células madre son una clase de células no diferenciadas que son capaces de diferenciarse a tipos de células especializadas. En una realización particular de la presente invención, la célula madre cuya diferenciación está regulada por la ECM de la invención es una célula madre mesenquimal. Las células madre mesenquimales o del estroma son una población de  
35 células del estroma, presentes en la médula ósea, tejido adiposo y la mayoría de los tejidos conectivos, capaces de diferenciación en tejidos mesenquimales tales como tejido adiposo (adipogénesis), tejido óseo (osteogénesis) y cartílago (condrogénesis). La ECM de la invención se puede usar para cultivar las MSC y regular su diferenciación en células de



tejido adiposo, óseo y cartilaginoso. En una realización particular del segundo uso de la invención, la diferenciación adipogénica y/u osteogénica de células madre mesenquimales está regulada por la ECM de la invención, en la que la ECM está descelularizada. En una realización más particular, la diferenciación de células madre mesenquimales se reduce o se

5 inhibe con la ECM de la invención, en la que la ECM está descelularizada.

En la presente descripción, se considera que “la diferenciación de células madre mesenquimales se reduce” o “la diferenciación de células madre mesenquimales se inhibe” cuando más de un 50 %, preferentemente más de un 60 % de toda la población celular de

10 células madre mesenquimales no se diferencia en tejidos mesenquimales.

Como se usa en el presente documento, el término “descelularizada” se refiere al proceso usado en ingeniería biomédica para aislar la ECM de sus células residentes, dejando un armazón de ECM. El experto en la materia es capaz de eliminar las células

15 dentro de la ECM sin dañar a los componentes extracelulares. Para retirar las células de una ECM se pueden usar métodos físicos, químicos y enzimáticos. Los métodos físicos más comunes usados para lisar, eliminar, y retirar células de la matriz de un tejido son el uso, por ejemplo, de temperatura, fuerza y presión, o estimulación eléctrica. Como alternativa a los métodos físicos, se puede seleccionar una combinación apropiada de agentes químicos

20 para la descelularización dependiendo del grosor, composición de la matriz extracelular, y del uso para el cual esté destinada la ECM. Los agentes químicos usados para eliminar y retirar las células incluyen, pero no se limitan a, ácidos, tratamientos alcalinos, detergentes iónicos, detergentes no iónicos, y detergentes zwitteriónicos. El detergente iónico, dodecil sulfato sódico (SDS), se usa comúnmente debido a su elevada eficacia para lisar células sin

25 dañar significativamente la ECM. Los detergentes actúan de manera eficaz para lisar la membrana celular y exponer los contenidos a degradación adicional. Después de que el SDS lisa la membrana celular, endonucleasas y exonucleasas degradan los contenidos genéticos, mientras que otros componentes de la célula se solubilizan y se retiran de la matriz mediante lavado. Los tratamientos alcalinos y ácidos pueden ser compañeros

30 eficaces con un tratamiento con SDS debido a su capacidad para degradar ácidos nucleicos y solubilizar inclusiones citoplasmáticas. El detergente no iónico mejor conocido es Triton X-100, que es popular debido a su capacidad para alterar las interacciones entre lípidos y entre lípidos y proteínas. El Triton X-100 no altera las interacciones proteína-proteína, que son beneficiosas para mantener la ECM intacta. El EDTA es un agente quelante que se une

35 al calcio, que es un componente necesario para que las proteínas interactúen entre sí. Haciendo que no haya disponibilidad de calcio, el EDTA evita que las proteínas que actúan de puentes entre células se puedan unir entre sí. El EDTA a menudo se usa con tripsina, una enzima que actúa como una proteasa para romper los enlaces ya existentes entre

proteínas integrales de células vecinas dentro de un tejido. En conjunto, la combinación de EDTA-tripsina forma un buen equipo para la descelularización de la ECM. Las enzimas usadas en tratamientos de descelularización se usan para romper los enlaces e interacciones entre ácidos nucleicos, células que interactúan a través de proteínas vecinas, y otros componentes celulares. Lipasas, termolisina, galactosidasa, nucleasas, y tripsina, todas se han usado en la retirada de células. Después de lisar una célula con un detergente, ácido, presión física, etc., endonucleasas y exonucleasas pueden comenzar la degradación del material genético.

10 Dentro del contexto de la presente invención, también está incluido el uso de la ECM de la invención para seleccionar medicamentos en el tratamiento de enfermedades, así como el uso de la ECM de la invención como un material de soporte para regenerar un tejido biológico.

#### 15 Métodos de la invención

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para obtener una matriz extracelular de la invención, en lo sucesivo en el presente documento “primer método de la invención”, que comprende incubar las células productoras de ECM en presencia de una composición que comprende una lisil oxidasa (LOX), o un fragmento de la misma, y proteína morfogenética ósea 1 (BMP1), o un fragmento de la misma, o cultivar células productoras de ECM modificadas genéticamente para producir una enzima LOX, o un fragmento de la misma, y/o BMP1, o un fragmento de la misma.

25 El primer método de la invención comprende la incubación de células en presencia de una composición que comprende proteínas LOX y BMP1 o un fragmento de las mismas. En el estado de la técnica se conocen ampliamente métodos y medios para incubar células. Un ejemplo de estos métodos se puede encontrar en los ejemplos ilustrativos de la presente invención. En resumen, las células productoras de ECM se incuban en medio DMEM (pH 7.4) sin suero ni rojo fenol, y a continuación se añade sulfato de dextrano y ascorbato en presencia o ausencia de TGF-beta durante 4 días a 37°C.

Además, la composición que comprende adicionalmente proteínas LOX y BMP1 también puede comprender un “agente bioactivo” o un “compuesto bioactivo”. En el presente documento estos términos se usan para hacer referencia a un compuesto o entidad que altera, inhibe, activa o influye de otro modo en procesos biológicos o químicos. En la presente descripción se han mencionado anteriormente ejemplos de agente bioactivo.



En una realización particular del primer método de la invención, la proteína LOX comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o un 99 % con la SEQ ID NO: 1. En una realización particular del primer método de la invención, la proteína BMP1 comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o un 99 % con la SEQ ID NO: 2. Estas realizaciones en particular, así como los términos y expresiones usados, se han explicado y definido en aspectos inventivos previos de la presente invención.

En otra realización particular, las células productoras de ECM son fibroblastos, queratinocitos, tenocitos, condrocitos y/o cualquier combinación de las mismas. En otra realización particular, las células productoras de ECM se modifican genéticamente para producir la enzima LOX, o un fragmento de la misma, y/o BMP1 o un fragmento de la misma.

Después de haber incubado las células con la composición que comprende proteínas LOX y BMP1, se puede permitir que estas a continuación formen una ECM en cultivo tisular o, después de sembrarlas sobre un armazón. En el primer método de la invención para producir la ECM, las células se pueden exponer a varios factores o compuestos para estimular la producción de dicha ECM. Una vez que se produce la ECM, ésta se puede aislar mediante técnicas bien conocidas en el estado de la técnica. La ECM obtenida de ese modo muestra un aumento del depósito de colágeno con respecto a otra ECM cuyas células no se han incubado con una combinación de proteínas LOX y BMP1.

Como alternativa, el primer método de la invención puede comprender el cultivo de células productoras de ECM modificadas genéticamente para producir la enzima LOX y/o BMP1. En la presente descripción se han descrito previamente ejemplos de métodos para modificar genéticamente células.

Como consecuencia de la puesta en práctica del primer método de la invención, se obtiene una ECM. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a una ECM obtenida con el primer método de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para regular la diferenciación de células madre, preferentemente células madre mesenquimales, en lo sucesivo en el presente documento “segundo método de la invención”, que comprende cultivar las células madre, preferentemente células madre mesenquimales (MSC), en la matriz extracelular de la invención, en la que la ECM está descelularizada. El término “descelularizado” se ha descrito en párrafos anteriores.



Los sustratos para investigación de cultivo celular convencional incluyen plástico, vidrio, y filtros microporosos (por ejemplo, celulósicos, nailon, fibra de vidrio, poliestireno, poliéster, y policarbonato). Los sustratos para bio-reactores usados en cultivo celular discontinuo o continuo o en ingeniería genética incluyen tubos de fibras huecas o micropartículas. En algunas realizaciones, el sustrato/recipiente puede estar fabricado con cualquier material adecuado capaz de permitir que los componentes de la matriz extracelular se adsorban o se unan a al menos una superficie del sustrato o recipiente. Los materiales de este tipo pueden incluir los siguientes: celulosa, poliestireno, policarbonato, politetrafluoroetileno, nailon, vidrio, tereftalato de polietileno, polimetilpentano, polipropileno, polietileno y combinaciones de los mismos. Otros materiales que se pueden usar incluyen PermanoX®, poliéster, poliamida, poliimida, y materiales a base de sílice, incluyendo recipientes de vidrio y similares. También se pueden usar combinaciones de cualquiera de los materiales mencionados anteriormente. Estos materiales pueden ser porosos o no porosos

El medio usado para cultivar las células madre, preferentemente células madre mesenquimales, es un medio de cultivo celular acondicionado o definido. En una realización, el medio es medio condicionado de MEF suplementado con factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). El bFGF puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 4 a aproximadamente 20 ng/ml en el medio. No obstante, se observa que el método de cultivo no está limitado a este medio de cultivo. Se ha descrito que un gran número de medios son compatibles con el cultivo de células MSC.

