(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
19 de abril de 2018 (19.04.2018)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2018/069563 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
A61L 27/22 (2006.01) *A61L 27/20* (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01) *A61L 27/38* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2017/070680

(22) Fecha de presentación internacional:
13 de octubre de 2017 (13.10.2017)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201631327 14 de octubre de 2016 (14.10.2016) ES

(71) Solicitantes: **UNIVERSIDAD DE GRANADA** [ES/ES]; HOSPITAL REAL., AVDA. DEL HOSPICIO S/N, 18071 GRANADA (ES). **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avda. de la Constitución, 18, 41071 Sevilla (ES).

(72) Inventores: **CARRIEL ARAYA, Víctor Sebastián**; UNIVERSIDAD DE GRANADA, Departamento de Histología, Facultad de Medicina, 18071 Granada (ES). **CAMPOS SÁNCHEZ, Fernando**; UNIVERSIDAD DE GRANADA, Departamento de Histología, Facultad de Medicina, 18071 Granada (ES). **FERNÁNDEZ VALADÉS, Ricardo**; FUNDACIÓN PÚBLICA PARA LA INVESTIGACIÓN BIOSANITARIA DE ANDALUCIA ORIENTAL ALEJANDRO OTERO (FIBAO), Hospital Universitario Virgen de las Nieves., Avda. de las Fuerzas Armadas, 2, 18014 Granada (ES). **LÓPEZ LÓPEZ, Modesto Torcuato**; UNIVERSIDAD DE GRANADA, Departamento de Física Aplicada, Facultad de Ciencias, 18071 Granada (ES). **SÁNCHEZ QUEVEDO, María del Carmen**; UNIVERSIDAD DE GRANADA, Departamento de Histología, Facultad de Medicina, 18071 Granada (ES). **ALAMINOS MINGORANCE, Miguel**; UNIVERSIDAD DE GRANADA, Departamento de Histología, Facultad de Medicina, 18071 Granada (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:
— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

WO 2018/069563 A1

(54) **Title:** BIOARTIFICIAL MEMBRANES HAVING CONTROLLED VISCOELASTICITY AND RIGIDITY FOR USE IN TISSUE ENGINEERING

(54) **Título:** MEMBRANAS BIOARTIFICIALES DE RIGIDEZ Y VISCOELASTICIDAD CONTROLADA PARA SU UTILIZACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR

(57) **Abstract:** The present invention belongs to the field of biomedicine and tissue engineering. Specifically, it relates to a biomaterial and to an *in vitro* method for preparing a tissue or bioartificial membrane having controlled elasticity and rigidity, and to the tissue or artificial membrane obtainable using the method. The invention further relates to the uses thereof in medicine.

(57) **Resumen:** La presente invención se enmarca en el campo de la biomedicina e ingeniería tisular. Específicamente, se refiere a un biomaterial y un método *in vitro* de preparación de un tejido o membrana bioartificial de rigidez y elasticidad controlada y al tejido ola membrana artificial obtenible por dicho método. También se refiere a sus usos en medicina.

MEMBRANAS BIOARTIFICIALES DE RIGIDEZ Y VISCOELASTICIDAD CONTROLADA PARA SU UTILIZACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR

La presente invención se enmarca en el campo de la biomedicina e ingeniería tisular. Específicamente, se refiere a un biomaterial y un método *in vitro* de preparación de un tejido o membrana bioartificial de rigidez y elasticidad controlada y al tejido o la membrana artificial obtenible por dicho método. También se refiere a sus usos en medicina. Estos tejidos y membranas presentan las propiedades biológicas y químicas para su utilización en ingeniería tisular (IT).

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La IT es un área emergente en la investigación biomédica, que a través de la utilización de células, factores de crecimiento y biomateriales permite la generación de tejidos artificiales para restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de los propios tejidos orgánicos. En este sentido, los biomateriales juegan un rol fundamental, ya que otorgan las propiedades físico-químicas y estructurales a los tejidos generados por IT. Además, algunos biomateriales pueden promover algunas funciones celulares como por ejemplo la proliferación, migración y diferenciación. En general los biomateriales utilizados en IT pueden ser de origen sintético, natural y/o una combinación de estos componentes (Williams DF. Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5. Elsevier. 1987), siendo los biomateriales naturales más eficientes y biocompatibles que los sintéticos.

Actualmente, para que un biomaterial pueda ser utilizado en IT, estos deben cumplir una serie de requisitos, siento fundamental su biocompatibilidad, no ser tóxicos, química y mecánicamente estables, porosos, y en algunos casos biodegradables o reabsorbibles, y por último que permitan adaptar sus propiedades estructurales y físicas de acuerdo a necesidades específicas (Cardona *et al.,* 2011. Cornea. 30: 1428-1435).

Uno de los polímeros naturales más utilizados en IT, es la fibrina, la cual es una proteína biodegradable que participa en el proceso natural de reparación tisular después de una lesión. Con este biomaterial se han generado sustitutos de piel humana, mucosa oral y nervios periféricos (Meana *et al.,* 1998. *Burns* 24: 621-630; San Martín *et al.,* 2013. *J Tissue Eng Regen Med.* 2013;7: 10-19; Kalbermatten *et al.,* 2009. *J Reconstr Microsurg*. 25(1):27-33). Además, la fibrina sirvió de base estructural para la generación de hidrogeles de fibrina-agarosa (FA), con la cual se han desarrollado modelos de córnea, piel, mucosa oral, nervio periférico, vejiga y cartílago (Alaminos *et al.,* 2006 *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47: 3311-3317; Carriel *et al.,* 2012. Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. *Cells Tissues Organs,* 196, 1-12; Rodríguez IA *et al.,* 2012 *J*

Tissue Eng Regen Med. 6: 636-644; Carriel *et al.,* 2013 2013. Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *J Neural Eng,* 10, 026022). Si bien, la fibrina y la FA han mostrado resultados muy positivos en diversos modelos tisulares, es preciso incrementar sus propiedades físicas para poder ampliar su uso en IT, especialmente en aquellos casos en que es necesaria la utilización de biomateriales más resistentes (tejido óseo, reparación de pared abdominal, generación de conductos biodegradables, tendones etc.).

