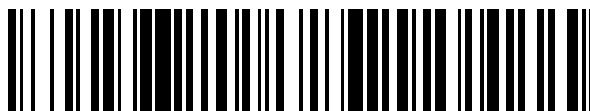


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 066**

51 Int. Cl.:

A61L 27/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2007 E 07731017 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015 EP 1986712**

54 Título: **Utilización de fucanos a efectos de injertos, de ingeniería y de regeneración ósea**

30 Prioridad:

23.02.2006 FR 0601618

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

10.03.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES PARIS 5 (50.0%)
12 rue de l'Ecole de Médecine
72270 Paris Cedex 06, FR y
INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR
L'EXPLOITATION DE LA MER (IFREMER) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**IGONDJO-TCHEN CHANGOTADE, SYLVIE;
SENNI, KARIM;
FOUCAULT-BERTAUD, ALEXANDRINE;
KORB, GRÉGORY;
BAROUKH, MAYA BRIGITTE;
SAFFAR, JEAN-LOUIS;
GODEAU, GASTON-JACQUES;
SINQUIN, CORINNE;
COLLIEC-JOUAULT, SYLVIA y
DURAND, PATRICK**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 563 066 T3

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

DESCRIPCIÓN

Utilización de fucanos a efectos de injertos, de ingeniería y de regeneración ósea

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a la utilización de fucanos de masa molar media en peso comprendida entre 5.000 y 100.000 g/mol a efectos de injertos, de ingeniería y de regeneración ósea.

10 **Estado de la técnica**

Los fucanos son una familia de polisacáridos sulfatados (véase Berteau y Mulloy, *Glycobiology*, vol. 13, nº. 6, págs. 29R-40R, 2003). Los fucanos son unos polisacáridos compuestos mayoritariamente por cadenas de unidades de fucosa y ricos en sulfato (homofucano) y por cadenas menos sulfatadas compuestas por unidades de fucosa, galactosa, xilosa y por ácido glucurónico (xilofucoglucuronanos). Los fucanos se pueden extraer a partir de las algas, en particular a partir de algas pardas (feofíceas) o a partir de invertebrados marinos. Los fucanos, una vez extraídos, presentan por lo general una masa molar media en peso superior a 500.000 g/mol. Existen numerosas técnicas para despolimerizar los fucanos con el fin de obtener unos fucanos que presenten una masa molar media en peso comprendida entre 5.000 y 100.000 g/mol (véase el documento EP 0403377). Se han descrito numerosas aplicaciones terapéuticas de los fucanos: anticoagulante (véase el documento EP 0403377), tratamiento de las patologías periodontales y de las lesiones dérmicas (véase el documento WO 9932099), antitrombótico (véase el documento WO 011565), tratamiento de la artritis y de la osteoartritis (véase el documento WO 03018033).

El relleno de las pérdidas de sustancia ósea es un problema que encontramos con frecuencia en las patologías y los traumatismos osteoarticulares (tumores óseos, secuelas traumáticas, patologías degenerativas). El cuaderno de cargas de un material de reemplazo óseo ideal incluye en particular: 1) una buena tolerancia sin riesgos de infección para el receptor; 2) una integración en las estructuras óseas *in situ*; 3) una capacidad para permitir una neoformación ósea de buena calidad dotada de propiedades mecánicas suficientes para soportar las tensiones en el sitio de implantación. Entre estos materiales los biomateriales naturales o de síntesis constituyen la alternativa a los injertos óseos. Las propiedades buscadas para estos materiales son la osteoconducción, es decir la capacidad para guiar la reconstrucción ósea en contacto con él y/o la osteoinducción, es decir la capacidad para estimular la formación ósea incluso en un sitio extraóseo. Varias líneas de investigación (véase Heymann y otros, *Revue de chirurgie orthopédique*, 2001; 87, págs. 8-17) intentan mejorar las propiedades osteogénicas de los biomateriales. La asociación en los biomateriales de proteínas de la matriz extracelular o de factores de crecimiento con potencial osteogénico es una de las prioridades de la investigación. Estos factores de crecimiento se pueden incorporar a los biomateriales y liberarse *in vivo* potenciando de este modo la osteogénesis en el interior de este. Las cerámicas de fosfato de calcio (PCa) también se han considerado como unos sistemas de liberación de sustancias farmacológicas (anticancerígenos, antibióticos...). La asociación de células osteocompetentes, es decir unas células capaces de constituir tejido óseo, a los sustitutos óseos es la otra línea de investigación principal. Esta asociación "híbrida" precisa un sustituto de relleno, por una parte, y una fuente autóloga de células osteocompetentes, por otra parte. Estas células pueden proceder de explantes óseos a partir de los cuales se aíslan las células osteoblásticas. Sin embargo este método solo permite obtener una mínima cantidad de células osteocompetentes. Las células osteocompetentes también pueden proceder de osteoprogenitores medulares capaces de diferenciarse *in vitro* e *in vivo*. Para ello, solo se puede utilizar el conjunto de las células de médula o únicamente las células estromales. También se puede obtener un clon osteoblástico diferenciado a partir de las células madre de la médula. Unas células de médula ósea inyectadas en un sitio óseo pueden por sí solas colmar un déficit óseo calibrado en ratas. La asociación de células de médula ósea a una cerámica de PCa permite que la cerámica adquiera un carácter osteoconductor. En efecto, numerosos estudios realizados en animales muestran una osificación en el interior de cerámicas incubadas con células de médula ósea autóloga y a continuación implantadas en un sitio extraóseo. Además, las células de médula ósea potencian la integración del biomaterial en un sitio óseo. Estas favorecen la rapidez y la calidad del crecimiento óseo.

El documento WO 0202051 describe la utilización de un polisacárido excretado por la especie *Vibrio Diabolicus* en cicatrización ósea. El polisacárido se puede utilizar para la preparación de un revestimiento de un implante endoóseo o de un material de relleno osteoconductor. De acuerdo con las indicaciones del documento WO 0202051, los fucanos que presentan un elevado peso molecular (del orden de 1 millón de g/mol) no tienen ningún efecto sobre la cicatrización ósea.

Teniendo en cuenta las deficiencias y los inconvenientes del estado de la técnica en materia de reconstrucción ósea, los inventores se han puesto como objetivo dotar a un sustituto óseo de las propiedades osteoconductoras mejoradas.

De manera inesperada, los inventores han descubierto que este objetivo se podía alcanzar utilizando una familia particular de polisacáridos, esto es los fucanos de masa molar media en peso comprendida entre 5.000 y 100.000 g/mol. Estos fucanos son capaces de promover y de acelerar la migración, la proliferación de las células osteoblásticas, así como la síntesis de una nueva matriz extracelular ósea y su mineralización.

Objeto de la invención

5 La invención tiene por objeto un sustituto óseo que comprende un biomaterial y unos fucanos que presentan una masa molar media en peso comprendida entre 5.000 y 100.000 g/mol, en particular comprendida entre 10.000 y 40.000 g/mol.

10 Los fucanos utilizados en la presente invención presentan una masa molar media en peso comprendida entre M1 y M2, seleccionándose las masas molares medias en peso M1 y M2 de forma independiente la una de la otra, seleccionándose M1 entre los valores 5.000, 10.000, 15.000, 20.000 y 25.000 g/mol y seleccionándose M2 entre los valores 40.000, 60.000, 80.000, 90.000 y 100.000 g/mol.

15 De manera preferente, los fucanos se obtienen a partir de alga parda. El experto en la materia podrá utilizar las técnicas habituales para obtener los fucanos utilizados en la presente invención. Se puede citar a título de ejemplo de técnicas que pueden utilizarse: mediante la lisis controlada de los fucanos de alto peso molecular seguida de una purificación por cromatografía en gel como se ha descrito con anterioridad (véase el documento EP 0403377) o mediante la despolimerización de radicales de los fucanos de alto peso molecular como se ha descrito con anterioridad (documentos EP 0846129 o WO 9708206), el experto en la materia adaptará fácilmente las condiciones de trabajo con el fin de obtener la masa molar media en peso deseada.

20 Por biomaterial, se entiende cualquier material destinado a la sustitución de una función o de un órgano. Se trata de cualquier material no vivo utilizado en un dispositivo médico y que pretende sustituir o tratar un tejido, un órgano o una función.