A modo ilustrativo, el medio condicionado se puede preparar cultivando fibroblastos embrionarios de ratón primario irradiados o inactivados con mitomicina C en un medio de sustitución de suero tal como, por ejemplo, DMEM, K/O DMEM, o DMEM/T12 que contiene 4 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). Usualmente, el sobrenadante del cultivo se recoge después de 1 día a 37 °C, y se suplementa con factores de crecimiento adicionales, incluyendo bFGF. De forma más específica, a partir de los siguientes componentes se pueden preparar medios de cultivos sin alimentador, de base adecuada: medio de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM), medio de Eagle modificado con Dulbecco para desactivación genética (KG DMEM), medio basal de Ham F12/DMEM al 50 % (*Ham's F12/50% DMEM basal medium*); L-glutamina 200 mM, solución de aminoácidos no esenciales,  $\beta$ -mercaptoetanol, factor de crecimiento de fibroblastos básico recombinante humano (bFGF).

A continuación, el medio/medios se combina/n con las células usadas para condicionamiento en un entorno que permite que las células liberen en el medio los componentes que mantienen células madre. Opcionalmente, las células se pueden inactivar

(es decir, hacer incapaces de replicación sustancial) mediante radiación (por ejemplo, aproximadamente 4.000 rads), tratamiento con un inactivador químico como mitomicina C, o mediante cualquier otro método eficaz. La inactivación de las células no es necesaria en casos en los que el medio se separa de las células condicionadas antes de su uso en cultivos de células madre. Las células se cultivan en el medio durante un periodo de tiempo suficiente para permitir una concentración adecuada de los factores liberados (o consumo de componentes del medio) para producir un medio que facilite el cultivo de células madre embrionarias sin diferenciación. Por lo general, el medio acondicionado mediante cultivo durante 24 h a 37 °C produce un medio que permite el cultivo de células madre durante 24 horas. Sin embargo, el periodo de cultivo se puede ajustar hacia arriba o hacia abajo, determinando por vía empírica (o mediante ensayos de la concentración de factores esenciales) qué constituye un periodo adecuado.

Las células madre, preferentemente células madre mesenquimales, se pueden sembrar sobre la ECM de la invención en una distribución adecuada y en presencia del medio condicionado.

Una manera conveniente para determinar si las MSC se están diferenciando es seguir las características morfológicas de las colonias. Por ejemplo, los elementos distintivos morfológicos característicos de las MSC no diferenciadas son conocidos por el experto en la materia, e incluyen una proporción nuclear/citoplasmática elevada, nucléolos prominentes, y formación de colonias compactas con uniones celulares poco discernibles. Durante el pase, algunas células se pueden diferenciar (en particular cuando se siembran como células individuales, o cuando se permite que se formen grandes grupos). Sin embargo, por lo general los cultivos vuelven a establecer una proporción más grande de células no diferenciadas durante el periodo de cultivo. De forma ideal, las células propagadas tendrán un tiempo de duplicación no superior a aproximadamente 20-40 horas.

La presente invención también se refiere a un método para mantener y expandir células madre, preferentemente células madre mesenquimales, en cultivo en un estado no diferenciado, método que comprende cultivar las células madre mesenquimales en la matriz extracelular de la invención en la que la ECM está descelularizada.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para aumentar el depósito de colágeno en una matriz extracelular, en lo sucesivo en el presente documento "tercer método de la invención", que comprende cultivar células en presencia de una composición que comprende una lisil oxidasa (LOX) y proteína morfogenética ósea 1 (BMP1), o cultivar células productoras de ECM modificadas genéticamente para producir la



enzima LOX y/o BMP1.

En una realización particular del tercer método de la invención, la proteína LOX comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o un 99 % con la SEQ ID NO: 1.

En una realización particular del tercer método de la invención, la proteína BMP1 comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o un 99 % con la SEQ ID NO: 2.

En una realización particular, las células productoras de ECM son fibroblastos, queratinocitos, tenocitos, condrocitos y/o cualquier combinación de las mismas.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente entiende alguien con una experiencia habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. En la práctica de la presente invención se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento. A través de la descripción y las reivindicaciones, el término "comprender" y sus variaciones no pretenden excluir otras características, aditivos, componentes, o etapas. Los objetos, ventajas y características adicionales de la invención llegarán a ser evidentes para las personas con experiencia en la materia después del examen de la descripción o se pueden aprender con la práctica de la invención. Los ejemplos y figuras que siguen a continuación se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar la presente invención.

25

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1. Estimulación de la síntesis de colágeno dependiente del tiempo y deposición en fibroblastos incubados con y sin TGF- $\beta$ 1. A) Colágeno soluble en el sobrenadante. B) Fracción de colágeno solubilizado por pepsina asociada a la monocapa celular. C) Colágeno insoluble depositado en la matriz. Las fracciones de colágeno se determinaron a partir de células incubadas de 1 a 4 días en ausencia (barras de color blanco) o presencia de 5 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 (barras de color negro) como se describe en Materiales y Métodos. Los valores se representan como  $\mu$ g de colágeno por millón de células (valor medio  $\pm$  SEM, n = 6; \*P < 0,05 o \*\*P < 0,01 con respecto a un día en ausencia de TGF- $\beta$ 1, y <sup>#</sup>P < 0,05 con respecto al valor del tiempo correspondiente en ausencia de TGF- $\beta$ 1).



Figura 2. Generación de células HEK293 que sobreexpresan formas secretadas y activas de proteínas LOX y BMP1. Inducción de proteínas LOX (A) y BMP1 (B) en células HEK293 después de incubación con el análogo de tetraciclina, doxiciclina, a 10  $\mu$ M tal como se evalúa mediante inmunotransferencia usando extractos totales (panel izquierdo) o alícuotas del sobrenadante celular concentradas con Amicon (panel derecho). C) La combinación de sobrenadantes celulares que contienen proteínas LOX y BMP1 da lugar a la activación proteolítica de LOX tal como se evalúa mediante inmunotransferencia. Las transferencias mostradas corresponden a experimentos representativos realizados dos veces con dos preparaciones independientes. Las bandas inmunorreactivas de LOX se cuantificaron a partir de los resultados que se muestran en el panel C y se expresaron como porcentaje del total: precursor de 50 KDa (círculo abierto), forma activa de 30 KDa (círculo cerrado), y banda desconocida de 25 KDa (cuadrados abiertos). D) Actividad enzimática de LOX tal como se mide usando un ensayo de rojo Amplex en sobrenadantes celulares a partir de células no inducidas (Basal, barra de color blanco), inducidas y sin BMP1 (Solo LOX, barra cerrada), o inducidas y combinadas con sobrenadantes de BMP1 durante 5-60 minutos (LOX+BMP1, barras cerradas). Los valores se representan como unidades arbitrarias de fluorescencia (valor medio  $\pm$  SEM, n = 6; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01).

Figura 3. Inmunorreactividad de LOX en los sobrenadantes de cultivos de fibroblastos suplementados con medios condicionados que contienen LOX y BMP1. Los sobrenadantes de LOX, BMP1 o ambos LOX/BMP1 se añadieron a cultivos de fibroblastos en presencia (T) o ausencia (basal, B) de TGF- $\beta$ 1, y la inmunorreactividad de LOX se evaluó mediante inmunotransferencia tanto al inicio del experimento (A, un día) como al final (B, cuatro días). Las transferencias que se muestran corresponden a experimentos representativos realizados dos veces con dos preparaciones independientes.

Figura 4. Efecto del suplemento con sobrenadantes de LOX/BMP1 en la deposición de colágeno a partir de cultivos de fibroblastos. Las fracciones de colágeno como se midieron en la Figura 2 se analizaron en fibroblastos expuestos a medios condicionados a partir de células de control o células que sobreexpresan LOX y BMP1 y se incubaron con y sin TGF- $\beta$ 1 durante 4 días. A) Colágeno soluble en el sobrenadante. B) Fracción de colágeno solubilizado por pepsina asociada con la monocapa celular. C) Colágeno insoluble depositado en la matriz. D) Niveles de entrecruzamiento de piridinolina obtenida a partir de LOX (PYD) en la matriz depositada por cultivos de fibroblastos expuestos a medios condicionados tal como se evaluó mediante ELISA específico. Los valores se representan como  $\mu$ g de colágeno o concentración de PYD por millón de células (medio  $\pm$  SEM, n = 6; \*P < 0,05 con respecto a los valores del control correspondiente con TGF- $\beta$ 1).