En la actualidad se han desarrollado diversas técnicas (físicas y químicas) para mejorar las propiedades biomecánicas de los biomateriales, como son las técnicas de nanostructuración y cross-linking. La técnica de nanoestructuración, desarrollada por los inventores de la presente invención, demostró que es posible regular las características estructurales, incrementar las propiedades biomecánicas y conservar las propiedades biológicas de la FA a través de un proceso de compresión y deshidratación controlada (Ionescu *et al.,* 2011. *J Mech Behav Biomed Mater* 4: 1963-197; Scionti *et al.,* 2014. *J Biomed Mater Res.* 102: 2573-25823). Por el contrario, las técnicas químicas de cross-linking promueven la formación de interacciones moleculares que conllevan a un incremento de las propiedades biomecánicas y cambios estructurales de los biomateriales. En este sentido, los agentes químicos más utilizados son los aldehídos (glutaraldehído, paraformaldehído, formaldehido), los cuales promueven uniones covalentes (puentes de metileno) entre diversas proteínas (Barnes *et al.,* 2007. *Tissue Eng*. 13: 1593-1605; Cheng *et al.,* 2013. *Tissue Eng Part A*. 19: 484-496). Sin embargo, los aldehídos son altamente tóxicos, lo cual limita su utilización en ingeniería tisular (Sung *et al.,* 1999.. *J Biomater Sci Polym Ed*. 10: 63-78; Mi *et al.,* 2001. *J Biomater Sci Polym Ed.* 12: 835-850; Mi *et al.,* 2002. *Biomaterials* 3: 181-191). Recientemente, se han descrito diversos agentes químicos o cross-linkers como el Genipin, el cual es extraído del fruto de *Gardenia jasminoide* (Yoo *et al.,* 2011. Korean J Thorac cardiovasc. 44: 197-207), se ha utilizado en la medicina tradicional china y como colorante azul por las industrias alimentarias.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Un **primer aspecto** de la invención se refiere a un biomaterial, de ahora en adelante biomaterial de la invención, que comprende:

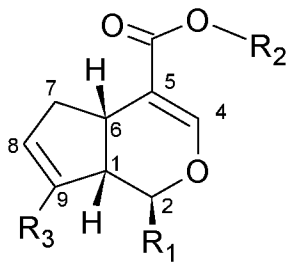
a) Fibrinógeno (o fibrina);

b) un agente antifibrinolítico;

c) un elemento que se seleciona de entre: un factor de coagulación, una fuente de calcio, trombina, o cualquiera de sus combinaciones;

d) un polisacárido; y

e) un compuesto de fórmula (I)



Fórmula (I)

o cualquiera de sus esteres, tautómeros y sales farmacéuticamente aceptables, donde:

- R_1 es -H, =O ó -OR_4, en donde R_4 es -H, alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-3}, o alcanoilo C_{1-12} que puede estar sustituido con fenilo, fenoxi, piridilo o tienilo;
- R_2 es H, alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-3}, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, w-butilo, i-butilo, isobutilo, o sec-butilo;
- R_3 es un alcohol primario seleccionado entre -CH_2-OH y -R_5-CH_2-OH, donde -R_5- es alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-3}, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *n*-butilo, *t*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo.

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a un tejido artificial, de ahora en adelante tejido artificial de la invención, que comprende el biomaterial de la invención, y además comprende células de un mamífero.

Un **tercer aspecto** se refiere al uso del biomaterial o del tejido de la invención en la elaboración de un medicamento, o alternativamente, al biomaterial o el tejido de la invención para su uso en medicina.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere al uso del biomaterial o del tejido de la invención en la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado, o alternativamente, al biomaterial o del tejido de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado.

Un **sexto aspecto** de la invención se refiere a a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención.

Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere a un método para elaborar el tejido artificial de la invención que comprende:

a) añadir un agente antifibrinolítico a una composición que comprende fibrinógeno (o fibrina);

b) añadir, al menos, un factor de coagulación, una fuente de calcio, trombina, o cualquier combinación de los anteriores al producto resultante del paso (a);

c) añadir una composición que comprende un polisacárido, al producto resultante del paso (b), y dejar gelificar;

d) someter el producto resultante del paso (c) a un proceso de nanoestructuración controlada;

e) inducir el cross-linking con un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito en el primer aspecto de la invención, del resultante del paso (b) y/o (d);

f) sembrar los productos del paso (c) y/o (e) con células de un mamífero.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Típica dependencia del esfuerzo de corte en función de la deformación de corte para los hidrogeles preparados.

Fig. 2. Típica dependencia de los módulos viscoelásticos con la amplitud de deformación para medidas en régimen dinámico (oscilaciones sinusoidales de frecuencia igual a 1 Hz).

Fig. 3. Típica dependencia de los módulos viscoelásticos con la frecuencia de deformación para medidas en régimen dinámico (oscilaciones sinusoidales de frecuencia amplitud perteneciente a la zona viscoelástica lineal).

Fig. 4. Valor del módulo de rigidez de los hidrogeles preparados (no nanoestructurados –FAH (■)- y nanoestructurados –NFAH (•)-) en función de la concentración de agente químico Genipin.

Fig. 5. Valor del módulo elástico correspondiente a la zona viscoelástica lineal (correspondiente a una deformación de corte de 0.01 y una frecuencia de 1Hz) de los hidrogeles preparados (no nanoestructurados –FAH (■)- y nanoestructurados –NFAH (•)-) en función de la concentración de agente químico Genipin.

Fig. 6. Valor del módulo viscoso correspondiente a la zona viscoelástica lineal (correspondiente a una deformación de corte de 0.01 y una frecuencia de 1Hz) de los hidrogeles preparados (no nanoestructurados –FAH (■) - y nanoestructurados –NFAH (•)-) en función de la concentración de agente químico Genipin.

Fig, 7. Microscopía electrónica de barrido de hidrogeles de fibrina-agarosa. FAH (■) muestra los geles no nanoestructurados, mientras que NFAH (•) muestra aquellos hidrogeles sometidos a nanoestructuración controlada. FA-CTR muestra los constructos sin cross-linking con Genipin, mientras que GEN muestran el patrón característicos de los hidrogeles sometidos a cross-linking con Genipin a 0,5 y 0,75% respectivamente.

Fig. 8. Imágenes representativas del análisis histológico *ex vivo* de los constructos de FA-CTR y CTR sometidos a cross-linking con Genipin.

Fig. 9. Análisis morfológico de viabilidad celular *live-dead* por microscopía de fluorescencia. Este test muestra las células viables y metabólicamente activas en verde, mientras que las células muertas se observan en rojo.