25 Tradicionalmente, para preparar un sustituto óseo de acuerdo con la invención, el experto en la materia podrá utilizar cualquier biomaterial habitualmente utilizado en ingeniería ósea. A título de ejemplo, el biomaterial podrá comprender uno o varios materiales seleccionados en el grupo compuesto por el titanio, el colágeno, el hueso desproteinizado y/o desmineralizado, el coral, la cerámica de fosfato de calcio, la hidroxiapatita, el beta fosfato tricálcico y los vidrios bioactivos.

30 De manera ventajosa, un sustituto óseo de acuerdo con la invención podrá comprender, además, uno o varios factores de crecimiento seleccionado en los grupos que comprenden los Fibroblast Growth Factors (FGFs), los Transforming Growth Factors (TGFs), los Insulin Growth Factors I (IGFs), los Platelet Derived Growth Factors (PDGFs), las Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) y los Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs).

35 De manera preferente, un sustituto óseo de acuerdo con la invención podrá comprender, además, uno o varios factores de crecimiento seleccionado(s) en el grupo compuesto por las BMPs, los FGFs, los TGF beta y los VEGFs. De manera ventajosa, un sustituto óseo de acuerdo con la invención podrá comprender, además, una o varias citoquinas seleccionada(s) en el grupo compuesto por la interleucina 1, la interleucina 6, la interleucina 4, el Tumor Necrosis Factor alfa, el Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor y el Macrophage Colony-Stimulating Factor.

45 Tradicionalmente, la superficie del biomaterial de un sustituto óseo de acuerdo con la invención presenta un revestimiento que comprende los fucanos.

El experto en la materia podrá utilizar las técnicas habituales para recubrir la superficie del biomaterial con un revestimiento que comprenda los fucanos. A título de ejemplo, el experto en la materia podrá injertar los fucanos en la superficie del biomaterial.

50 El biomaterial de un sustituto óseo de acuerdo con la invención también se podrá impregnar con los fucanos.

De manera ventajosa, un sustituto óseo de acuerdo con la invención podrá comprender, además, células seleccionadas en el grupo compuesto por células osteocompetentes procedentes de la médula ósea, de explantes óseos o periósticos.

55 Para preparar dichos sustitutos óseos, el experto en la materia podrá proceder a la colonización de un sustituto óseo por las células deseadas.

60 De acuerdo con una forma de realización, la invención se refiere a un medio de cultivo para un tipo de células seleccionado en el grupo compuesto por células osteocompetentes procedentes de la médula ósea, del hueso o del periostio, que comprende unos fucanos que presentan una masa molar media en peso comprendida entre 5.000 y 100.000 g/mol, en particular comprendida entre 10.000 y 40.000 g/mol.

65 Tradicionalmente un medio de cultivo de acuerdo con la invención podrá comprender, además, uno o varios factores de crecimiento seleccionados en el grupo compuesto por los Fibroblast Growth Factors (FGFs), los Transforming Growth Factor (TGFs), los Insulin Growth Factors I (IGFs), los Platelet Derived Growth Factors (PDGFs), las Bone

Morphogenetic Proteins (BMPs) y los Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs). De acuerdo con una forma de realización, la invención se refiere a la utilización de los fucanos que presentan una masa molar media en peso comprendida entre 5.000 y 100.000 g/mol, en particular comprendida entre 10.000 y 40.000 g/mol para el cultivo de células osteocompetentes procedentes de la médula ósea, del hueso o del periostio.

5 De acuerdo con una forma de realización, la invención se refiere a un procedimiento de cultivo de células seleccionadas en el grupo de las células osteocompetentes procedentes de la médula ósea, del hueso o del periostio caracterizado por que dichas células se cultivan en un medio de cultivo descrito con anterioridad.

10 De acuerdo con una forma de realización, la invención se refiere a un procedimiento de cultivo de células osteocompetentes procedentes de la médula ósea, del hueso o del periostio, caracterizado por que dichas células se cultivan en un sustituto óseo descrito con anterioridad.

15 De acuerdo con una forma de realización, la invención se refiere a la utilización de los fucanos que presentan una masa molar media en peso comprendida entre 5.000 y 100.000 g/mol, en particular comprendida entre 10.000 y 40.000 g/mol para la fabricación de un dispositivo médico que presenta una actividad sobre la regeneración ósea.

20 Tradicionalmente dicho dispositivo médico se podrá utilizar en cirugía ortopédica, periodontal y plástica con el fin de facilitar la regeneración ósea y colmar los defectos tisulares que aparecen, por ejemplo, después de una lesión causada por una patología, por un accidente o por un acto quirúrgico.

Dicho dispositivo médico podrá, por ejemplo, utilizarse como material de reparación o de relleno óseo, como injerto óseo, como implante endo-óseo, como implante dental u osteoarticular.

25 Dicho dispositivo médico se podrá utilizar para el tratamiento de patologías óseas como, por ejemplo, la osteoporosis.

30 Dicho dispositivo médico podrá, por ejemplo, comprender los fucanos, de manera preferente en una forma hidratada, por ejemplo en forma de un hidrogel, solo o combinado con uno o varios factores de crecimiento seleccionado(s) en el grupo compuesto por los Fibroblast Growth Factors (FGFs), los Transforming Growth Factors (TGFs), los Insulin Growth Factors I (IGFs), los Platelet Derived Growth Factors (PDGFs), las Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) y los Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs). La asociación de los fucanos a un factor de crecimiento permite aumentar la velocidad de la regeneración ósea. De manera preferente, un dispositivo médico de acuerdo con la invención comprenderá unos fucanos en una forma hidratada y uno o varios factores de crecimiento seleccionado(s) en el grupo de las BMPs, los FGFs, los TGF beta y los VEGFs.

Tradicionalmente, un dispositivo médico de acuerdo con la invención podrá comprender un sustituto óseo de acuerdo con la invención.

40 Debe considerarse que el contenido de todos los documentos citados forma parte de la presente descripción.

La presente invención se ilustrará mejor a continuación por medio de los ejemplos que vienen a continuación. Estos ejemplos se dan únicamente a título ilustrativo del objeto de la invención, para los que no constituyen en modo alguno una limitación.

45 **Descripción de las figuras**

La figura 1 presenta la evolución del número de osteoblastos en función del tiempo en presencia y en ausencia de los fucanos.

50 Las figuras 2a, 2b, 2c, 2d representan unas fotografías de cultivo de células osteoblásticas de control en las que se detecta la actividad fosfatasa alcalina.

55 Las figuras 2a, 2b, 2c y 2d representan unas fotografías realizadas después de 8, 15, 30 y 45 días de cultivo respectivamente.

Las figuras 3a, 3b, 3c representan unas fotografías de cultivo de células osteoblásticas realizado en presencia de 10 µg/ml de fucanos. La actividad fosfatasa alcalina se ha detectado al final en las células en cultivo. Las figuras 3a, 3b, 3c representan unas fotografías realizadas después de 8, 15 y 30 días de cultivo respectivamente.

60 Las figuras 4a, 4b, 4c, 4d representan unas fotografías de cultivo de células osteoblásticas de control (figuras 4a y 4c) y de cultivo de células osteoblásticas realizado en presencia de 10 µg/ml de fucanos (figuras 4b y 4d). Los depósitos minerales se visualizan mediante la reacción de Von Kossa realizada al final después de la fijación de las células en cultivo.

65 Las figuras 4a y 4b representan unas fotografías realizadas después de 30 días de cultivo. Las figuras 4c y 4d

representan unas fotografías realizadas después de 45 días de cultivo.

5 Las figuras 5a, 5b representan unas fotografías de cultivo de células osteoblásticas de control (figura 5a) y de cultivos de células osteoblásticas en presencia de 10 µg/ml de fucanos (figuras 5b). Después de 45 días de cultivo, la inmunodetección del colágeno de tipo I se realiza en las células en cultivo.

Las figuras 6a y 6b representan unas imágenes realizadas por microscopía electrónica de barrido (MEB) de biomateriales acelulares de control (figura 6a) o impregnados con fucanos (figura 6b).

10 Las figuras 7a y 7b representan unas imágenes realizadas por microscopía electrónica de barrido (MEB) de biomateriales de control (figura 7a) o impregnados con fucanos (figura 7b) en los que se han cultivado unos osteoblastos durante 10 días.