Figura 5. Inmunorreactividad de colágeno de tipo I en los sobrenadantes de cultivos de fibroblastos suplementados con medios condicionados que contienen LOX y BMP1. Los cultivos de fibroblastos se expusieron a sobrenadantes control o con LOX/BMP1 en presencia (T) o ausencia (B) de TGF- $\beta$ 1 durante 4 días y la inmunorreactividad del colágeno de tipo I se evaluó mediante inmunotransferencia tal y como se describe en Materiales y Métodos. La inmunorreactividad específica del colágeno de tipo I se detectó como una banda inducida por TGF- $\beta$ 1 de aproximadamente 150 KDa. Las transferencias que se muestran corresponden a experimentos representativos realizados dos veces con dos preparaciones independientes.

5  
10

Figura 6. Análisis de inmunofluorescencia de deposición de colágeno de tipo I a partir de cultivos de fibroblastos expuestos a sobrenadantes de LOX/BMP1. Los fibroblastos expuestos a sobrenadantes control o con LOX/BMP1 e incubados en presencia de TGF- $\beta$ 1 durante 4 días se procesaron para análisis de inmunofluorescencia de colágeno de tipo I tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las microfotografías mostradas corresponden a resultados representativos de tinción para colágeno de tipo I (columna izquierda) y núcleos usando DAPI (columna derecha) realizada dos veces con dos preparaciones independientes.

15

Figura 7. Detección de inmunofluorescencia de colágeno I depositado en matrices descelularizadas de fibroblastos expuestos a sobrenadantes de LOX/BMP1. Las monocapas de fibroblastos expuestas a sobrenadantes de control o de LOX/BMP1 en presencia de TGF- $\beta$ 1 durante 4 días se descelularizaron antes de su procesamiento para análisis de inmunofluorescencia de colágeno de tipo I como se describe en Materiales y Métodos. Las microfotografías mostradas corresponden a resultados representativos de tinción para colágeno de tipo I (columna izquierda) realizada dos veces con dos preparaciones independientes. La ausencia de tinción con DAPI confirmó la eficacia del procedimiento de descelularización.

20

25

Figura 8. Diferenciación adipogénica de MSC humanas sembradas en matrices descelularizadas de fibroblastos expuestos a sobrenadantes de LOX/BMP1. La capacidad adipogénica se evaluó mediante examen microscópico (A) y se cuantificó mediante análisis espectrofotométrico (B) usando tinción con Rojo Aceite O en MSC humana sembradas sin matriz, con la matriz de los fibroblastos estimulados con TGF- $\beta$  expuesta a medio de control o con LOX/BMP1. Las microfotografías mostradas corresponden a resultados representativos de tinción realizados dos veces con dos preparaciones independientes. Los valores se representan como absorbancia a 540 nm (medio  $\pm$  SEM, n = 6; \*P < 0,05 con respecto a experimentos sin matriz, y <sup>#</sup>P < 0,05 con respecto a matriz obtenida a partir de

30

35



fibroblastos de matriz en medio control).

Figura 9. Diferenciación osteogénica de MSC humanas sembradas en matrices descelularizadas de fibroblastos expuestos a sobrenadantes de LOX/BMP1. La capacidad de MSC humanas para diferenciarse a osteoblastos en sustratos sin matriz, con matriz de fibroblastos estimulados con TGF- $\beta$ 1 expuestos a medio control o con LOX/BMP1 se evaluó mediante examen microscópico (A) y se cuantificó mediante espectrofotometría (B) usando tinción con Rojo de Alizarina S. Las microfotografías mostradas corresponden a resultados representativos de tinción realizados dos veces con dos preparaciones independientes. Los valores se representan como absorbancia a 405 nm (medio  $\pm$  SEM, n = 6; \*P < 0,05 con respecto a experimentos sin matriz, y <sup>#</sup>P < 0,05 con respecto a una matriz obtenida a partir de fibroblastos bajo medio control).

## EJEMPLOS

15

### I. MATERIAL Y MÉTODOS

#### Cultivo celular de fibroblastos

La línea celular CCD-19Lu de fibroblastos humanos (ATCC) se mantuvo en medio de cultivo como ya se ha descrito (Puig *et al.*, 2015, *Molecular Cancer Research* 13, 161-173). Para análisis de colágeno, los fibroblastos se sembraron en placas de 100 mm en medio de cultivo sin suero ni rojo fenol pero que contenía 100  $\mu$ g/ml de sulfato de dextrano de 500 KDa (DxS) y 29  $\mu$ g/ml de 2-fosfato de ácido L-ascórbico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), hasta cuatro días en ausencia o presencia de 5 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 (R&D Systems, Minneapolis, MN).

25

#### Análisis de colágeno

Al final del tiempo experimental, los medios de cultivo se recogieron y el colágeno soluble se midió después de concentración con el Ensayo de Colágeno Soluble Sircol (Biocolor, Carrickfergus, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las capas de células se rasparon, se extrajeron durante una noche con tampón basado en ácido (ácido acético 0,5 M), y los sedimentos resultantes se digirieron con 0,5 mg/ml de pepsina (Sigma-Aldrich) en HCl 10 mM. Las fracciones solubilizadas correspondientes se analizaron para colágeno con Sircol. El colágeno insoluble después de digestión con pepsina se hidrolizó a 100°C durante 16 horas con HCl 12 M, se neutralizó con NaOH y se analizó con el ensayo de hidroxiprolina usando colágeno de tipo I hidrolizado como patrón (Kesava Reddy y Enwemeka, 1996, *Clinical Biochemistry* 29, 225-229.). Las fracciones hidrolizadas también se evaluaron para el contenido del entrecruzamiento de piridinolina (PYD) usando un kit de

35



ELISA disponible comercialmente (Quidel, Athens, OH).

El colágeno soluble en el sobrenadante también se analizó mediante inmunotransferencia usando un anticuerpo específico anti-colágeno  $\alpha 1$  de tipo I (sc-8784, Santa Cruz, Dallas, Texas) después de fraccionamiento de proteínas en geles de electroforesis en dodecil sulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) siguiendo protocolos que se han descrito previamente (Busnadiago *et al.*, 2013, *Molecular and Cellular Biology* 33, 2388-2401).

#### 10 **Generación de clones de células HEK293 que sobreexpresan LOX y BMP1**

Una construcción de LOX humana de longitud completa en vector pYX-Asc se obtuvo a partir de Imagenes GmbH (Berlín, Alemania). Una construcción de BMP1 humana de longitud completa en vector pBabe fue proporcionada amablemente por Víctor L. Ruiz-Pérez (Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Madrid, España) (Martínez-Glez *et al.*, 2012, *Human Mutation* 33, 343-350). Ambas construcciones se clonaron en el vector pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen, Carlsbad, CA), para obtener los correspondientes plásmidos de pcDNA5/FRT/TO-LOX y –BMP1. A continuación estas construcciones se co-transfectaron con el plásmido pOG44 de expresión de Flp recombinasa en la línea de células Flp-In T-REx 293 usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Estas células expresan de forma estable el represor Tet y contienen un único sitio de interacción FRT (diana de recombinación de Flp). La expresión de la Flp recombinasa a partir del vector pOG44 promueve la inserción de los casetes de ADNc en el sitio FRT del genoma a través de recombinación de ADN específica de sitio. Después de 48 horas, las células se seleccionaron mediante resistencia a higromicina B (Roche Diagnostics, Barcelona, España), y aparecieron clones después de 10–15 días. Los clones isogénicos se expandieron y la expresión del trasgén se analizó después de 48 horas de incubación en ausencia o presencia del análogo de tetraciclina, doxiciclina a 10  $\mu$ M. Los medios de cultivo se concentraron usando unidades de filtro Amicon Ultra-4 (Ultra-Cel 10K, Millipore, Cork, Irlanda). Los niveles de proteína LOX y BMP1 en capas celulares o sobrenadantes concentrados se detectaron mediante inmunotransferencia usando anticuerpos específicos contra LOX (ab31238, Abcam, Cambridge, Reino Unido) y BMP1 (AF1927, R&D Systems). La actividad enzimática de LOX se determinó usando un ensayo de Abcam disponible comercialmente.

#### 35 **Estudios de inmunofluorescencia**

La microscopía de fluorescencia se realizó tal y como se ha descrito anteriormente (Lagares *et al.*, 2012). En resumen, las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio de 10 mm de diámetro (N.º 1,5) en placas de cultivo de 35 mm (Mattek, Ashland, MA).