Fig. 11. Corte histológico de la piel de ratas Wistar control, que muestra la estructura normal de la piel. Escala 200 µm

Fig. 12. Muestra de la zona de implantación de hidrogel de fibrina agarosa tras 12 días. Tinción picrosirius. Escala. 200 µm

Fig. 13. Muestra de la zona de implantación de hidrogel de fibrina agarosa tras 12 días. Tinción H2A. Escala. 50 µm

Fig. 14. Muestra de la zona de implantación de hidrogel de fibrina agarosa tras 26 días. Tinción H2A. Escala. 200 µm

Fig. 15. Muestra de la zona de implantación de hidrogel de fibrina agarosa tras 26 días. Tinción picrosirius. Escala. 200 µm

Fig. 16. Muestra de la zona de implantación de hidrogel de fibrina agarosa con GP 0,1% tras 12 días. Tinción H2A. Escala. 200 µmç

Fig. 17. Muestra de la zona de implantación de hidrogel de fibrina agarosa con GP 0,1% tras 12 días. Tinción picrosirius. Escala. 50 µm

Fig. 18. Muestra de la zona de implantación de hidrogel de fibrina agarosa con GP 0,1% tras 26 días. Tinción H2A. Escala. 200 µm

Fig. 19. Muestra de la zona de implantación de hidrogel de fibrina agarosa con GP 0,1% tras 26 días. Tinción H2A. Escala. 50 µm

Fig. 20. Muestra de la zona de implantación de hidrogel de fibrina agarosa con GP 0,25% tras 12 días. Tinción H2A. Escala. 200 µm

Fig. 21. Muestra de la zona de implantación de hidrogel de fibrina agarosa con GP 0,25% tras 12 días. Tinción H2A. Escala. 50 µm

Fig. 22. Muestra de la zona de implantación de hidrogel de fibrina agarosa con GP 0,25% tras 26 días. Tinción H2A. Escala. 500 µm

Fig. 23. Muestra de la zona de implantación de hidrogel de fibrina agarosa con GP 0,25% tras 26 días. Tinción H2A. Escala. 50 µm

DESCRIPCIÓN DETALLADA

El Genipin, o *[Metil (1R,2R,6S)-2-hidroxi-9-(hidroximetil)-3-oxabiciclo[4.3.0]nona-4,8-dieno-5-carboxilato],* es un agente químico o cross-linker extraído habitualmente del fruto de *Gardenia jasminoide* que se caracteriza por presentar una baja citotoxicidad, y promueve un incremento en las propiedades biomecánicas de diversas matrices (Somers et al., 2008. J Heart Valve Dis. 17: 682-688; Chang et al., 2005. J Biotechnol.120: 207-21933).

Los autores de la presente invención han diseñado un método de síntesis de un biomaterial, que incluye la adición de compuestos de fórmula (I), y preferiblemente Genipin, como agente químico para el *cross-linking,* y cuya estructura tridimensional proporciona un soporte (scaffold) adecuado para la adherencia, proliferación y diferenciación celular en condiciones de cultivo adecuadas.

BIOMATERIAL DE LA INVENCIÓN

Un **primer aspecto** de la invención se refiere a un biomaterial, de ahora en adelante biomaterial de la invención, que comprende:

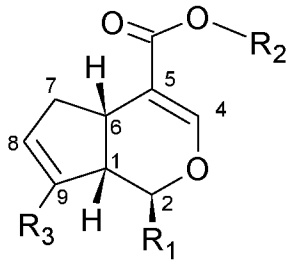
a) Fibrinógeno (o fibrina);

b) un agente antifibrinolítico;

c) un elemento que se seleciona de entre: un factor de coagulación, una fuente de calcio, trombina, o cualquiera de sus combinaciones;

d) un polisacárido;

e) un compuesto de fórmula (I)



Fórmula (I)

o cualquiera de sus esteres, tautómeros y sales farmacéuticamente aceptables, donde:

- R_1 es -H, =O ó -OR_4, en donde R_4 es -H, alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-3}, o alcanoilo C_{1-12} que puede estar sustituido con fenilo, fenoxi, piridilo o tienilo;
- R_2 es H, alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-3}, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, w-butilo, i-butilo, isobutilo, o sec-butilo;
- R_3 es un alcohol primario seleccionado entre -CH_2-OH y -R_5-CH_2-OH, donde -R_5- es alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-3}, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *n*-butilo, *t*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo.

En otra realización preferida, el biomaterial de la invención **consiste** en:

a) Fibrinógeno (o fibrina) según se ha descrito anteriormente,

b) un agente antifibrinolítico, preferiblemente según se ha descrito anteriormente,

c) un elemento que se selecciona de entre: un factor de coagulación, una fuente de calcio según se ha descrito anteriormente;

d) un polisacárido según se ha descrito anteriormente,

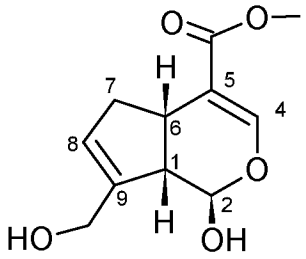
e) un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito anteriormente;

En esta memoria se entiende por "biomaterial" materiales aptos para entrar en contacto con los tejidos de un sujeto con propósitos terapéuticos específicos, de diagnóstico, o con propósitos preventivos, o bien que puedan sustituir un tejido. Estos materiales deben ser biocompatibles, es decir, no deben causar ninguna respuesta adversa significativa del organismo vivo tras la interacción del biomaterial con los tejidos y fluidos corporales y, en ocasiones, debe biodegradarse, ya sea química o físicamente, o por una combinación de ambos procesos, para

dar origen a componentes no tóxicos. El biomaterial de acuerdo a la presente invención comprende fibrinógeno o fibrina, un polisacárido, y un compuesto de fórmula (I) tal y como se ha definido anteriormente.