15 Las figuras 8a y 8b representan unas imágenes realizadas por microscopía electrónica de barrido (MEB) de biomateriales de control (figura 8a) o impregnados con fucanos (figura 8b) en los que se han cultivado unos osteoblastos durante 30 días.

20 La figura 9 representada muestra la profundidad de los biomateriales impregnados por los fucanos en los que se han cultivado unos osteoblastos durante 30 días.

Las figuras 10a y 10b representan unas imágenes realizadas por microscopía electrónica de barrido (MEB) de biomateriales de control (figura 10a) o impregnados con fucanos (figura 10b) en los que se han cultivado unos osteoblastos durante 10 días y que muestran la matriz extracelular secretada por las células.

25 Ejemplos

Material y métodos:

30 Obtención de los fucanos

Los fucanos utilizados en la invención se extraen de feofíceas o algas pardas (*Ascophyllum nodosum*) de acuerdo con los procedimientos ya descritos (según Black y otros, J. Sci. Food Agric., 3, págs. 122-129, 1952 o según Nishino y otros, Carbohydr. Res., 186, págs. 119-129, 1989). Los fucanos de bajo peso molecular (FBPM) utilizados se obtienen mediante los procedimientos ya descritos: por hidrólisis controlada seguida de un fraccionamiento preparatorio en gel permeable o de exclusión estérica (patente EP 0403377) o por despolimerización de radicales (patentes EP 0 846 129 y EP 1207891).

Obtención de los osteoblastos

40 Las células osteoblásticas humanas proceden de fragmentos óseos recuperados en la sala de operaciones durante las reducciones de fracturas. Las muestras de hueso se lavan en PBS hasta que se eliminan los elementos representados de la sangre. Se cortan unos testigos óseos en cubos de entre 3 y 4 mm, y a continuación se depositan en una placa de cultivo. Se deposita una gota de medio de cultivo (DMEM al 40% de suero de ternera fetal (STF), penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 µg/ml), fungizona (2 µg/ml)) sobre cada explante para permitir su adhesión al plástico de la placa. La placa de cultivo se coloca a continuación dentro de una incubadora (37 °C, aire (95 %)/CO₂ (5 %)) durante entre 1 y 2 horas. Los explantes se recubren entonces con el medio de cultivo DMEM que comprende un 20 % de STF. Este medio se cambia cada 3 días. Las células migran fuera del explante para colonizar la placa de cultivo desde el 6º día de cultivo, se alcanza la confluencia después de 4 semanas de cultivo, se retiran entonces los explantes de la placa de cultivo.

50 Cultivo de los osteoblastos en dos dimensiones

Los osteoblastos confluentes en el primer paso de cultivo se cultivan a razón de 10.000 células/ml en unas placas de 24 pocillos y a continuación se incuban durante 24 horas en un medio DMEM que comprende un 10 % de STF al que se añade penicilina y estreptomycin. Después de la adhesión y el ensanchamiento de las células, los medios de cultivo se sustituyen por unos medios MDEM que comprenden un 10 % de STF que contiene o no el fucano (10 µg/ml). A continuación estos medios de cultivo se cambian cada 3 días. El 21º día de cultivo, con el fin de mejorar la diferenciación osteoblástica se añaden β glicerofosfato (10 mM) y ácido ascórbico 2 fosfato (25 mM). Después de 8, 15, 30 y 45 días de cultivo, se extraen los sobrenadantes de cultivo con el fin de estudiar la secreción de las metaloproteasas matriciales. Las células se tratan con tripsina para los recuentos celulares o se fijan con etanol absoluto (-20 °C) lo que permitirá más adelante los estudios morfológicos e inmunocitoquímicos.

Preparación del biomaterial para el cultivo celular

65 El biomaterial es una trama ósea esponjosa de origen bovino obtenida mediante la limpieza de los espacios intertrabeculares y mediante la eliminación de las proteínas no colagénicas. El biomaterial se corta previamente en

pequeños fragmentos (2 mm x 2 mm), estos fragmentos se dejan durante 48 horas en etanol absoluto, y a continuación se incuban en DMEM durante 24 horas a 37 °C (aire/5 % CO₂) en una estufa de cultivo. Los biomateriales óseos se rehidratan en los medios de cultivo en presencia o no de fucanos (50 µg/ml).

5 **Cultivo de los osteoblastos en el biomaterial óseo**

Los osteoblastos humanos normales se cultivan en unas placas de cultivo de 24 pocillos (20.000 células/pocillo) que contienen los biomateriales óseos impregnados o no fucanos. Estos injertos se mantienen en un medio de cultivo denominado mineralizante compuesto por DMEM, por suero de ternera fetal (10 %), por ácido ascórbico (50 µg/ml), por insulina (5 µg/ml) de transferrina (5 µg/ml). Mientras dura el experimento, este medio de cultivo se renueva cada 3 días. Los injertos así obtenidos se retiran de las placas de cultivo después de 10 o 30 días de cultivo, fijados y preparados para los estudios histológicos y con microscopía electrónica de barrido.

15 **Coloración de las células con GIEMSA**

Esta coloración permite la visualización del núcleo y del citoplasma. Después de la fijación, las células se recubren durante 2 minutos con colorante GIEMSA (MERCK) previamente filtrado. El exceso de colorante se elimina mediante lavados sucesivos con agua destilada.

20 **Reacción de Von Kossa**

Esta reacción permite visualizar los depósitos minerales en los cultivos. Estos depósitos se muestran como unas zonas negras. Los cultivos bidimensionales después de la fijación se lavan con agua destilada y a continuación se incuban durante 30 minutos en una solución de nitrato de plata (5 %). Después del lavado con agua destilada el material se expone a la luz solar.

Visualización de la actividad Fosfatasa alcalina *in situ*

Se lavan las células con PBS y a continuación se incuban en una solución tampón (Tris-HCL (0,05 M) pH = 9,5, MgSO₄ (0,1 %), Naftil fosfato (0,1 %), Fast red (0,1 %)) durante 1 hora a temperatura ambiente. El sobrenadante se elimina y los pocillos se lavan con agua destilada entre 2 y 3 veces. Las zonas con actividad fosfatasa alcalina positiva se muestran de color marrón.

35 **Inmuno-detección del colágeno de tipo I**

Las células o los cortes de biomaterial óseo se lavan con PBS y a continuación se incuban en una solución de CH₃OH (80 %)/H₂O₂ (20 %) durante 10 minutos con el fin de inactivar las peroxidasas endógenas. Los pocillos o los cortes se lavan con PBS, a continuación se bloquean los puntos antigénicos no especificados (leche descremada 0,1 %, 10 minutos). Después del lavado se incubaba el material con un IgG de ratón anticolágeno humano (Sigma, 1/40) durante 1 hora. Después del lavado el material experimenta una nueva incubación con un anticuerpo de cabra marcado con peroxidasa y dirigido contra los IgG de ratón (1/60) (Calbiochem). Después del lavado, la actividad peroxidasa de las zonas que constan de colágeno de tipo I se revela después de la reacción con la tetraclorhidrato de 3-3'-diaminobencidina (Sigma) (15 minutos protegida de la luz).

45 **Microscopía electrónica de barrido**

Los biomateriales óseos se fijan en los días 10 y 30 con paraformaldehído al 4 %. Después del lavado con PBS y una fijación posterior con tetróxido de osmio al 2 % durante 45 minutos, se lavan los biomateriales en tres baños sucesivos de cacodilato de sodio, y a continuación se deshidratan con unas soluciones de etanol crecientes hasta el etanol absoluto. La sustitución del alcohol por CO₂ líquido se lleva a cabo en un aparato de punto crítico. Se lleva a cabo una metalización con oro de la superficie de la muestra mediante pulverización catódica al vacío con el fin de obtener una capa de superficie conductora necesaria para una observación óptima de la muestra en microscopía electrónica de barrido.

55 **Resultados:**

Cultivos bidimensionales

Las células procedentes de explantes óseos se consideran como unas células pre-osteoblásticas que, en cultivo, van a adquirir su fenotipo netamente osteoblástico. Esta diferenciación terminal se realiza después de varias fases, que corresponden a una fase proliferativa, una fase de síntesis matricial y por último una fase de maduración y de mineralización. El final de la fase proliferativa se caracteriza después de la confluencia por la aparición de nódulos compuestos por osteoblastos maduros en una matriz extracelular tridimensional. La síntesis de colágeno de tipo I es máxima en el momento de la formación de estos nódulos y a continuación disminuye rápidamente. La fase de maduración se caracteriza por un aumento de la expresión de la fosfatasa alcalina (FAL) que alcanza su apogeo al comienzo de la fase desmineralización. A continuación, con la diferenciación terminal de las células osteoblásticas,

la expresión FAL disminuye.