Después del tratamiento correspondiente, las células se fijaron con metanol frío durante 5 minutos, se bloquearon con BSA al 1 % en solución tamponada con fosfato (PBS) durante 1 h, y a continuación se incubaron durante una noche a 4 °C con anticuerpo anti-colágeno  $\alpha 1$  de tipo I (Santa Cruz), seguido de los correspondientes anticuerpos secundarios fluorescentes. La fluorescencia celular se visualizó mediante microscopía con un Eclipse T2000U de Nikon (Nikon, Amstelveen, Países Bajos).

Para análisis de la matriz depositada a partir de células, la descelularización se realizó mediante incubación con un tampón de extracción que contenía Triton X-100 al 0,5 % (v/v) y  $\text{NH}_4\text{OH}$  20 mM en PBS durante 3-5 minutos como se ha descrito previamente (Cukierman, 2001, Preparation of Extracellular Matrices Produced by Cultured Fibroblasts, Current Protocols in Cell Biology. John Wiley & Sons, Inc.).

### **Análisis de diferenciación adipogénica y osteogénica de células madre mesenquimales humanas**

Las células madre mesenquimales (MSC) humanas (Promocell, Heidelberg, Alemania) se mantuvieron en cultivo en medio basal (Promocell) y a continuación se indujeron para adipogénesis y osteogénesis con los correspondientes medios de diferenciación (Promocell) durante 21 días con cambio de medio cada 2-3 días. Los cambios fenotípicos inducidos por diferenciación de linaje, es decir, la formación de vesículas de lípidos para adipogénesis y la deposición extracelular de fosfato cálcico para osteogénesis, se monitorizaron mediante tinción con Rojo Aceite O y Rojo de Alizarina S (Santa Cruz), respectivamente, tal y como se ha descrito previamente (Brueedigam *et al.*, 2007, Basic Techniques in Human Mesenchymal Stem Cell Cultures: Differentiation in Osteogenic and Adipogenic Lineages, Genetic Perturbations, and Phenotypic Analyses, Current Protocols in Stem Cell Biology. John Wiley & Sons, Inc.). La diferenciación se evaluó mediante examen microscópico y se cuantificó mediante análisis espectrofotométrico después de solubilización del colorante.

### **Análisis Estadístico**

Los datos experimentales se analizaron usando el ensayo *t* de Student para muestras no relacionadas o independientes en el caso de distribución normal de datos o usando ensayos no paramétricos cuando fue apropiado. Los valores de *P* obtenidos se indican en las leyendas de las figuras cuando son estadísticamente significativos ( $P < 0,05$ ).



## II. RESULTADOS

**Ejemplo 1:** La composición que comprende Lisil oxidasa (LOX) y proteína morfogenética ósea 1 (BMP1) produce un fuerte aumento de la deposición de colágeno *in vitro*.

**La deposición de colágeno *in vitro* es lenta y tiene baja eficiencia.**

Los inventores han estudiado la síntesis y deposición de colágeno en cultivos de células de fibroblasto de pulmón humano (CCD19-Lu) en condiciones basales o incubadas con la citoquina profibrótica factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ 1) durante periodos de tiempos que varían de uno a cuatro días (Figura 1). Varias fracciones de colágeno se pueden extraer de los cultivos que representan las etapas secuenciales en el proceso biosintético. Los sobrenadantes celulares se evaluaron para la forma soluble del colágeno secretado. Para extraer el colágeno no entrecruzado, recientemente depositado, en monocapas de células se usó tampón a base de ácido. A continuación se usó un tratamiento con pepsina para digerir por vía proteolítica los segmentos de telopéptido sin colágeno, y de ese modo, solubilizar el colágeno recientemente entrecruzado. Para determinar el colágeno que se hace soluble con estos procedimientos se usó un ensayo colorimétrico basado en rojo Sirio (Sircol). Por último, el colágeno insoluble en los sedimentos celulares se hidrolizó con ácido fuerte y calor, y la hidroxiprolina se midió como una estimación del colágeno fuertemente entrecruzado. Como se muestra en la Figura 1A, el colágeno soluble se acumuló progresivamente en sobrenadantes celulares de fibroblastos incubados en condiciones basales, y este efecto aumentó adicionalmente en células estimuladas con TGF- $\beta$ 1. A pesar de esta tasa de síntesis y acumulación de colágeno soluble, la deposición en la matriz tanto como formas solubles o insolubles de pepsina solamente aumentó ligeramente en células incubadas durante cuatro días con TGF- $\beta$ 1 (Figura 1B y Figura 1C). El tampón ácido solubilizó cantidades insignificantes de colágeno, lo que indica que esta combinación no es estable en las condiciones experimentales de los inventores (datos no mostrados). En general, estos resultados indican que, a pesar de una producción y secreción activas de precursores de colágeno, la deposición *in vitro* es un proceso que no se ve favorecido, incluso en condiciones de “agregación macromolecular” (*macromolecular crowding*), tales como las estudiadas en el estudio de los inventores.

**Generación de líneas de células HEK293 que sobreexpresan lisil oxidasa (LOX) y proteína morfogenética ósea 1 (BMP1)**

Varias evidencias en la bibliografía sugieren que una conversión incompleta de procolágeno por la proteína morfogenética de C-proteinasa/ósea 1 (BMP1) limita de forma significativa la deposición de colágeno *in vitro*. Entre varios sustratos de matriz (y no matriz),



BMP1 también cataliza la conversión proteolítica del precursor de la lisil oxidasa (LOX) para producir su forma activa, estimulando de ese modo la etapa inicial en el proceso de entrecruzamiento de colágeno. Los inventores presentaron la hipótesis de que la adición de LOX y/o BMP1 puede representar una estrategia para estimular la deposición de colágeno *in vitro*. Para este fin, los inventores generaron clones de células HEK293 que expresan de forma estable construcciones de LOX y BMP1 bajo el control dependiente de tetraciclina. Como se muestra en la Figura 2A, los transfectantes de LOX expresaban y secretaban al medio extracelular varias bandas inmunorreactivas para LOX, incluyendo el precursor de aproximadamente 50 KDa, y bandas más cortas de 25 KDa y 30 KDa. En un enfoque similar, los transfectantes de BMP1 mostraban expresión sensible a doxiciclina y secreción de una mezcla compleja de formas de BMP1 que variaba de 60-100 KDa, lo que probablemente representa formas precursoras y procesadas (Figura 2B). La presencia en células que sobreexpresan LOX de la banda de 50 KDa de LOX indica una capacidad limitada de las células para procesar y activar la enzima. De forma interesante, la incubación de sobrenadantes celulares que contenían LOX con aquellos conteniendo BMP1 estimuló la proteólisis del precursor pro-LOX a la forma activa de 30 KDa de una manera dependiente del tiempo (Figura 2C y D). La forma más corta de LOX de 25 KDa no se modificó por la acción de BMP1. La actividad enzimática de LOX se evaluó en un ensayo fluorométrico usando sobrenadantes de células basales e incubadas con doxiciclina. Como se muestra en la Figura 2E, la inducción de la expresión de LOX estimuló un fuerte aumento de la actividad enzimática de LOX, que a su vez aumentó adicionalmente después de incubación con sobrenadantes de BMP1 de una manera dependiente del tiempo. En su conjunto, los inventores tuvieron éxito en la generación de sistemas celulares basados en HEK293 para producir sobrenadantes enriquecidos con enzimas LOX y BMP1 que, cuando se combinan, promovieron *in vitro* la activación proteolítica de LOX.

### **La adición de lisil oxidasa (LOX) y proteína morfogenética ósea 1 (BMP1) produce un fuerte aumento de la deposición de colágeno *in vitro***

En primer lugar los inventores comprobaron la activación proteolítica de LOX en fibroblastos expuestos a sobrenadantes. Como se muestra en la Figura 3A, los fibroblastos incubados durante un día solamente con sobrenadantes de LOX presentaban una cantidad significativa del precursor de LOX sin procesar, lo que indica de nuevo una capacidad celular limitada para procesar la proenzima *in vitro*. Por el contrario, la combinación de LOX y BMP1 recombinantes daba como resultado una proteólisis completa de la pro-LOX. La presencia de formas procesadas de LOX en fibroblastos incubados con BMP1 solo indicaba que la proteasa estimulaba el procesamiento de LOX producido de forma endógena. No se observaron bandas de LOX detectables en fibroblastos expuestos a medio control. Después de cuatro días de incubación con sobrenadantes, la conversión proteolítica de la enzima pro-