Compuesto de fórmula (I)

En una realización preferida, en el compuesto (I) del biomaterial de la invención R_1 es $-OR_4$. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, R_4 es -H ó alquilo C_{1-3}. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, R_2 es H ó alquilo C_{1-3} y/o R_3 es $-CH_2$-OH, $-CH_2-CH_2$-OH, o $-CH_2-CH_2-CH_2$-OH. En otra realización más preferida de este aspecto de la invención, el compuesto empleado, Genipin, tiene fórmula (II):



Fórmula (II)

Fibrina

La formación de una matriz de fibrina tiene lugar por la polimerización del fibrinógeno inducida por trombina. El fibrinógeno es una proteína de elevado peso molecular que se encuentra presente en el plasma sanguíneo. La trombina es una enzima proteolítica que provoca la ruptura de la molécula de fibrinógeno en polipéptidos de bajo peso molecular y en monómeros de fibrina. Dichos monómeros polimerizan en dímeros y posteriormente se unen entre sí mediante enlaces covalentes, por acción del factor XIII, previamente activado por la trombina, y en presencia de iones de calcio.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el origen del fibrinógeno o la fibrina es el plasma sanguíneo. Más preferiblemente, el plasma sanguíneo es de origen autólogo. La composición del paso puede asimismo prepararse a partir de un derivado plasmático, como, por ejemplo, pero sin limitarse un crioprecipitado o un concentrado de fibrinógeno. Además de fibrinógeno, la composición puede contener otros factores de coagulación.

En una realización preferida, la concentración de fibrinógeno en el producto resultante es de entre 0,5 y 10 g/L, opcionalmente entre 1 y 10 g/L. En una realización más preferida, la concentración en el producto resultante es de entre 1 y 4 g/L, opcionalmente entre 2 y 4 g/L. No obstante, una concentración menor o mayor también podría emplearse.

Agente antifibrinolítico

El polímero de fibrina puede degradarse mediante el proceso denominado fibrinólisis. Durante la fibrinólisis, el plasminógeno es convertido en la enzima activa plasmina, por el activador tisular del plasminógeno; la plasmina se une a la superficie de la fibrina a través de sus sitios de unión, para producir la degradación del polímero de fibrina. Para evitar la fibrinólisis de la matriz de

fibrina, en el paso (b) de la presente invención se añade un agente antifibrinolítico como, por ejemplo, pero sin limitarse, ácido épsilon aminocaproico, ácido tranexámico o aprotinina.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el agente antifibrinolítico de (II) es ácido tranexámico.

El ácido tranexámico es un producto sintético derivado del aminoácido lisina con gran afinidad por los sitios de unión de lisina del plasminógeno; bloquea estos sitios y previene la unión del plasminógeno activado a la superficie de fibrina, ejerciendo un efecto antifibrinolítico. El ácido tranexámico tiene la ventaja, frente a otros agentes antifibrinolíticos de origen animal, de que no transmite enfermedades. Por tanto, en una realización preferida, el agente antifibrinolítico es el ácido tranexámico. En una realización aún más preferida, la concentración de ácido tranexámico en el producto resultante del paso (e) es de entre 0,5 y 2 g/L, preferiblemente entre 1 y 2 g/L. No obstante, una concentración menor o mayor también podría emplearse.

Fuente de calcio

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la fuente de calcio es una sal de calcio. Más preferiblemente, la sal de calcio es cloruro cálcico.

La concentración de la sal de calcio deberá ser suficiente para inducir la polimerización del fibrinógeno. En una realización más preferida, la sal de calcio es cloruro cálcico. En una realización aún más preferida, la concentración de cloruro de calcio en el producto resultante es de entre 0,25 y 3 g/L, opcionalmente entre 0,5 y 4 g/L. No obstante, una concentración menor o mayor también podría emplearse.

Polisacárido

Las matrices de fibrina son muy versátiles, por lo que se han empleado para la elaboración de diferentes tejidos artificiales, sin embargo, la utilización clínica de las mismas se ha visto limitada debido al hecho, fundamentalmente, de su escasa consistencia, su difícil manipulación y su enorme fragilidad. Por ese motivo, se añade un polisacárido. En general, dicho polisacárido se emplea para aportar resistencia y consistencia al tejido, y es conveniente que sea soluble en el mismo. Ejemplos de polisacáridos que pueden emplearse son pero, sin limitarse, agar-agar, agarosa, alginato, quitosano o carragenatos, o cualquier combinación de los anteriores.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el polisacárido es agarosa. Aún más preferiblemente, la agarosa es de tipo VII.

La agarosa es un polisacárido formado por galactosas alfa y beta que se extrae de algas de géneros como Gellidium o Graduaría. La agarosa, frente a otros polisacáridos que pueden ser empleados en el paso (e) de la presente invención, tiene la ventaja de que forma una matriz inerte desde el punto de vista inmunológico. Por tanto, en una realización preferida, el polisacárido de la invención es agarosa. Existen diferentes tipos de agarosa que varían en sus propiedades físicas y químicas como, por ejemplo, la temperatura de gelificación, la fuerza del gel y/o la porosidad. Preferiblemente, la agarosa es una agarosa con un punto de fusión bajo, es

decir, una agarosa que se repolimerice y solidifique a una temperatura, preferiblemente, menor de 65 °C y, más preferiblemente, menor de 40°C; de esta manera puede emplearse para preparar el tejido a temperaturas muy bajas, minimizando la probabilidad de muerte celular. En una realización más preferida, la agarosa empleada es de tipo VII. En una realización aún más preferida, la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, en el producto resultante está a una concentración, ventajosamente, de entre 0, 1 y 6 g/L, opcionalmente entre 0,2 y 6 g/L, preferiblemente, de entre 0,15 y 3 g/L, opcionalmente entre 0,3 y 3 g/L y más preferiblemente, de entre 0,25 y 2 g/L, opcionalmente entre 0,5 y 2 g/L. No obstante, una concentración menor o mayor también podría emplearse.

Proteína, preferiblemente colágeno

En otra realización preferida, el biomaterial de la invención además comprende una proteína. Más preferiblemente la proteína se selecciona de entre fibronectina, colágeno, o su combinación. Aún más preferiblemente, la proteína es colágeno, y aún más preferiblemente, colágeno tipo I. Ejemplos de proteínas que pueden emplearse son, pero sin limitarse a, colágeno, reticulina o elastina. La adición de una proteína da lugar a tejidos que presentan una mayor densidad fibrilar a nivel del estroma, un mejor comportamiento viscolástico y un esfuerzo umbral creciente.

Las principales propiedades reológicas de un material sólido o semisólido son la viscosidad y la elasticidad. La viscosidad es la resistencia que ofrece un fluido a la deformación tangencial, y sería equivalente a la consistencia o la rigidez. La elasticidad es la propiedad mecánica de ciertos materiales de sufrir deformaciones reversibles cuando se encuentran sujetos a la acción de fuerzas exteriores, y de recuperar la forma original cuando cesan estas fuerzas exteriores. El análisis de estos parámetros se realiza mediante reometría, técnica física que utiliza instrumentos denominados reómetros.