Proliferación de los osteoblastos en cultivo bidimensional

- 5 La adición de fucanos en el medio de cultivo estimula enormemente la proliferación de las células osteoblásticas (+45 % en 30 días, +60 % en 45 días, véase la figura 1).

Fosfatasa alcalina

- 10 La cinética de expresión de la fosfatasa alcalina (FAL) por los osteoblastos en cultivo permite apreciar el progreso de estas células en sus rutas de diferenciación. La aparición de la fosfatasa alcalina en los cultivos marca el comienzo de la diferenciación osteoblástica mientras que los osteoblastos maduros ya no expresan esta enzima.

- 15 La expresión de la FAL en los cultivos de control se observa desde el día 15 de cultivo (figura 2a) y es máxima el día 45 (figura 2d), esta expresión es mucho más precoz en los cultivos incubados en presencia de fucanos (10 µg/ml) (véanse las figuras 3a, 3b, 3c). En efecto, en presencia de fucanos, la expresión de la FAL se observa desde el día 8 de cultivo (figura 3a), alcanza su máximo después de 15 días (figura 3b), para haber disminuido claramente en los cultivos observados el día 30 (figura 3c). La observación de la expresión FAL ya no es posible después del día 45 de cultivo en presencia de fucanos, al cubrir los depósitos minerales la casi totalidad de la placa de cultivo.

- 20

Reacción Von Kossa e inmuno-detección del colágeno de tipo I

- 25 La reacción de Von Kossa permite apreciar el estado de mineralización de la matriz extracelular secretada por los osteoblastos en cultivo (figura 4). Se detectan algunos nódulos de mineralización en los cultivos de control el día 45 (figura 4c), mientras que estos mismos nódulos se observan desde el día 30 en los cultivos en presencia de fucanos (figura 4b). El día 45 de cultivo, la matriz extracelular expresada por los osteoblastos incubados con el polisacárido está casi completamente mineralizada (figura 4d).

- 30 Después del día 45, la presencia de colágeno de tipo I se detecta en el interior de la matriz extracelular de los cultivos de control o incubados por el fucano (figura 5). El depósito de este colágeno fibrilar en los cultivos de control forma una red poco o no mineralizada, estrechamente asociada con las prolongaciones celulares (figura 5a). La detección del colágeno I en los cultivos tratados por los fucanos muestra una trama colagénica asociada a un depósito denso que corresponde al depósito mineral observado después de la reacción de Von Kossa (figura 5b).

- 35 **Expresión de la gelatinasa A (MMP-2) y de la colagenasa 3 (MMP-13)**

- Los osteoblastos en cultivo expresan la MMP-2 y la MMP-13, la MMP-2 se expresa sobre todo al comienzo del cultivo mientras que la MMP-13 la expresan los osteoblastos al final de la diferenciación. La adición de fucanos en el cultivo parece disminuir la expresión de la gelatinasa A por los osteoblastos, mientras que la expresión de MMP-13 inducida es el reflejo de la aceleración de la diferenciación de las células en la línea osteoblástica.

- 40

Conclusión:

- 45 **La adición de fucanos en el medio de cultivo acelera la diferenciación de líneas osteoblásticas.**

Cultivo tridimensional

Microscopía electrónica de barrido

- 50 La microscopía electrónica de barrido ha permitido observar la estructura macromolecular de los biomateriales así como su colonización por los osteoblastos.

Biomateriales acelulares

- 55 La observación de los biomateriales no cultivados con los osteoblastos muestra que el pretratamiento por los fucanos no modifica la ultraestructura del biomaterial óseo (figuras 6a, 6b).

Biomateriales cultivados con osteoblastos

- 60 El día 10 de cultivo las células están adheridas a la superficie de los biomateriales impregnados o no por los fucanos. Estas células presentan un cuerpo celular aplanado, que se adhiere a la trama colagénica, de la que salen unos pseudópodos finos y alargados que permiten mejorar la adhesión a la matriz extracelular (figura 7).

- 65 Después de 30 días de cultivo la celularidad de los biomateriales de control y que comprenden los fucanos es muy superior a la observada después de 10 días, lo que hace suponer una proliferación de los osteoblastos en el interior mismo de la matriz colagénica (figura 8). Además en 30 días de cultivo la densidad celular de los biomateriales que

comprenden los fucanos (figura 8b) es mucho más importante que la observada para los materiales no tratados (figura 8a). En efecto, sin fucano, los osteoblastos (figura 8a), no ocupan todo el volumen del biomaterial, los poros del biomaterial siguen siendo visibles. Después de la impregnación con los fucanos, los biomateriales presentan una fuerte densidad celular y los poros están en gran parte bloqueados por las células (figura 8b). Los osteoblastos colonizan en profundidad estos poros y forman unos puentes a ambos lados de sus márgenes (figura 9).

En contacto con las células, se observa la presencia de material filamentoso extracelular. Esto corresponde a la secreción por los osteoblastos de una matriz extracelular fibrilar. Por otra parte, se observa la presencia de un material globular extracelular en contacto con los osteoblastos y la matriz extracelular filamentosa (figura 10b). Esto corresponde a la matriz calcificada.

Conclusiones:

- 15 **La impregnación del biomaterial óseo con los fucanos no modifica la adhesión celular.**
- La impregnación del biomaterial óseo con los fucanos estimula la proliferación de los osteoblastos.**
- La impregnación del biomaterial óseo con los fucanos acelera la mineralización de la matriz extracelular secretada por los osteoblastos.**

REIVINDICACIONES

- 5 1. Sustituto óseo que presenta una actividad sobre la regeneración ósea, que comprende unos fucanos que presentan una masa molar media en peso comprendida entre 5.000 y 100.000 g/mol, en particular comprendida entre 10.000 y 40.000 g/mol.
- 10 2. Sustituto óseo de acuerdo con la reivindicación **1**, **caracterizado por que** los fucanos se obtienen a partir del alga parda.
- 15 3. Sustituto óseo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **1 a 2**, que comprende un biomaterial.
- 15 4. Sustituto óseo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **1 a 3**, **caracterizado por que** el biomaterial comprende uno o varios material(es) seleccionado(s) en el grupo compuesto por el titanio, el colágeno, el hueso desproteinizado y/o desmineralizado, el coral, la cerámica de fosfato de calcio, la hidroxiapatita, el beta fosfato tricálcico y los vidrios bioactivos.
- 20 5. Sustituto óseo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **1 a 4**, **caracterizado por que** comprende, además, uno o varios factores de crecimiento seleccionado(s) en el grupo compuesto por los Fibroblast Growth Factors (FGFs), los Transforming Growth Factors (TGFs), los Insulin Growth Factors I (IGFs), los Platelet Derived Growth Factors (PDGFs), las Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) y los Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs).
- 25 6. Sustituto óseo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **1 a 5**, **caracterizado por que** comprende, además, una o varias citoquinas seleccionada(s) en el grupo compuesto por la interleucina 1, la interleucina 4, la interleucina 6, el Tumor Necrosis Factor alfa, el Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor y el Macrophage Colony-Stimulating Factor.
- 30 7. Sustituto óseo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **1 a 6**, **caracterizado por que** la superficie del denominado biomaterial presenta un revestimiento que comprende dichos fucanos.
- 35 8. Sustituto óseo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **1 a 7**, **caracterizado por que** dicho biomaterial está impregnado con dichos fucanos.
- 40 9. Sustituto óseo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **1 a 8**, **caracterizado por que** comprende, además, unas células osteocomponentes procedentes de la médula ósea, del hueso o del periostio.
- 40 10. Procedimiento de preparación de sustituto óseo de acuerdo con la reivindicación **7**, **caracterizado por que** la superficie de dicho biomaterial está recubierta por un revestimiento que comprende dichos fucanos.
- 45 11. Procedimiento de preparación de sustituto óseo de acuerdo con la reivindicación **8**, **caracterizado por que** dicho biomaterial está impregnado con dichos fucanos.
- 45 12. Procedimiento de preparación de sustituto óseo de acuerdo con la reivindicación **9**, **caracterizado por que** se procede a la colonización de un sustituto óseo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **1 a 8**, por unas células osteocomponentes procedentes de la médula ósea, del hueso o del periostio.
- 50 13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación **12**, **caracterizado por que** las células osteocomponentes procedentes de la médula ósea, del hueso o del periostio se cultivan en un medio de cultivo que comprende unos fucanos que presentan una masa molar media en peso comprendida entre 5.000 y 100.000 g/mol, en particular comprendida entre 10.000 y 40.000 g/mol.
- 55 14. Medio de cultivo para un tipo de célula seleccionada en el grupo compuesto por células osteocomponentes procedentes de la médula ósea, del hueso o del periostio, que comprende unos fucanos que presentan una masa molar media en peso comprendida entre 5.000 y 100.000 g/mol, en particular comprendida entre 10.000 y 40.000 g/mol.
- 60 15. Medio de cultivo de acuerdo con la reivindicación **14**, **caracterizado por que** comprende, además, uno o varios factores de crecimiento seleccionado(s) en el grupo compuesto por los Fibroblast Growth Factors (FGFs), los Transforming Growth Factors (TGFs), los Insulin Growth Factors I (IGFs), los Platelet Derived Growth Factors (PDGFs), las Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) y los Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs).
- 65 16. Procedimiento de cultivo de células seleccionadas en el grupo de las células osteocomponentes procedentes de la médula ósea, del hueso o del periostio, **caracterizado por que** dichas células se cultivan en el medio de cultivo de acuerdo con la reivindicación **15 o 16**.
- 65 17. Procedimiento de cultivo de células seleccionadas en el grupo de las células osteocomponentes procedentes de