LOX fue completa, incluso en ausencia de BMP1 añadida (Figura 3B). De forma interesante, la inmunorreactividad de LOX fue menor en sobrenadantes de LOX/BMP1 que las de LOX solo (tanto a un día como cuatro días), así como en LOX (o LOX/BMP1) a un día en comparación con las muestras correspondientes a los cuatro días, lo que indica que en cuanto se generan las formas procesadas de LOX, se degradan o se retienen en la matriz. A continuación, los inventores estudiaron el efecto de estos sobrenadantes en la síntesis y deposición del colágeno. Como se muestra en la Figura 4A, a diferencia de células expuestas a medio control, la incubación de fibroblastos con sobrenadantes celulares que contenían tanto LOX, BMP1 o una mezcla de ambas anulaba la acumulación de colágeno soluble en el medio extracelular, tanto en ausencia como en presencia de TGF- $\beta$ 1, un efecto que se confirmó adicionalmente mediante inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-col1 $\alpha$ 1 (Figura 5). De forma simultánea con esta reducción drástica, se encontró que las fracciones tanto solubles como insolubles por pepsina de células tratadas con TGF- $\beta$ 1 aumentaron de forma significativa, siendo más elevadas en células incubadas con la mezcla de LOX/BMP1 que con cualquiera de LOX o BMP1 solas, una observación que sugiere una acción sinérgica para el efecto de ambas enzimas (Figura 4B y C). La enzima LOX cataliza la deaminación oxidativa de restos de lisina/hidrolisina telopeptídicos para producir aldehídos altamente reactivos que reaccionan adicionalmente para formar entrecruzamientos permanentes inmaduros y a continuación maduras. El uso preferente de hidroxilisina con respecto a lisina en reacciones de entrecruzamiento determina un patrón distintivo en los productos de maduración, con niveles más elevados de piridinolinas que de pirroles, como se encuentra normalmente en cartílago, hueso o aorta. Los sedimentos insolubles en pepsina hidrolizada se sometieron a ensayo con un ELISA específico para la presencia de entrecruzamientos de piridinolina (PYD). Como se muestra en la Figura 4D, en comparación con el control, la exposición de fibroblastos a sobrenadantes de LOX y/o BMP1 estimuló la formación de entrecruzamientos de PYD, lo que indica que una parte significativa del colágeno depositado se forma a través de esta ruta de maduración.

Además los inventores analizaron el efecto de sobrenadantes que contenían LOX y BMP1 mediante análisis de inmunofluorescencia usando un anticuerpo anti-col1 $\alpha$ 1. Como se muestra en la Figura 6, los fibroblastos expuestos a medio control presentaron inmunorreactividad de colágeno de tipo I en forma de agregados pequeños y grandes. Aunque este aspecto no se vería modificado de forma significativa por los sobrenadantes de LOX, las células expuestas a BMP1 y en particular a la mezcla de BMP1 y LOX mostraron un patrón más distintivo de inmunorreactividad que incluía la presencia de material fibroso, probablemente coherente con su deposición a la matriz, en lugar de estar asociado con la capa celular. Además esto se confirmó en experimentos en matrices descelularizadas. Como se muestra en la Figura 7, después de retirar el material asociado a célula, se



observó un patrón más fibroso en la matriz depositada por células expuestas a BMP1 y a la mezcla de BMP1 y LOX. La tinción con DAPI confirmaba que el procedimiento de extracción eliminó de forma eficaz la capa celular. Tomados en conjunto, los resultados de los inventores muestran que la puesta en práctica de cultivos de fibroblastos con sobrenadantes enriquecidos en LOX y BMP1 constituye una aproximación eficaz para aumentar en gran medida la deposición de colágeno sobre la matriz insoluble.

**Ejemplo 2: La matriz obtenida a partir de fibroblastos modificada por lisil oxidasa (LOX) y proteína morfogenética ósea 1 (BMP1) regula la diferenciación de células madre mesenquimales (MSC) humanas**

Las células madre mesenquimales son una fuente prometedora para medicina regenerativa debido a su capacidad de autorrenovación y diferenciación en diversos linajes tisulares, tales como adipocitos, osteoblastos, y condrocitos. Dado que la ECM proporciona señales físicas y químicas para regular la actividad de las MSC, los inventores investigaron los efectos de la matriz obtenida a partir de fibroblastos modificada por LOX/BMP1 sobre la regulación de la diferenciación adipogénica y osteogénica de MSC. Para ese fin, los inventores expusieron cultivos de fibroblastos a medios control o a sobrenadantes que contenían LOX y BMP1 como se ha descrito anteriormente, y a continuación las células se retiraron y la matriz depositada se usó como un sustrato para establecer cultivos de MSC. Una vez que estos cultivos alcanzaron la confluencia, se indujeron en linajes adipogénicos y osteogénicos mediante incubación con los correspondientes medios de diferenciación. A continuación, estos cultivos se compararon con MSC equivalentes sembradas sin matriz. Como se muestra en la Figura 8, después de 14 días en medio MSC de diferenciación adipogénica sin matriz se desarrollan gotitas de lípidos que se pueden visualizar con Rojo Aceite O. Células MSC cultivadas en matrices obtenidas a partir de fibroblastos expuestos a medios control mostraron una reducción de la capacidad para diferenciarse en adipocitos, y este comportamiento se exacerbó adicionalmente en matrices de fibroblastos incubadas con LOX/BMP1. Por otro lado, la diferenciación de MSC en linaje osteogénico da como resultado la formación de depósitos de calcio extracelular que se pueden teñir de forma específica usando Rojo de Alizarina S, como se muestra en la Figura 9 para células MSC sembradas sin matriz. La diferenciación osteogénica aumentó en gran medida en MSC sembradas sobre matrices de fibroblastos expuestos a medios control, siendo este efecto atenuado en matrices de fibroblastos incubadas con sobrenadantes de LOX/BMP1. Estos resultados indican que la matriz obtenida a partir de fibroblastos es capaz de regular la capacidad de diferenciación adipogénica y osteogénica de MSC, siendo la modificación estimulada por LOX/BMP1 capaz de modular este efecto.



**REIVINDICACIONES**

1. Una matriz extracelular que comprende una lisil oxidasa (LOX), o un fragmento de la misma, y proteína morfogenética ósea 1 (BMP1), o un fragmento de la misma.
- 5
2. Una matriz extracelular de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proteína LOX comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o un 99 % con la SEQ ID NO: 1.
- 10
3. Una matriz extracelular de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la proteína BMP1 comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o un 99 % con la SEQ ID NO: 2.
- 15
4. Una matriz extracelular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la ECM comprende adicionalmente células productoras de ECM.
5. Matriz extracelular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que las células productoras de ECM son fibroblastos, queratinocitos, tenocitos, condrocitos y/o cualquier combinación de los mismos.
- 20
6. Matriz extracelular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que las células productoras de ECM se modifican genéticamente para producir la enzima LOX, o un fragmento de la misma, y/o BMP1 o un fragmento de la misma.
- 25
7. Un uso *in vitro* de una matriz extracelular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para regular la diferenciación de células madre mesenquimales, en el que la ECM está descelularizada.
- 30
8. Un uso *in vitro* de la composición de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la diferenciación de células madre mesenquimales es una diferenciación adipogénica y/u osteogénica.
- 35
9. Un uso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que la diferenciación de células madre mesenquimales se reduce o se inhibe.
10. Un uso *in vitro* de una composición que comprende una lisil oxidasa (LOX), o un fragmento de la misma, y proteína morfogenética ósea 1 (BMP1), o un fragmento de la misma, para aumentar la síntesis y/o depósito de colágeno en una matriz extracelular.

11. Un uso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la proteína LOX comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o un 99 % con la SEQ ID NO: 1.
- 5
12. Un uso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que la proteína BMP1 comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o un 99 % con la SEQ ID NO: 2.
- 10
13. Un uso *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que la composición comprende adicionalmente células productoras de ECM, preferentemente, las células productoras de ECM son células de fibroblasto, células de queratinocito, células de tenocito, células de condrocito y/o cualquier combinación de las mismas.
- 15
14. Un uso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 13, en el que las células productoras de ECM se modifican genéticamente para producir la enzima LOX, o un fragmento de la misma, y/o BMP1 o un fragmento de la misma.
- 20
15. Un método *in vitro* para obtener una matriz extracelular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende incubar las células productoras de ECM en presencia de una composición que comprende una lisil oxidasa (LOX), o un fragmento de la misma, y proteína morfogenética ósea 1 (BMP1), o un fragmento de la misma.
- 25
16. Método de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la proteína LOX comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o un 99 % con la SEQ ID NO: 1.
- 30
17. Método de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, en el que la proteína BMP1 comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o un 99 % con la SEQ ID NO: 2.
- 35
18. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que las células productoras de ECM son fibroblastos, queratinocitos, tenocitos, condrocitos y/o cualquier combinación de los mismos.

19. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en el que las células productoras de ECM se modifican genéticamente para producir la enzima LOX, o un fragmento de la misma, y/o BMP1 o un fragmento de la misma.
- 5
20. Un método *in vitro* para regular la diferenciación de células madre mesenquimales que comprende cultivar las células madre mesenquimales en una matriz extracelular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la ECM está descelularizada.
- 10
21. Un método para aumentar el depósito de colágeno en una matriz extracelular que comprende cultivar células productoras de ECM en presencia de una composición que comprende una lisil oxidasa (LOX) y proteína morfogenética ósea 1 (BMP1), o cultivar células productoras de ECM modificadas genéticamente para producir la enzima LOX y/o
- 15 BMP1.
22. Un método de acuerdo con la reivindicación 21, en el que la proteína LOX comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o un 99 % con la SEQ ID NO: 1.
- 20
23. Un método de acuerdo con la reivindicación 21 o 22, en el que la proteína BMP1 comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o un 99 % con la SEQ ID NO: 2.
- 25
24. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en el que las células productoras de ECM son fibroblastos, queratinocitos, tenocitos, condrocitos y/o cualquier combinación de los mismos.



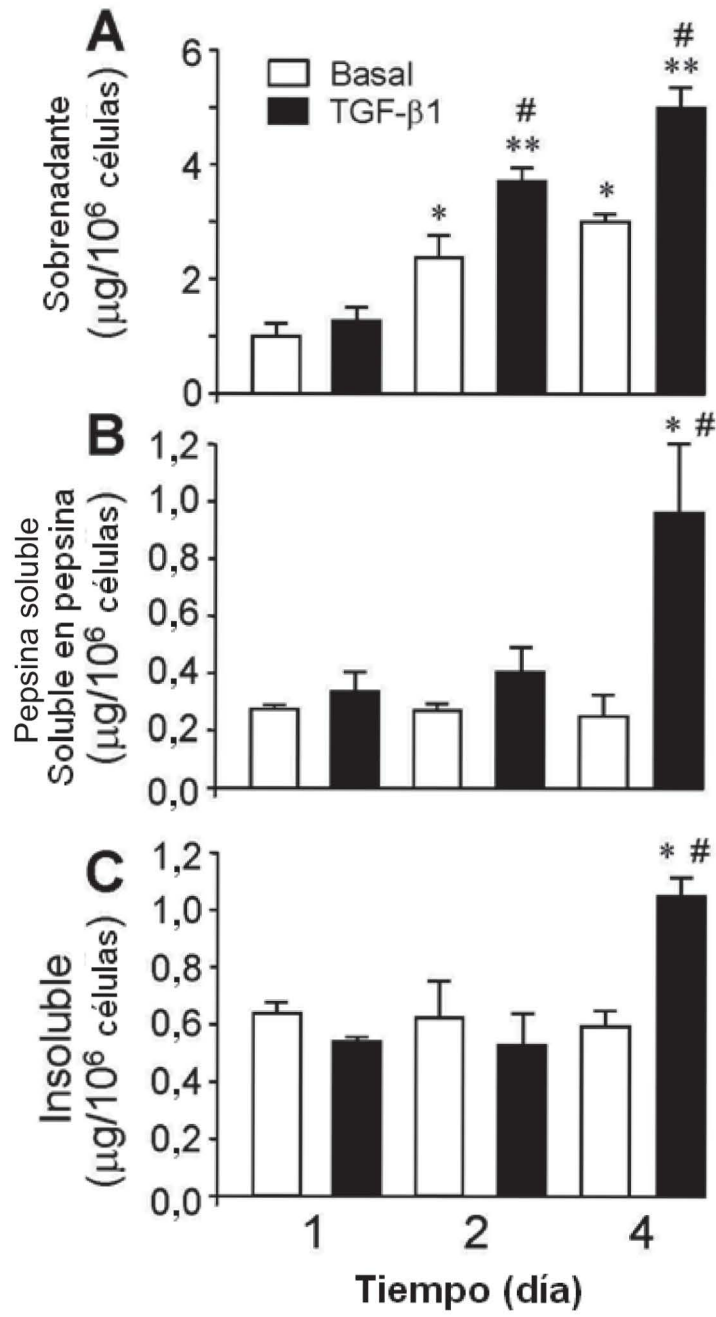


FIG. 1

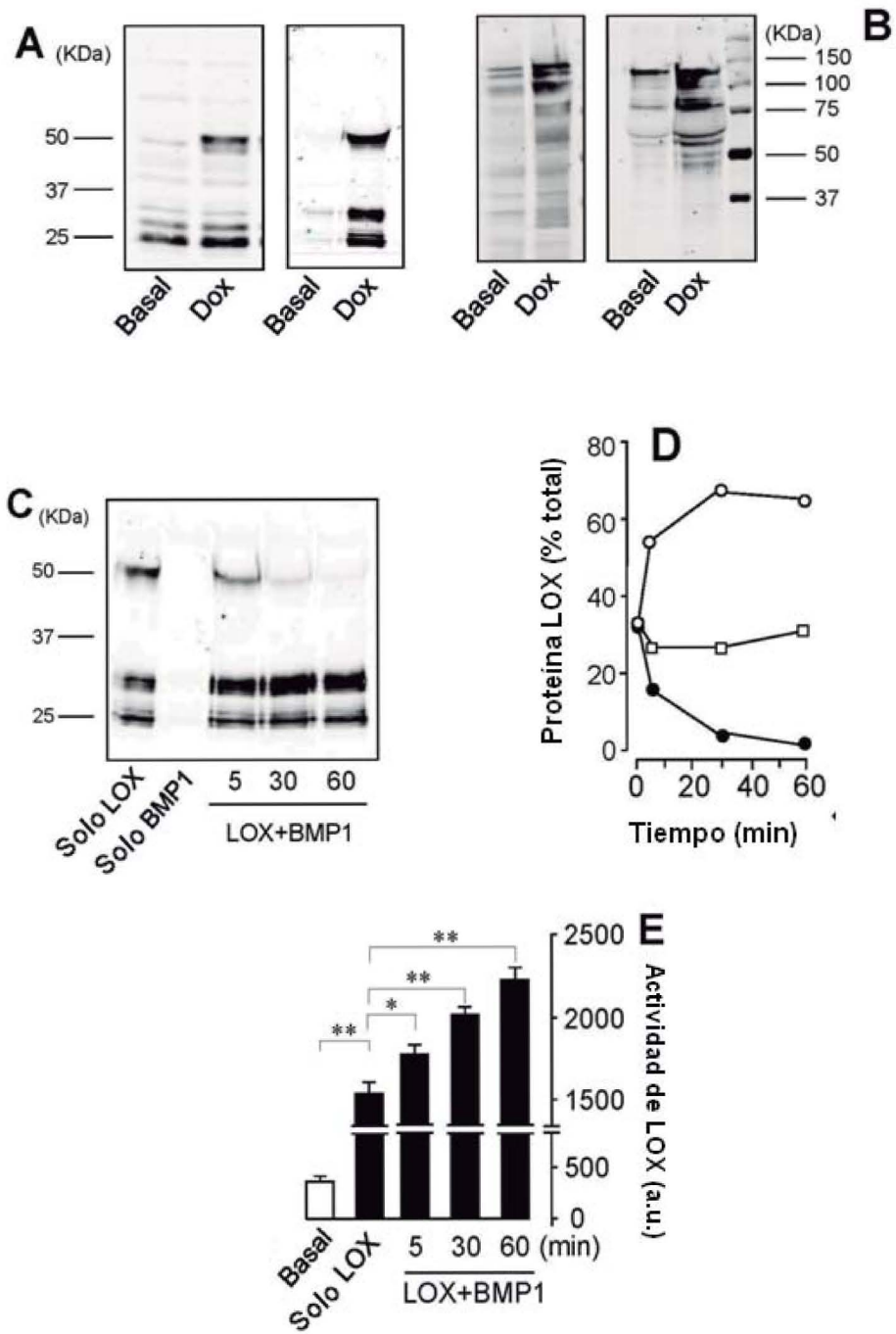


FIG. 2

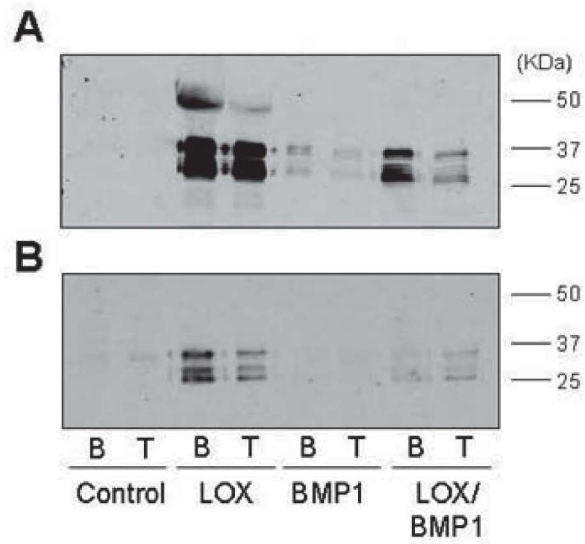


FIG. 3



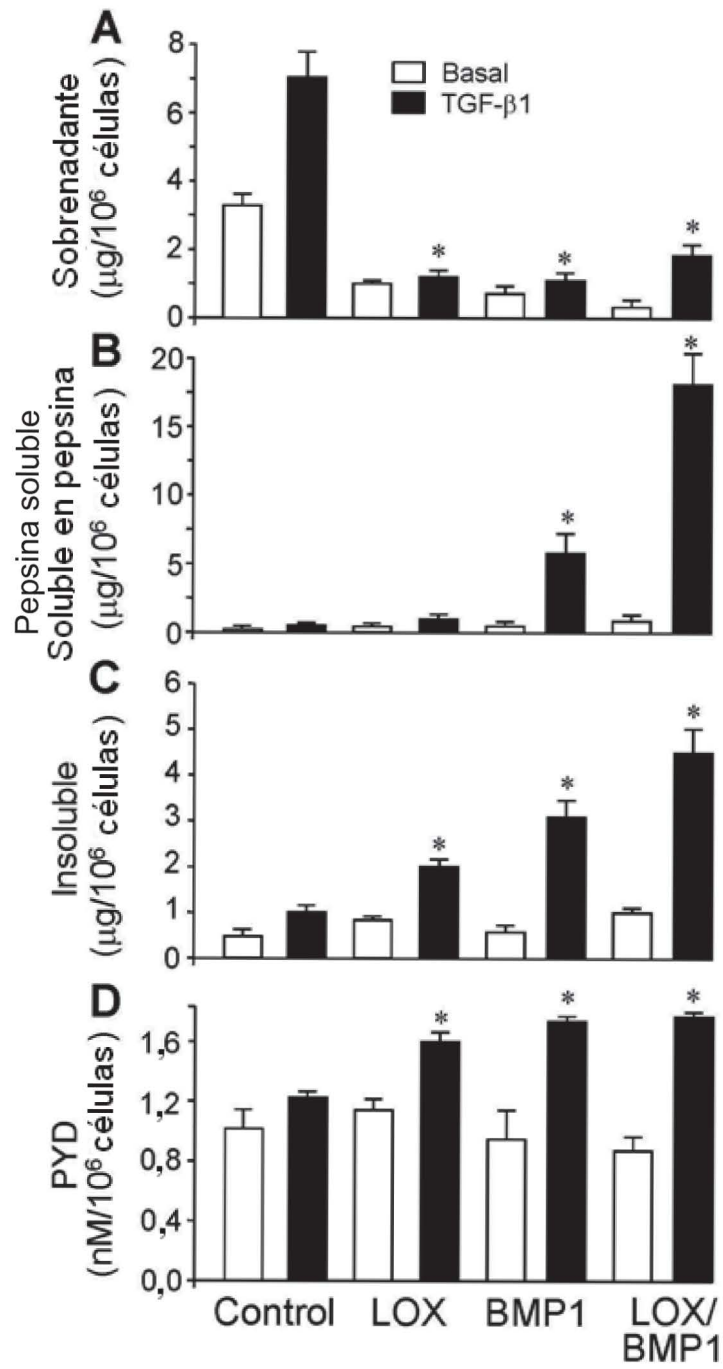


FIG. 4

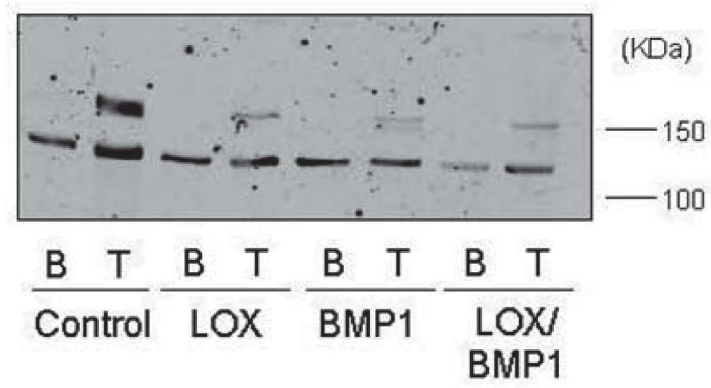


FIG. 5

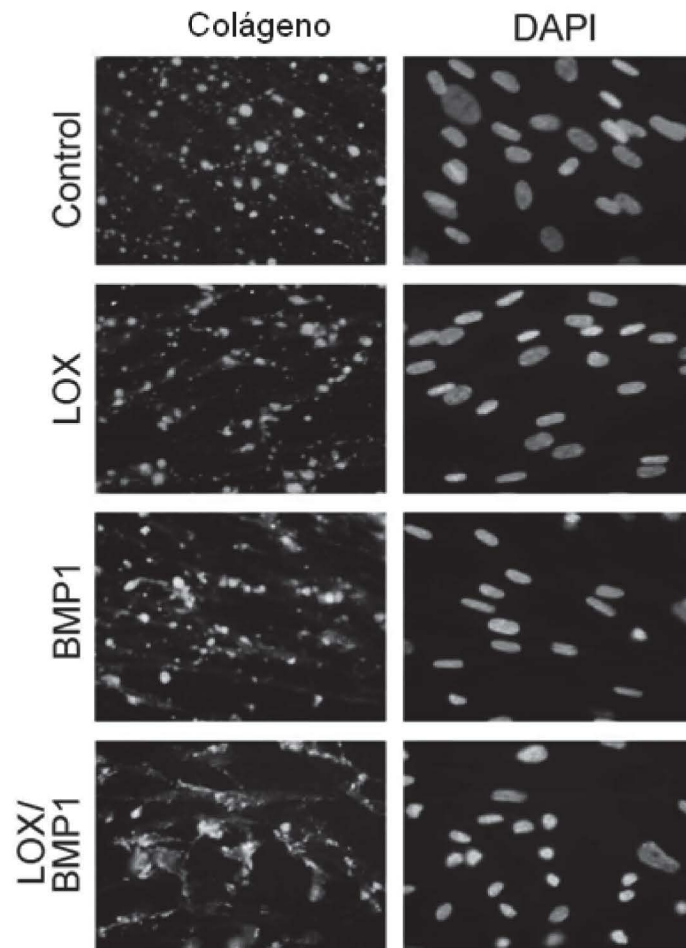


FIG. 6



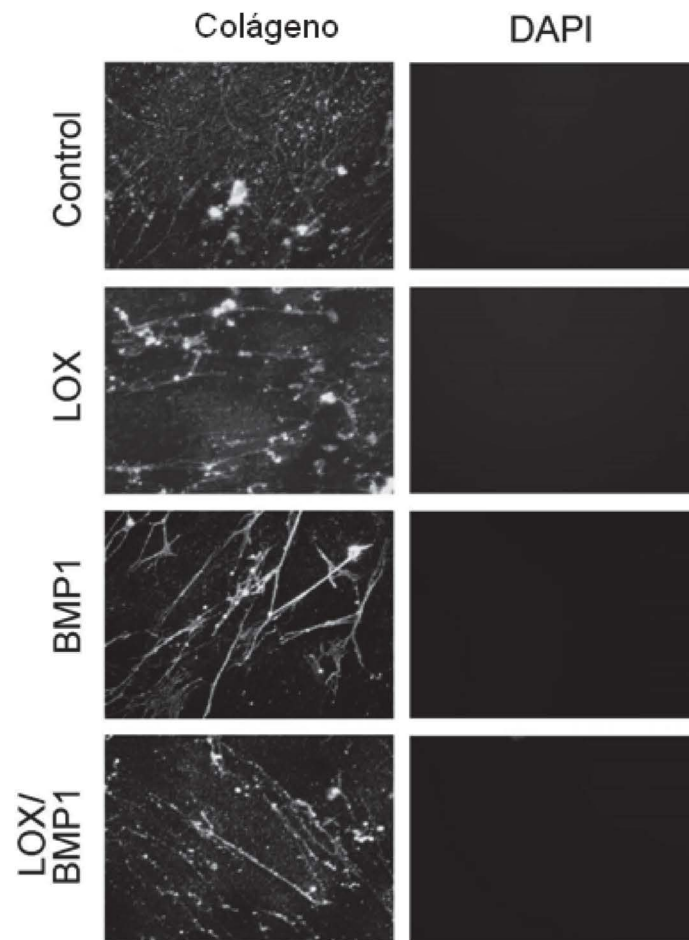


FIG. 7

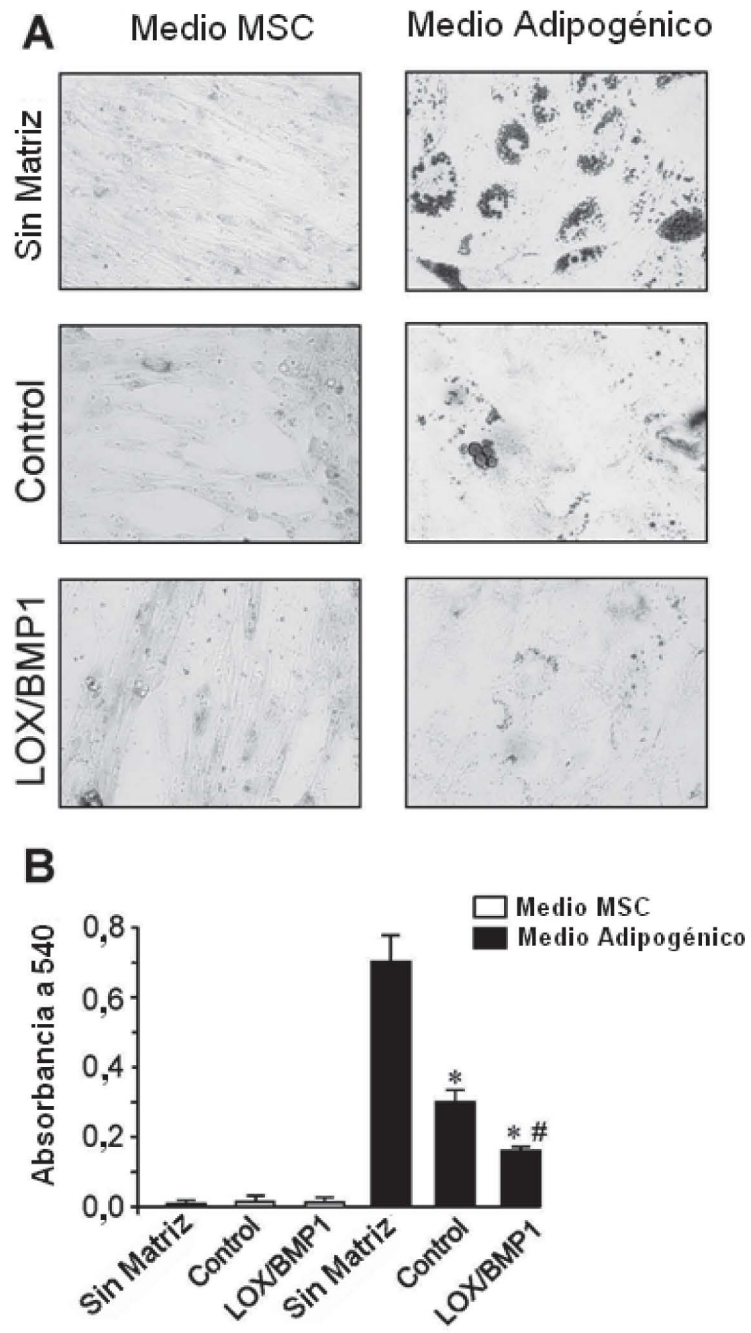


FIG. 8

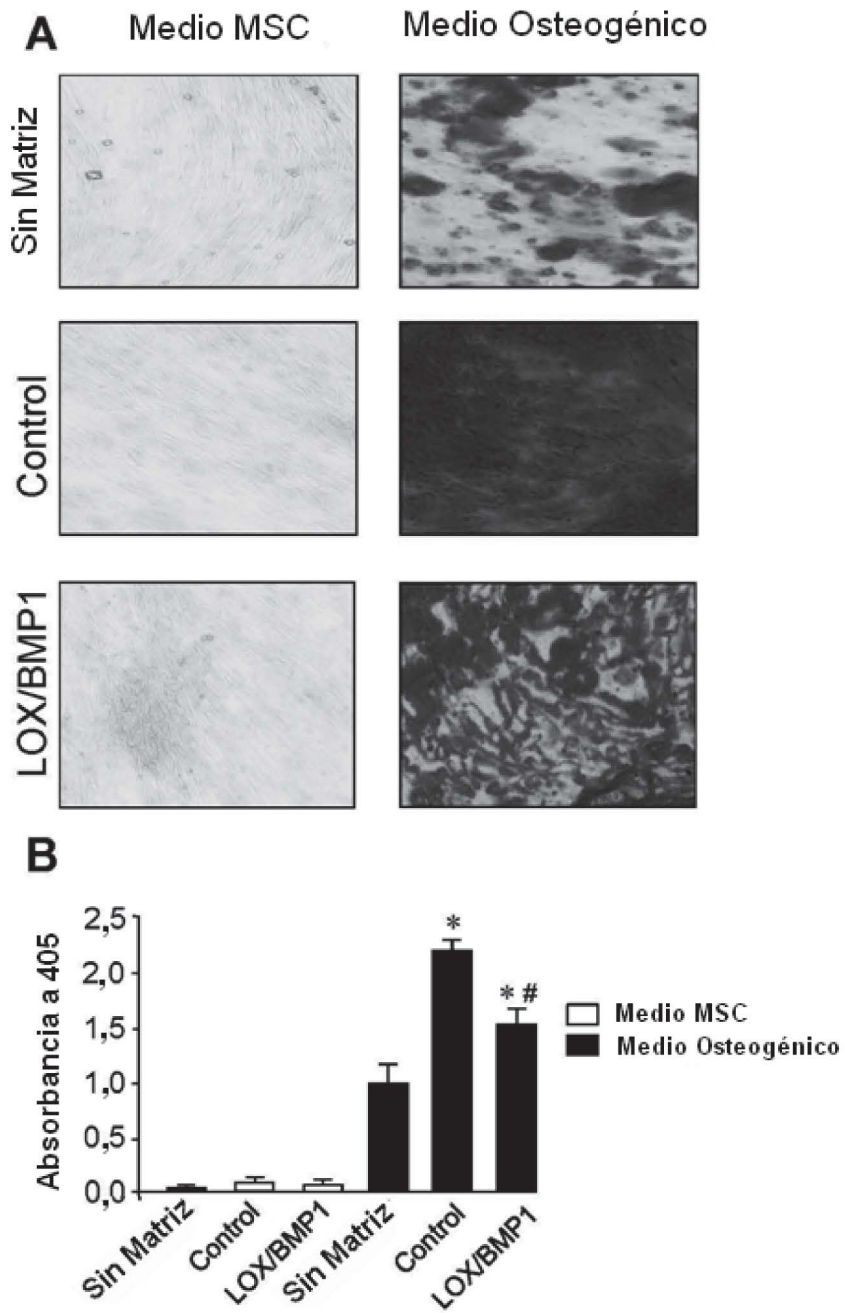


FIG. 9





21 N.º solicitud: 201731441

22 Fecha de presentación de la solicitud: 20.12.2017

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
A	UZEL MEHMET I <i>et al.</i> Molecular events that contribute to lysyl oxidase enzyme activity and insoluble collagen accumulation in osteosarcoma cell clones. Journal of Bone and Mineral Research June, 2000. , 31/05/2000, Vol. 15, Páginas 1189-1197, ISSN 0884-0431. página 1191, columna derecha, tercer párrafo; página 1191, columna derecha, cuarto párrafo- página 1192, columna derecha; página 1193, columna izquierda, último párrafo- página 1193, columna derecha, primer párrafo; página 1193, columna derecha, segundo párrafo; página 1195, columna izquierda, cuarto párrafo-columna derecha, primer párrafo.	1-24