El esfuerzo umbral es la fuerza mecánica necesaria para provocar una deformación irreversible en un sólido o un fluido. Normalmente, todos los materiales presentan una región elástica, en la que el esfuerzo aplicado provoca una deformación totalmente reversible cuando cesa el esfuerzo. Si ese esfuerzo supera un límite (límite elástico), la deformación pasa a ser irreversible, entrando en una región plástica. Finalmente, si el esfuerzo supera el módulo plástico, el material se rompe (punto de fractura).

El colágeno es una proteína de fácil disponibilidad en la naturaleza y que biológicamente se caracteriza por su baja inmunicidad y elevada actividad tisular. El colágeno forma las fibras colágenas, que son flexibles, pero ofrecen gran resistencia a la tracción. Los tejidos artificiales de la presente invención, que pueden contener fibrina, agarosa y colágeno presentan una mayor densidad fibrilar a nivel del estroma, un mejor comportamiento viscolástico y presentarán un esfuerzo umbral creciente según se aumenta la concentración de colágeno, y más elevado que los tejidos artificiales de colágeno. Por tanto, en una realización preferida la proteína añadida es colágeno.

En una realización preferida, el colágeno añadido se selecciona de la lista que comprende: colágeno tipo I, colágeno tipo II, colágeno tipo III, colágeno tipo IV, colágeno tipo V, colágeno tipo VI, colágeno tipo VII, colágeno tipo VIII, colágeno tipo IX, colágeno tipo X, colágeno tipo XI, colágeno tipo XII, colágeno tipo XIII o cualquier combinación de los anteriores. En una realización más preferida, el colágeno añadido se selecciona de la lista que comprende: colágeno tipo I, colágeno tipo II, colágeno tipo III, colágeno tipo IV, colágeno tipo V, colágeno tipo IX o cualquier combinación de los anteriores. La selección de un tipo particular de colágeno depende del tejido artificial que se desee preparar y se realiza en función de las características de cada colágeno que son conocidas en el estado de la técnica.

Por ejemplo, la función principal del colágeno tipo I es la de resistencia al estiramiento, y se encuentra abundantemente en la dermis, el hueso, el tendón y la córnea. Así, en la presente invención se demuestra que la adición de colágeno tipo I otorga excelentes propiedades al tejido artificial cuando se quiere preparar, por ejemplo, pero sin limitarnos a, un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial. Por tanto, en una realización preferida el colágeno es colágeno tipo I.

En una realización aún más preferida, el colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, en el producto resultante está a una concentración, ventajosamente, de entre 0,5 y 5 g/L, preferiblemente, de entre 1,8 y 3,7 g/L, y más preferiblemente, de entre 2,5 y 3 g/L. No obstante, una concentración menor o mayor también podría emplearse.

En una realización particular, el colágeno utilizado es un atelocolágeno, es decir un colágeno del cual se han eliminado las regiones terminales de estructura no helicoidal denominadas telopéptidos. Estos telopéptidos pueden hacer que el colágeno que sea insoluble y son portadores de los principales determinantes antigénicos del colágeno. El atelocolágeno se obtiene, por ejemplo, mediante tratamiento proteásico con pepsina.

Dependiendo de las concentraciones de fibrinógeno que se empleen, de la concentración de polisacárido y, en el caso de que se utilice, de la concentración de colágeno que se use, el tejido artificial resultante puede comprender concentraciones variables de los dos/tres componentes.

En una realización preferida, en el producto resultante, la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,1 y 6 g/L. Si se ha incluido, la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 0,5 y 5 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante, la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,15 y 3 g/L. Si se ha incluido, la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 0,5 y 5 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante, la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de

entre 0,25 y 2 g/L. Si se ha incluido, la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 0,5 y 5 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante, la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0, 1 y 6 g/L. Si se ha incluido, la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 1,8 y 3,7 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante, la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,15 y 3 g/L. Si se ha incluido, la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 1,8 y 3,7 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante, la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,25 y 2 g/L. Si se ha incluido, la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 1,8 y 3,7 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante, la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,1 y 6 g/L. Si se ha incluido, la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 2,5 y 3 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante, la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,15 y 3 g/L. Si se ha incluido, la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 2,5 y 3 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante, la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,25 y 2 g/L. Si se ha incluido, la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 2,5 y 3 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante, la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,1 y 6 g/L. Si se ha incluido, la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 0,5 y 5 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante, la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,15 y 3 g/L. Si se ha incluido, la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 0,5 y 5 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante, la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre

0,25 y 2 g/L. Si se ha incluido, la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 0,5 y 5 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante, la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,1 y 6 g/L. Si se ha incluido, la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 1,8 y 3,7 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante, la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,15 y 3 g/L. Si se ha incluido colágeno, la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 1,8 y 3,7 g/L.

En otra realización preferida, la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,25 y 2 g/L. Si se ha incluido, la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 1,8 y 3,7 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante, la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,1 y 6 g/L. Si se ha incluido, la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 2,5 y 3 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante, la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,15 y 3 g/L. Si se ha incluido, la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 2,5 y 3 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante, la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,25 y 2 g/L. Si se ha incluido, la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 2,5 y 3 g/L.

El término "factor de coagulación", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un componente, generalmente, una proteína, presente en el plasma sanguíneo y que interviene en la reacción en cadena que hace posible la coagulación. Son trece los factores de coagulación, nombrados con números romanos: I: fibrinógeno; II: protrombina; III: factor tisular o tromboplastina; IV: calcio; V: proacelerina; VI: factor inactivo o cimógeno; VII: proconvertina; VIII: factor antihemofílico A o factor von Willebrand; IX: factor antihemofílico B o factor de Christmas; X: factor de Stuart-Prower; XI: factor antihemofílico C; XII: Factor Hageman; XIII: Factor estabilizante de la fibrina; XIV: Fitzgerald; XV: Fletcher; XVI: plaquetas; y XVII: Somocurcio. Preferiblemente, el otro factor de coagulación añadido en el paso (c) del método de la presente invención es el factor XIII.