la médula ósea, del hueso y del periostio, **caracterizado por que** dichas células se cultivan sobre el sustituto óseo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **1 a 9**.

5 18. Dispositivo médico que presenta una actividad sobre la regeneración ósea, que comprende unos fucanos que presentan una masa molar media en peso comprendida entre 5.000 y 100.000 g/mol, en particular comprendida entre 10.0000 y 40.000 g/mol.

10 19. Dispositivo médico de acuerdo con la reivindicación **18**, que comprende uno o varios factores de crecimiento seleccionado(s) en el grupo compuesto por los Fibroblast Growth Factors (FGFs), los Transforming Growth Factors (TGFs), los Insulin Growth Factors I (IGFs), los Platelet Derived Growth Factors (PDGFs), las Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) y los Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs).

20. Dispositivo médico de acuerdo con la reivindicación **18** o la reivindicación **19**, que comprende un sustituto óseo tal como se ha definido en una de las reivindicaciones **1 a 9**.

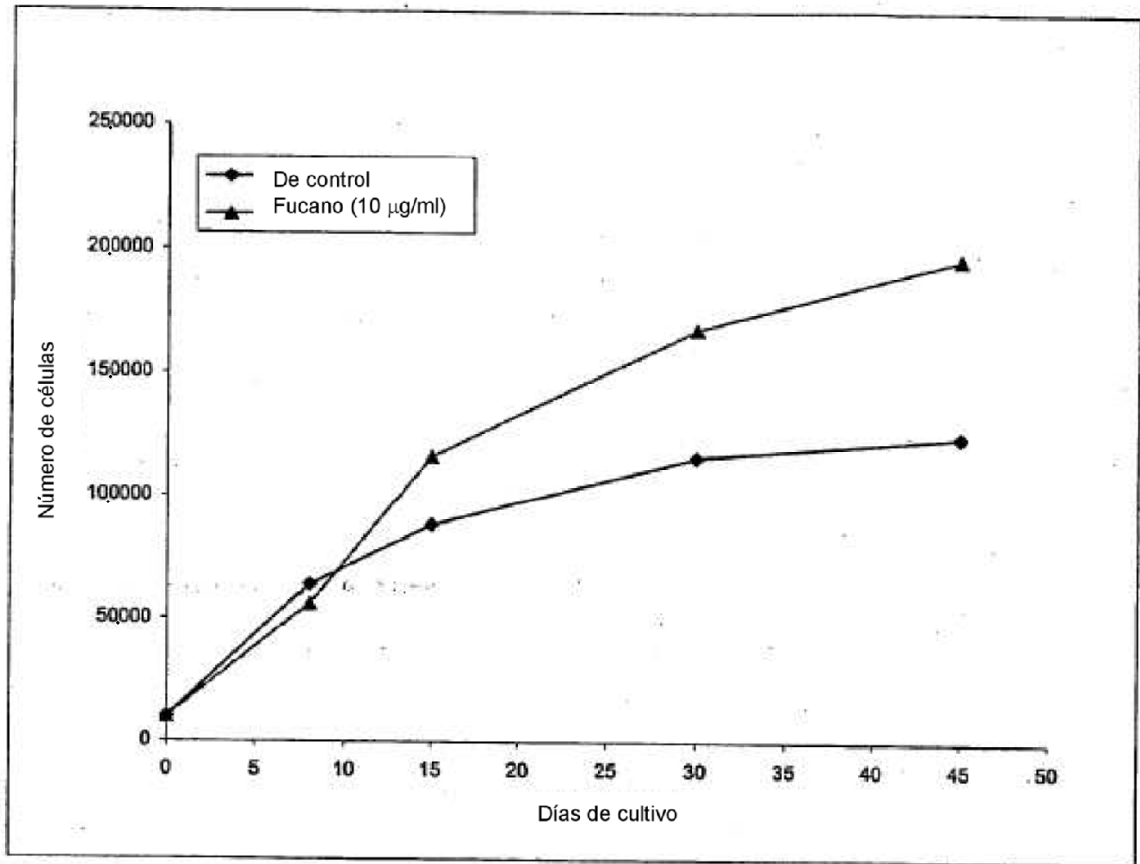


FIGURA 1

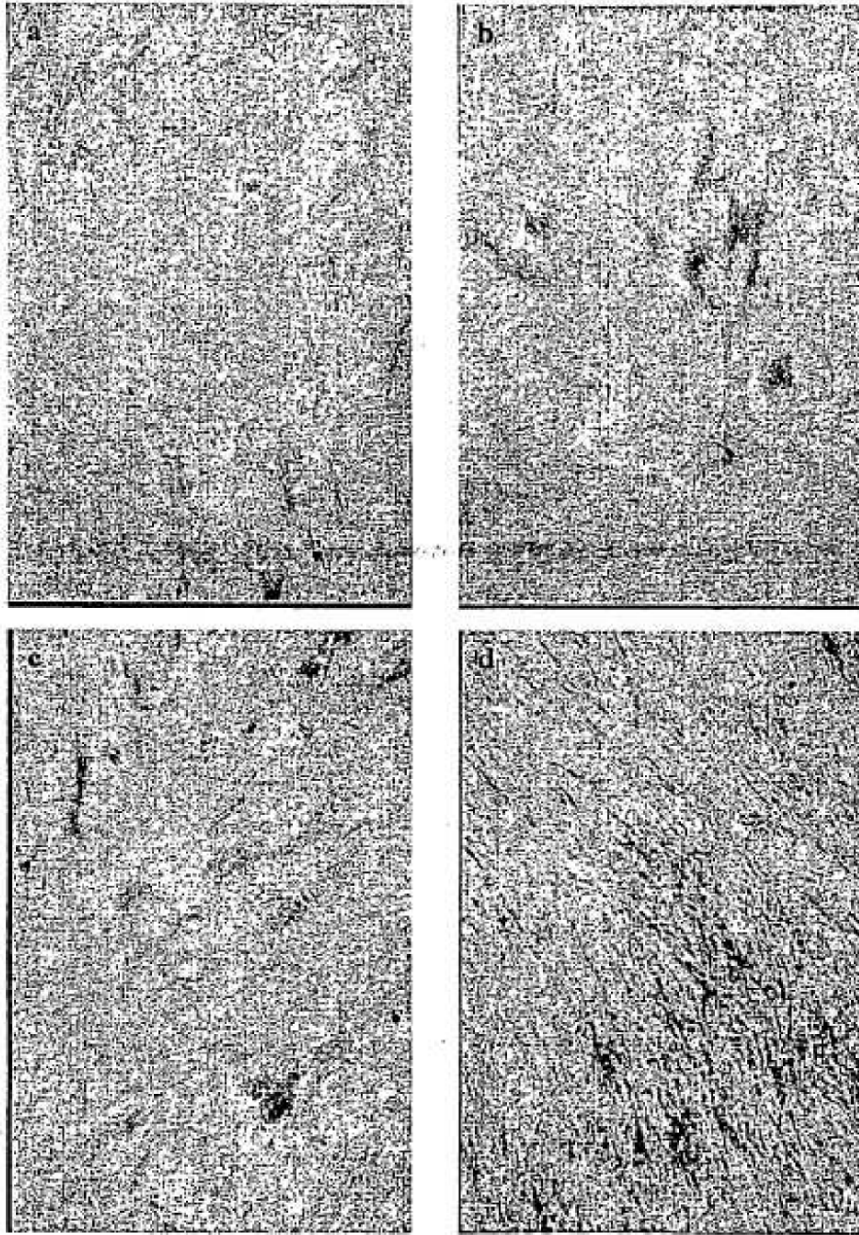


FIGURA 2

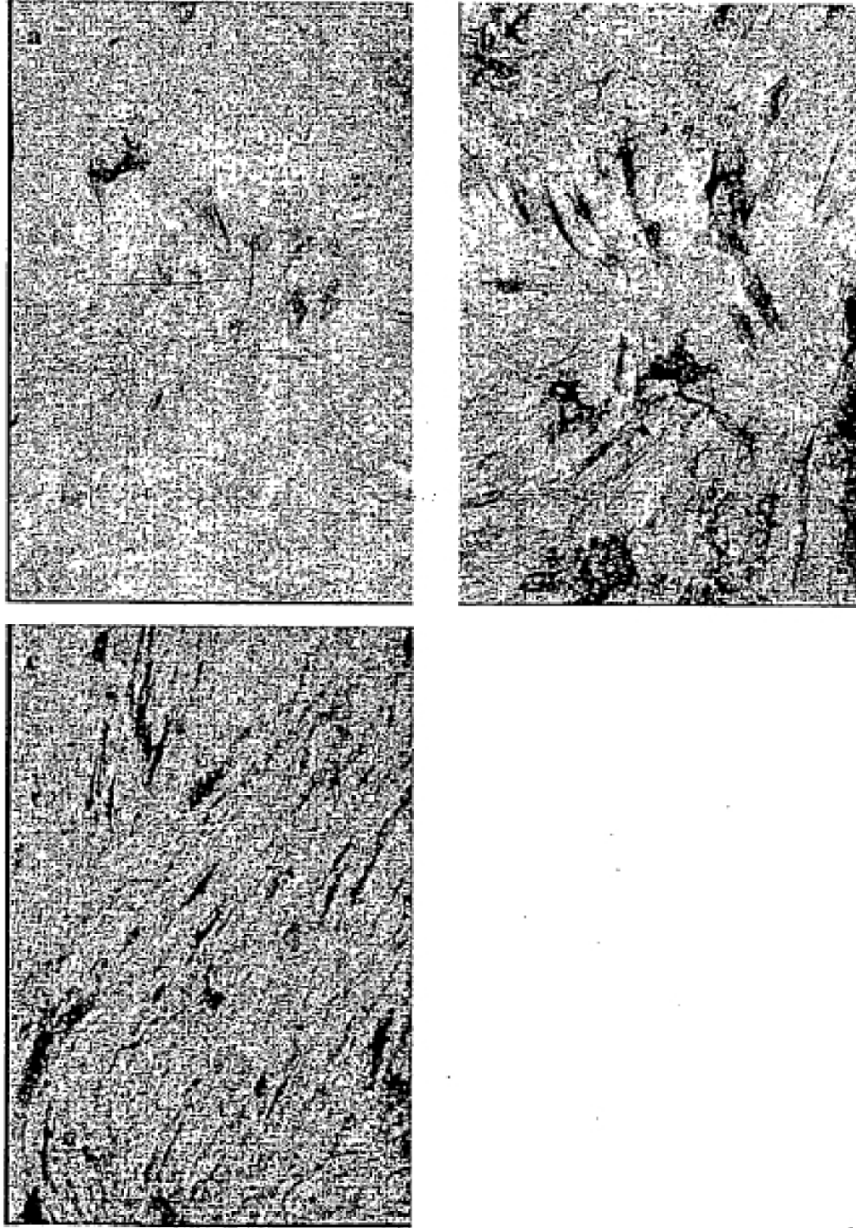