A	GERARDO DANIEL SIERRA-GARCIA <i>et al.</i> Proteínas morfogenéticas óseas (BMP): aplicación clínica para reconstrucción de defectos en hueso. Gaceta medica de mexico, 2016, Vol. 152, Páginas 381-385, ISSN 0016-3813. página 382.	1-24
A	ALICIA BEATRIZ POMILIO <i>et al.</i> Función e importancia clínica de la enzima lisil-oxidasa.. Acta bioqim clin latinoam, 2016, Vol. 50, 4, Páginas 753-772, versión impresa ISSN 0325-2957versión On-line ISSN 1851-6114. página 758, columna derecha, segundo párrafo; página 757, columna izquierda, cuarto párrafo.	1-24
A	LOMAS A J <i>et al.</i> The past, present and future in scaffold-based tendon treatments. Advanced Drug Delivery Reviews, 20141210 Elsevier, Amsterdam, NL. Kwon Ick Chan; Kataoka Kazunori, 10/12/2014, Vol. 84, Páginas 257 - 277, ISSN 0169-409X, <DOI: doi:10.1016/j.addr.2014.11.022>. página 266, columna izquierda, segundo párrafo.	1-24

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  
23.07.2018

Examinador  
S. González Peñalba

Página  
1/2

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N5/0775** (2010.01)

**A61L27/54** (2006.01)

**A61K38/17** (2006.01)

**A61K38/39** (2006.01)

**A61K38/43** (2006.01)

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

C12N, A61L, A61K

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