En otra realización preferida, el biomaterial de la invención además comprende otro principio activo. Como se emplea a la largo de la presente memoria, el término "principio activo", tiene el mismo significado que "substancia activa", "substancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" o "ingrediente farmacéuticamente activo", y se refiere a cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al biomaterial de la invención para su uso como medicamento, o alternativamente, al uso del biomaterial de la invención en la elaboración de un medicamento.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al biomaterial de la invención para su uso para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado, o alternativamente, al uso del biomaterial de la invención en la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado.

TEJIDO ARTIFICIAL DE LA INVENCIÓN

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a un tejido artificial, de ahora en adelante tejido artificial de la invención, que comprende el biomaterial de la invención, y además comprende células de un mamífero. En una realización más preferida de este aspecto de la invención, las células de mamífero son células humanas.

En una realización más preferida de este aspecto de la invención, el tejido artificial de la invención consiste en:

a) Fibrinógeno (o fibrina) según se ha descrito anteriormente;

b) un agente antifibrinolítico, preferiblemente según se ha descrito anteriormente;

c) un elemento que se selecciona de entre: un factor de coagulación, una fuente de calcio según se ha descrito anteriormente;

d) un polisacárido según se ha descrito anteriormente;

e) un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito anteriormente; y

f) una célula de un mamífero, preferiblemente una célula humana.

Dichas células pueden obtenerse mediante diferentes procedimientos descritos en el estado de la técnica, que pueden depender del tipo celular particular del que se trate. Algunos de estos procedimientos son, por ejemplo, pero sin limitarse, biopsia, procesado mecánico, tratamiento enzimático (por ejemplo, pero sin limitarse, con tripsina o colagenasa de tipo I), centrifugación,

lisis eritrocitaria, filtración, cultivo en soportes o medios que favorezcan la proliferación selectiva de dicho tipo celular o inmunocitometría.

Las células pueden ser células diferenciadas como, por ejemplo, pero sin limitarse, fibroblastos, queratocitos o células musculares lisas, o células no diferenciadas con la capacidad para diferenciarse en dichas células como, por ejemplo, células madre adultas.

Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, donde las células se seleccionan de entre: queratinocitos, células del urotelio, células del epitelio de la uretra, células del epitelio corneal, células del epitelio de la mucosa oral, células estromales, células gliales, células neuronales, células madre, o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización preferida del método de la invención, las células son fibroblastos o células no diferenciadas con la capacidad para diferenciarse en fibroblastos. Los fibroblastos pueden obtenerse a partir de cualquier tejido u órgano, sin embargo, preferiblemente, los fibroblastos proceden del tejido o del órgano en el que va a emplearse como sustituto el tejido artificial. Por ejemplo, cuando el método de la invención se emplea para preparar un tejido sustituto de piel o una piel artificial, los fibroblastos proceden, preferiblemente, de piel (fibroblásticos dérmicos); cuando se emplea para preparar un tejido sustituto de vejiga o una vejiga artificial, los fibroblastos proceden, preferiblemente, de vejiga; cuando se emplea para preparar un tejido sustituto de uretra o una uretra artificial los fibroblastos proceden, preferiblemente, de uretra; o cuando se emplea para preparar un tejido sustituto de mucosa oral o una mucosa oral artificial los fibroblastos proceden preferiblemente, de mucosa oral. No obstante, los fibroblastos pueden obtenerse a partir de cualquier otro tejido u órgano, como por ejemplo, la mucosa oral, la pared abdominal o cualquier tejido conjuntivo. Por ejemplo, los fibroblastos obtenidos a partir de mucosa oral pueden emplearse para preparar un tejido sustituto de piel o una piel artificial, un tejido sustituto de vejiga o una vejiga artificial, un tejido sustituto de uretra o una uretra artificial, o un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial.

Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, los fibroblastos proceden del estroma de un tejido o un órgano seleccionado de la lista que comprende: mucosa oral, pared abdominal, piel, vejiga, uretra o córnea.

En otra realización preferida del método de la invención, las células son queratocitos o células no diferenciadas con la capacidad para diferenciarse en queratocitos. Por ejemplo, cuando el método de la invención se emplea para preparar un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial, preferiblemente, se emplean queratocitos del estroma corneal.

La posibilidad de que todos los componentes del tejido artificial sean de origen autólogo permite que el transplante de dicho tejido pueda realizarse sin que sea necesaria la inmunosupresión del sujeto transplantado. Sin embargo, los componentes del tejido artificial también puedan ser de origen alogénico, es decir, pueden proceder de un individuo diferente a aquel al que se le va a transplantar el tejido artificial. Incluso la especie de la cual proceden dichos componentes, puede

ser diferente; en cuyo caso se dice que su origen es xenogénico. Esto abre la posibilidad de que el tejido artificial esté preparado de antemano cuando se necesite con urgencia, aunque en este caso sí sería recomendable proceder a la inmunosupresión del sujeto al que se trasplanta el tejido artificial.

Por lo tanto, en una realización preferida, las células del paso (a) de la invención son de origen autólogo. No obstante, las células del paso (a) también pueden ser de origen alogénico o xenogénico

Tras la adición a las células al biomaterial de la invención, y tras dejar reposar el producto resultante en un soporte, se produce la formación de una matriz que comprende fibrina, el polisacárido y el compuesto de fórmula (I), en la que quedan embebidas y/o se depositan dichas células y sobre la cual y/o en cuyo interior éstas pueden crecer. Preferiblemente, las células del paso (a) crecen en el interior de dicha matriz.

Como se demuestra en los ejemplos de la presente invención, la adición del compuesto de fórmula (I) permite preparar hidrogeles con propiedades mecánicas regulables en hasta un orden de magnitud eligiendo adecuadamente la concentración de dicho compuesto de fórmula (I).

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, las células madre se seleccionan de entre células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre adultas o combinaciones de las mismas.