FIGURA 3

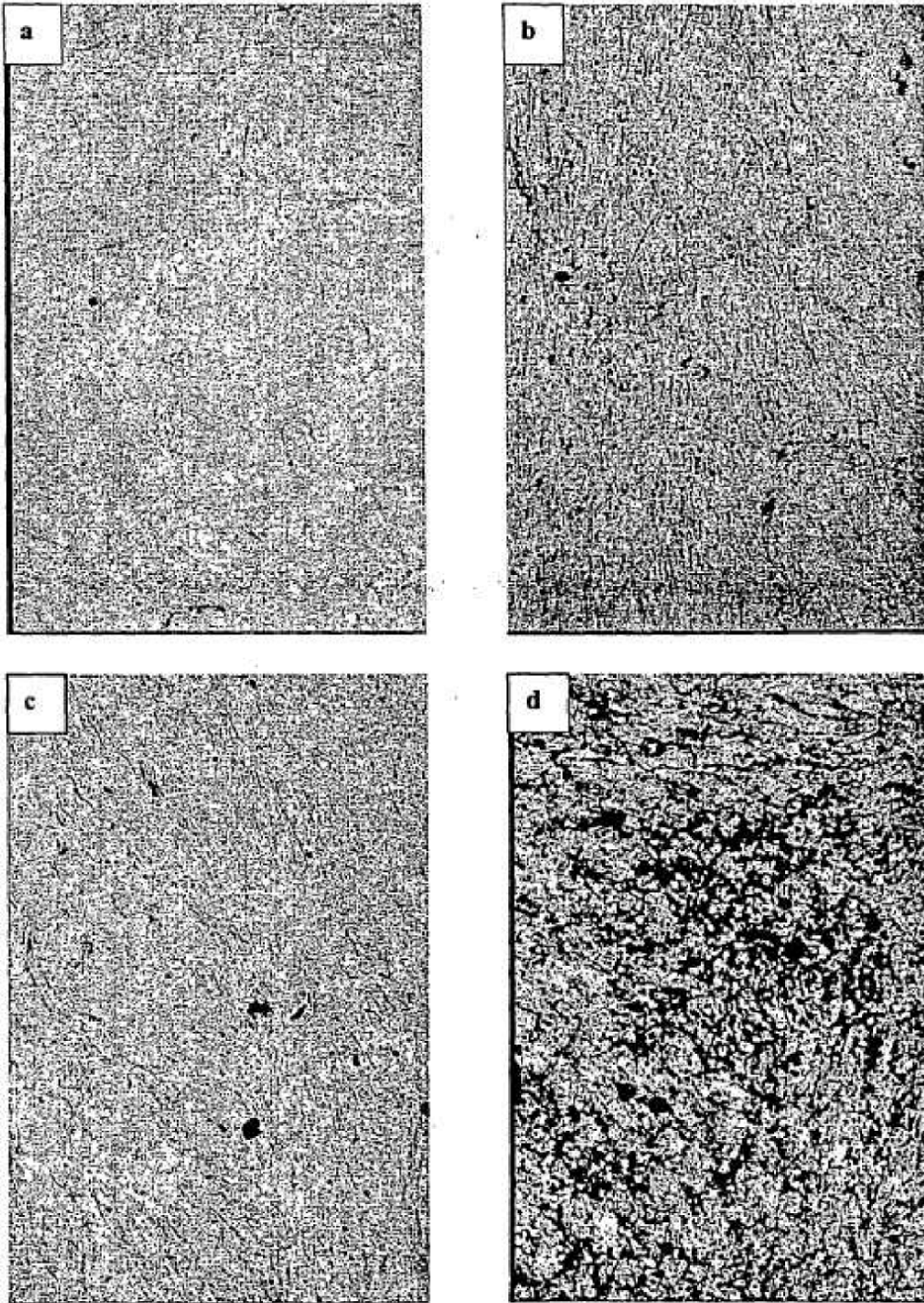


FIGURA 4

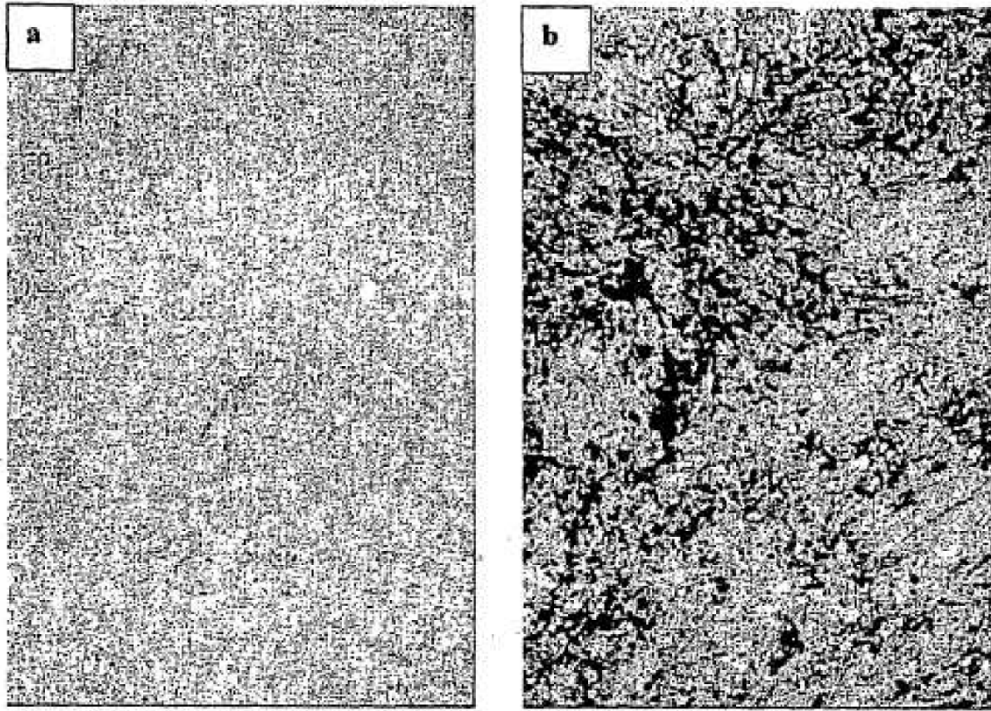


FIGURA 5

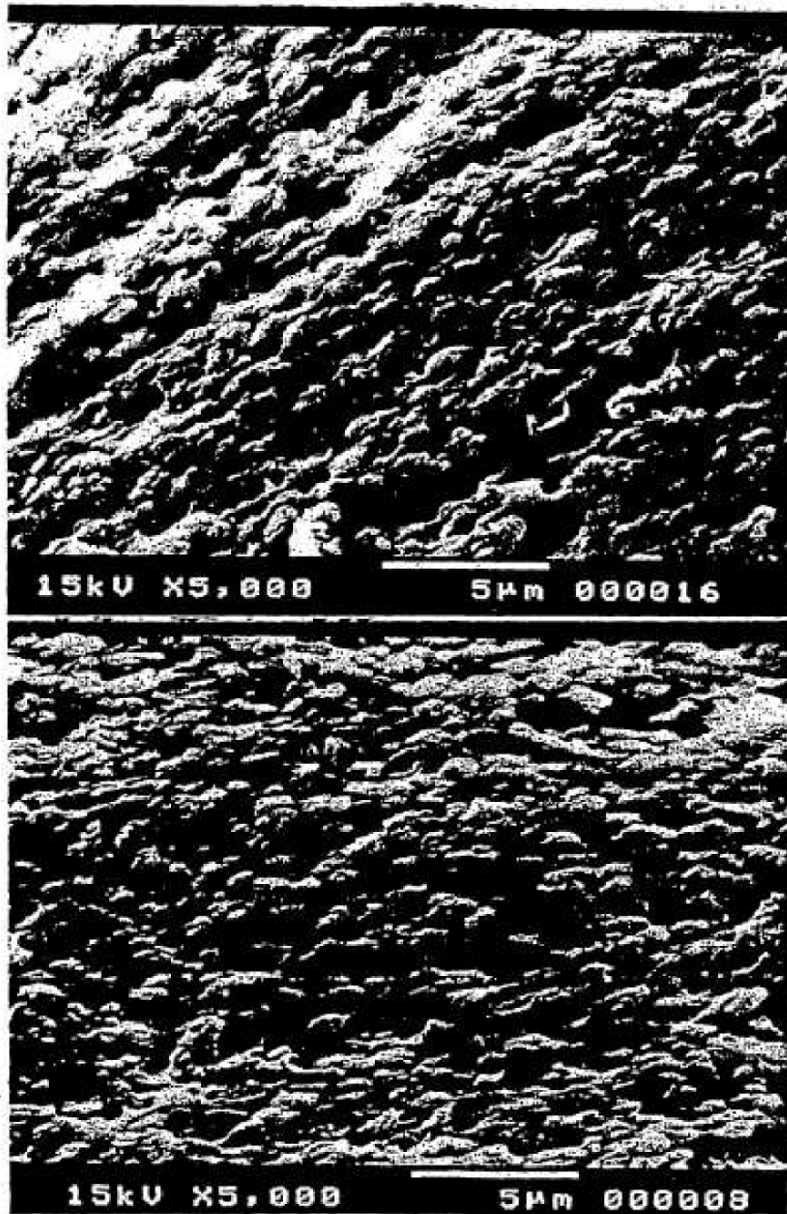


FIGURA 6

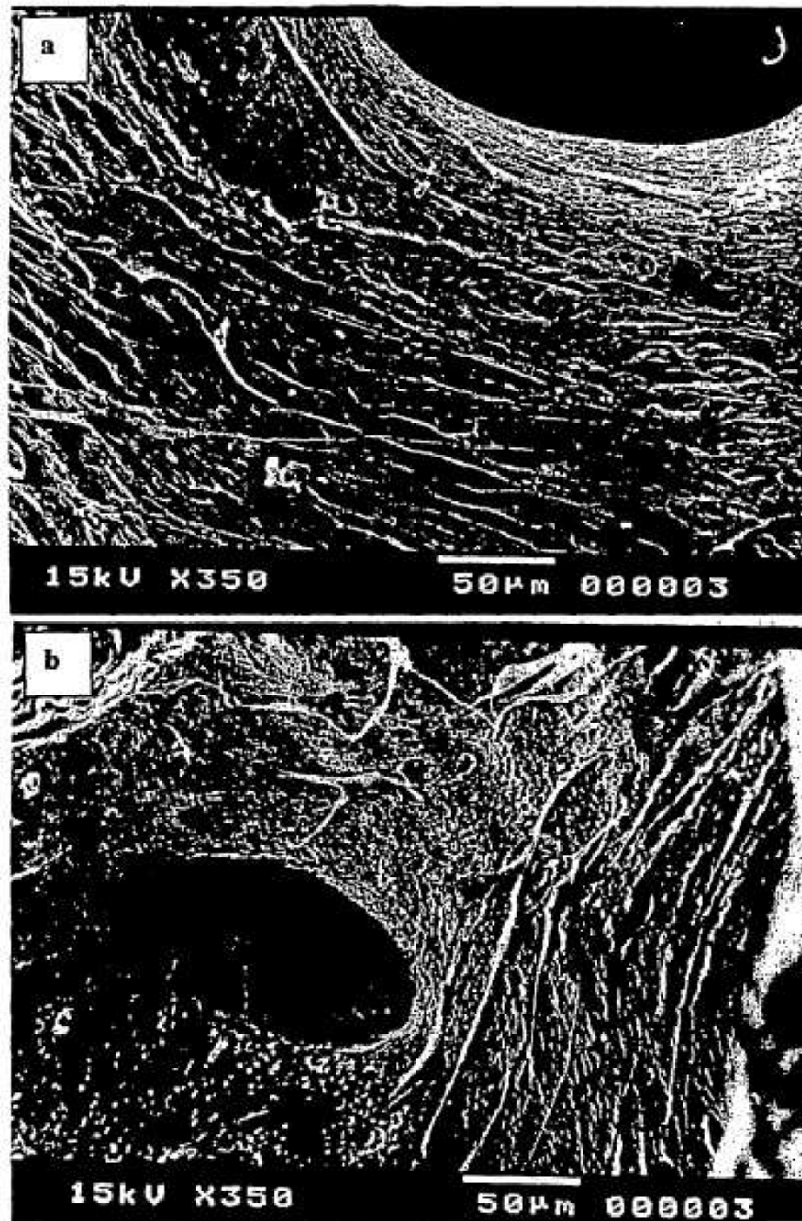


FIGURA 7

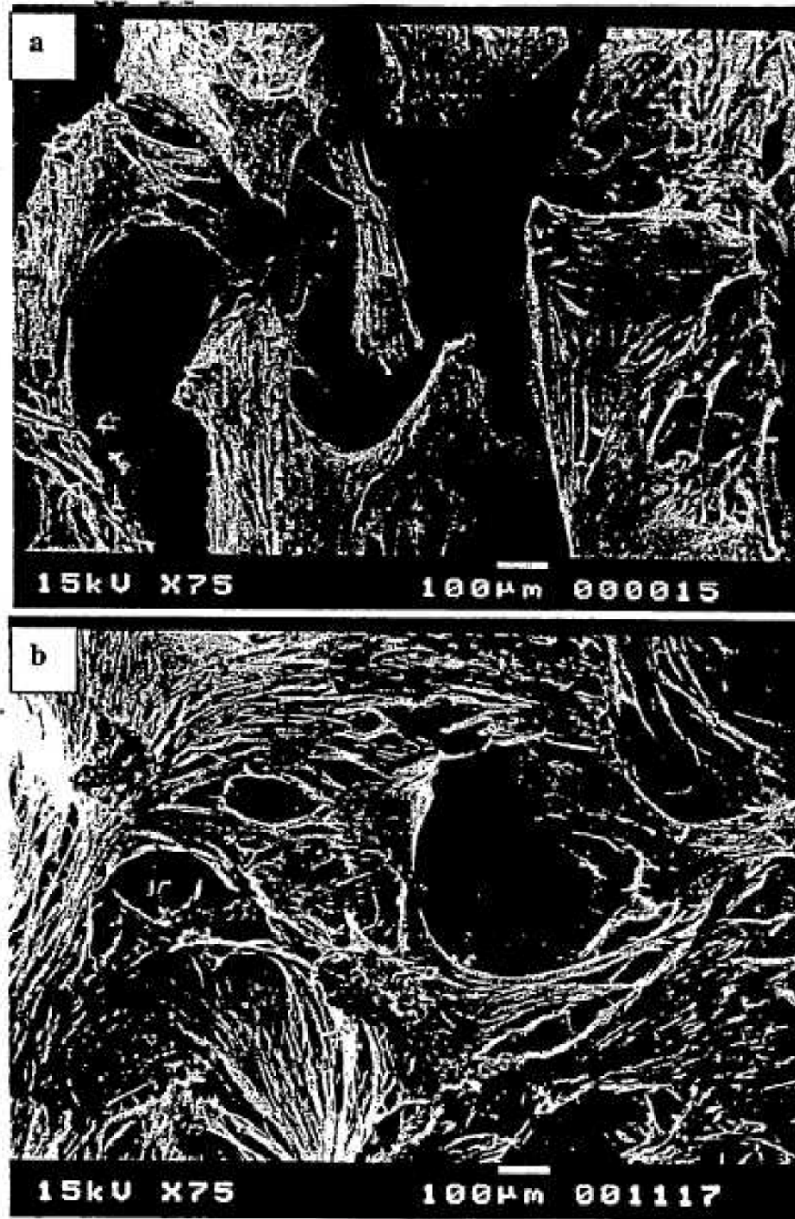


FIGURA 8

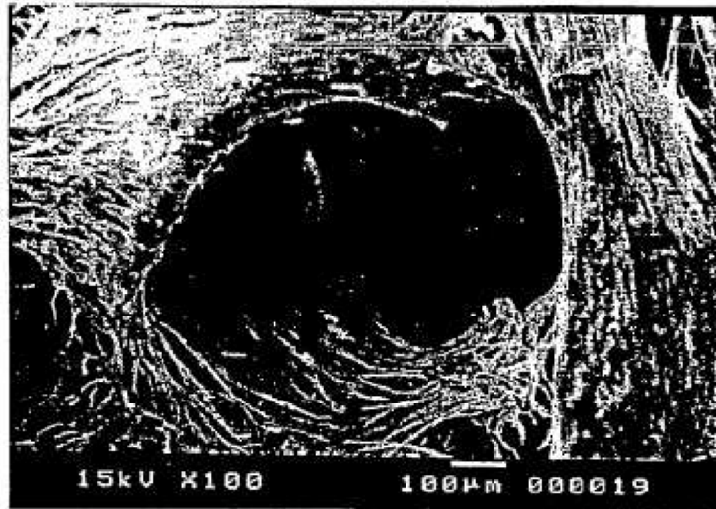


FIGURA 9

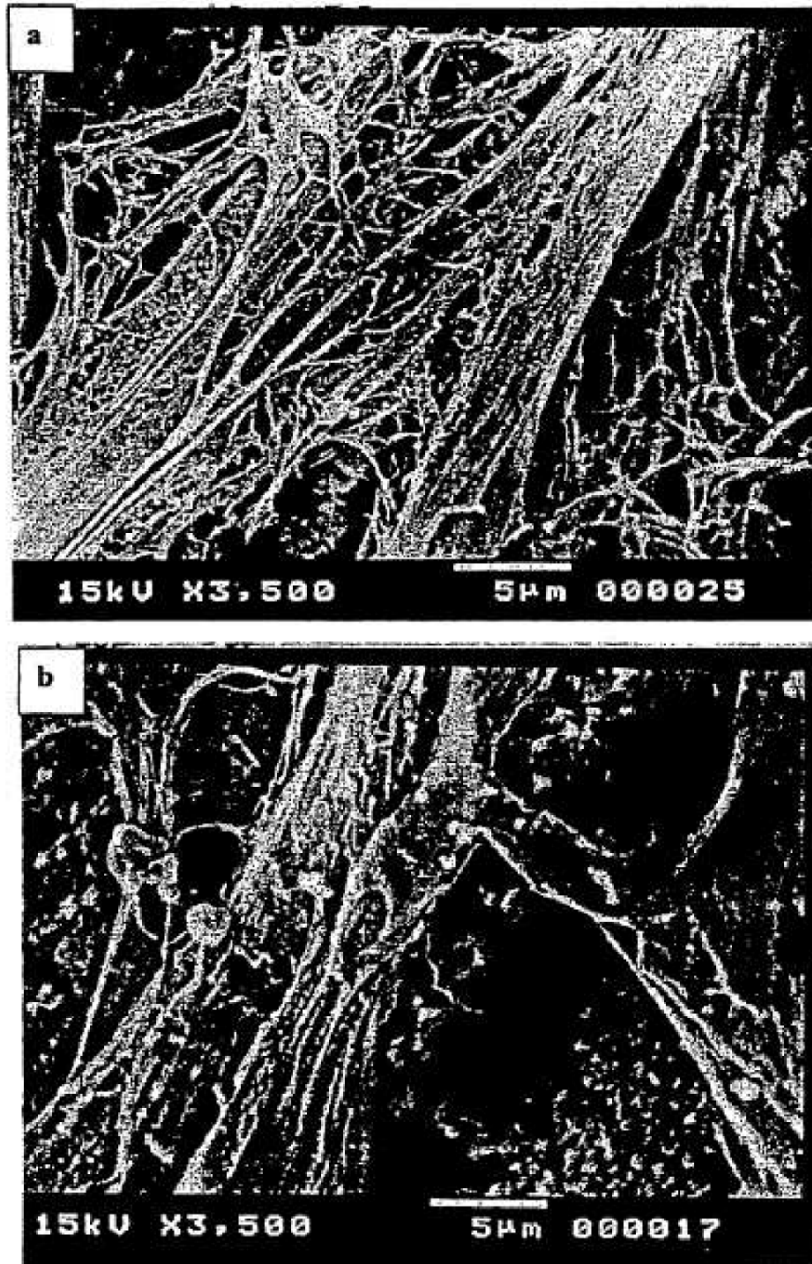


FIGURA 10