El término "célula madre" hace referencia a una célula con capacidad clonogénica, de autorrenovación y de diferenciación en múltiples linajes celulares. En particular, las células madre mesenquimales tienen la capacidad de proliferar extensamente y formar colonias de células fibroblásticas. Tal como se usa en la presente invención, la expresión "célula madre" se refiere a una célula pluripotente o multipotente, capaz de generar uno o más tipos de células diferenciadas, y que además posee la capacidad de auto regenerarse, es decir, de producir más células madre. Las "células madre totipotentes" pueden dar lugar tanto a los componentes embrionarios (como por ejemplo, las tres capas embrionarias, el linaje germinal y los tejidos que darán lugar al saco vitelino), como a los extraembrionarios (como la placenta). Es decir, pueden formar todos los tipos celulares y dar lugar a un organismo completo. Las "células madre pluripotentes" pueden formar cualquier tipo de célula correspondiente a los tres linajes embrionarios (endodermo, ectodermo y mesodermo), así como el germinal y el saco vitelino. Pueden, por tanto, formar linajes celulares pero a partir de ellas no se puede formar un organismo completo. Las "células madre multipotentes" son aquellas que sólo pueden generar células de su misma capa o linaje embrionario de origen. La médula ósea alberga al menos dos poblaciones de células madre distintas: células madre mesenquimales (MSCs) y células madre hematopoyéticas (HSCs). En el contexto de la presente invención, las células madre son seleccionadas del grupo que comprende células madre mesenquimales, células madre

hematopoyéticas, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre adultas, o combinaciones de las mismas. En una realización particular, las células madre son células madre de un mamífero, preferiblemente humanas. En una realización particular, las células madre son células madre mesenquimales, preferiblemente células madre mesenquimales humanas.

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

El término "célula madre embrionaria" o "ESC" son células derivadas de masa celular interna de embriones en estadio de blastocisto, con capacidad de auto-renovación y de diferenciación en todos los tipos de células adultas. Las células madre embrionarias son capaces de proliferar indefinidamente in vitro manteniéndose en un estado indiferenciado y con un cariotipo normal a través del cultivo prolongado. También tienen la capacidad de diferenciarse en células de las tres capas germinales embrionarias (mesodermo, endodermo y ectodermo; (Itskovitz-Eldor, *et al.,* Mol. Med. 6:88-95, 2000) y linaje germinal. Las células madre embrionarias representan un modelo de sistema de gran alcance para la investigación de los mecanismos que subyacen a la biología de células pluripotentes y la diferenciación en el embrión temprano, así como proporcionar oportunidades para la manipulación genética. Las células madre embrionarias han sido aislados de la MCI de embriones en estadio de blastocisto especies múltiples (Bhattacharya, et al., BMC Dev. BioL 5:22, 2005), incluidos los ratones (Solter y Knowles, Proc. Nati. Acad. EE.UU. 75:5565-5569, 1978.), porcina (Chen, et al., Theriogenology 52:195-212, 1999), y los primates no humanos (Thomson, et al., Proc. Nati.. Acad. EE.UU. 92 , 7844-7848, 1995).

La invención contempla el uso de células madre embrionarias procedentes de líneas celulares establecidas de origen murino tales como las líneas 59B5, 36.5, 9TR#1 , TK#1, ES-D3 [D3], YS001 , ES-E14TG2a, ES-D3, 10P12, 56B3,L Wnt-3A, OP9, 3T3 MEFs WT, 3T3 MEFs KO, 127TAg, 151 TAg, WPE-stem, NE-4C, NE-GFP-4C, ES-C57BL/6, J1 , R1 , RW.4, B6/BLU, SCC#10, EDJ#22, AB2.2, Ainv15, 7AC5/EYFP, R1/E, G-Olig2, CE-1 , CE3,y hESC BG01 V todas las cuales se encuentran disponibles en repositorios públicos.

Métodos para la obtención de células madre embrionarias son ampliamente conocidos y pueden ser puestos en práctica por el experto sin necesidad de experimentación excesiva. Así, células embrionarias humanas se pueden obtener tal y como se describe en Reprod. Biomed. Online 4 (2002), 58-63. Células embrionarias de primates se pueden aislar de blastocistos de distintas

especies de primates (Thomson et al., Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 92:7844). Células embrionarias germinales se pueden preparar a partir de células germinales primordiales presentes en fetos humanos de 8-1 1 semanas tras el último periodo menstrual usando métodos tales como el descrito por Shamblott et al., Proc. Nati. Acad. Sci. USA 95 (1998), 13726.

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

Asimismo, es posible el uso de líneas de células troncales embrionarias, que pueden ser de distinto origen. En una forma de realización, las líneas celulares son de ratón e incluyen células tales como la línea R1 (ATCC No. SCRC-101 1) descrita por Nagy et al., (Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1993, 90:8424-8428) y la línea celular D3.

Para el caso de los países en los que la normativa lo requiera, las células madre que se emplean en la invención no han sido obtenidas por métodos que destruyan embriones humanos, o en su caso, que utilicen embriones humanos con fines industriales o comerciales. En otra realización preferida de la invención, las células madre no son células madre embrionarias.

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

El término "célula madre mesenquimal" o "MSC", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula de estroma multipotente, originada a partir de la capa germinal mesodermal, que puede diferenciarse en una variedad de tipos de células, incluyendo osteocitos (células de hueso), condrocitos (células de cartílago) y adipocitos (células de grasa). Los marcadores expresados por las células madre mesenquimales incluyen CD105 (SH2), CD73 (SH3/4), CD44, CD90 (Thy-1), CD71 y Stro-1 así como las moléculas de adhesión CD106, CD166, y CD29. Entre los marcadores negativos para las MSCs (no expresados) están los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, CD14, y las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 así como la molécula de adhesión CD31. Las MSC pueden ser obtenidas a partir de, sin quedar limitado a, médula ósea, tejido adiposo (tal como el tejido adiposo subcutáneo), hígado, bazo, testículos, sangre menstrual, fluido amniótico, páncreas, periostio, membrana sinovial, músculo esquelético, dermis, pericitos, hueso trabecular, cordón umbilical humano, pulmón, pulpa dental y sangre periférica. Las MSC de acuerdo con la invención pueden obtenerse a partir de

cualquiera de los tejidos anteriores, tal como a partir de médula ósea, de tejido adiposo subcutáneo o de cordón umbilical. Se pueden aislar MSC de médula ósea mediante procedimientos conocidos por el experto en la materia. En general, dichos métodos consisten en aislar células mononucleares mediante centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll, Percoll) de aspirados de médula ósea, y posteriormente sembrar las células aisladas en placas de cultivo de tejido en medio que contiene suero fetal bovino. Estos métodos se basan en la capacidad de las MSC de adherirse al plástico, de forma que mientras que las células no adherentes se retiran del cultivo, las MSC adheridas pueden expandirse en placas de cultivo. Las MSC también pueden aislarse de tejido adiposo subcutáneo siguiendo un procedimiento similar, conocido para el experto en la materia. Un método para aislar MSC de médula ósea o de tejido adiposo subcutáneo ha sido descrito previamente (De la Fuente et al., Exp. Cell Res. 2004, Vol. 297: 313:328). En una realización particular de la invención, las células madre mesenquimales son obtenidas a partir de cordón umbilical, preferiblemente de cordón umbilical humano.

Por tanto, en otra realización preferida de la invención, las células madre mesenquimales m son obtenidas a partir de médula ósea, tejido adiposo, hígado, bazo, testículos, sangre menstrual, fluido amniótico, páncreas, periostio, membrana sinovial, músculo esquelético, dermis, pericitos, hueso trabecular, cordón umbilical, pulmón, pulpa dental y sangre periférica.

El cordón umbilical constituye una interesante fuente de células madre adultas, debido a que, a diferencia de las células madre adultas obtenidas de otras fuentes; (a) su método de obtención no es invasivo ni doloroso; y (b) su capacidad proliferativa y su potencial de diferenciación no disminuye como consecuencia del proceso de envejecimiento. Entre las diferentes fuentes de células madre del cordón umbilical destacan las llamadas células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical, por: (a) su gran capacidad de proliferación y a su rapidez de expansión en cultivo; y (b) la baja expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I y ausencia de expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II, lo que las convierte en buenas candidatas para la terapia celular alogénica.

Por tanto, en otra realización preferida, las células del paso (f) son células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical. Estas células expresan en su superficie diversos marcadores característicos de las células mesenquimales como, por ejemplo, SH2, SH3, CD10, CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105 o CD166, y son negativos para marcadores del linaje hematopoyético, como por ejemplo, CD31, CD34, CD38, CD40 o CD45. Las células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical pueden diferenciarse, por ejemplo, a condroblastos, osteoblastos, adipocitos, precursores neurales, cardiomiocitos, células del músculo esquelético, células endoteliales o hepatocitos.

Las células madre adultas pueden ser caracterizadas mediante la identificación de proteínas de superficie y/o intracelulares, genes, y/u otros marcadores indicativos de su estado indiferenciado, mediante diferentes procedimientos que son conocidos en el estado de la técnica como, por

ejemplo, pero sin limitarse, inmunocitometría, análisis inmunocitoquímico, análisis por northern blot, RT-PCR, análisis de expresión génica en microarrays, estudios proteómicos o análisis por differential display.

Las células madre pueden ser inducidas a diferenciarse in vitro para dar lugar a células que expresen, al menos, una o más características propias de células diferenciadas. Ejemplos de células diferenciadas a las que pueden diferenciarse las células madre, pero sin limitarse, son fibroblasto, queratinocito, célula del urotelio, célula del epitelio de la uretra, célula del epitelio corneal, célula del epitelio de la mucosa oral, condroblasto, osteoblasto, adipocito o neurona. En una realización preferida de la invención, la célula diferenciada a partir de la célula madre multipotente de la invención expresa una o más características propias de una célula diferenciada seleccionada de la lista que comprende: fibroblasto, queratinocito, célula del urotelio, célula del epitelio de la uretra, célula del epitelio corneal, célula del epitelio de la mucosa oral, condroblasto, osteoblasto, adipocito o neurona.

Las células diferenciadas pueden ser caracterizadas mediante la identificación de proteínas de superficie y/o intracelulares, genes, y/u otros marcadores indicativos de su estado diferenciado, mediante diferentes procedimientos que son conocidos en el estado de la técnica como, por ejemplo, pero sin limitarse, inmunocitometría, análisis inmunocitoquímico, análisis por northern blot, RT-PCR, análisis de expresión génica en microarrays, estudios proteómicos o análisis por *differential display*.

Las células se dejan proliferar hasta que alcanzan un número adecuado hasta que alcanzan, típicamente, al menos, un 70% de confluencia, ventajosamente, al menos, un 80% de confluencia, preferiblemente, al menos, un 90% de confluencia, más preferiblemente, al menos, un 95% de confluencia y, aún más preferiblemente, al menos, un 100% de confluencia. Durante el tiempo que las células se mantienen en cultivo, el medio de cultivo en el que se encuentran puede ser parcial o totalmente reemplazado por medio nuevo para reemplazar ingredientes agotados y eliminar metabolitos y catabolitos potencialmente dañinos.

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

contempla el uso de células madre pluripotentes de cualquier especie incluyendo, sin limitación, células humanas, de ratón, de rata, bovinas, de oveja, de hámster, de cerdo y similares.

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

Mediante la adición a las células a los diferentes componentes, y tras dejar reposar el producto resultante en un soporte, se produce la formación de una matriz que comprende fibrina, las partículas de la invención, el polisacárido, el compuesto de la invención y, en el caso de que se haya incluido, la proteína añadida, en la que quedan embebidas dichas células y sobre la cual y/o en cuyo interior éstas pueden crecer. Preferiblemente, las células crecen en el interior de dicha matriz.

Soportes que pueden ser empleados son, por ejemplo, pero sin limitarse, placas de cultivo tisular o insertos porosos de cultivo celular. Preferiblemente, dichos soportes estarán en condiciones de esterilidad.

USOS MÉDICOS DE LA INVENCIÓN

Una enfermedad infecciosa, inflamatoria, genética o degenerativa, un daño físico o químico, o una interrupción del flujo sanguíneo, pueden dar lugar a una pérdida de células de un tejido o un órgano. Esta pérdida celular conllevaría una alteración de la función normal de dicho tejido u órgano; y por consiguiente, conduciría al desarrollo de enfermedades o secuelas físicas que merman la calidad de vida de la persona. Por tanto, es importante tratar de regenerar o y

restablecer la función normal de dichos tejidos u órganos. El tejido o el órgano dañado pueden ser sustituidos por un tejido u órgano nuevo que haya sido fabricado en el laboratorio mediante técnicas de ingeniería tisular. El objetivo de la ingeniería tisular es la construcción de tejidos biológicos artificiales y la utilización con fines médicos de los mismos para restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de tejidos y órganos enfermos. La utilidad terapéutica de este tipo de técnicas es prácticamente ilimitada con aplicaciones en todos los campos. El empleo de las técnicas de ingeniería tisular permite disminuir las listas de espera de tejidos y órganos, con la consiguiente disminución de la morbi-mortalidad de la enfermedad en el receptor. Lógicamente, también tiene como consecuencia una disminución de la morbi-mortalidad en los donantes de órganos. Por otra parte, existen numerosas ventajas asociadas a la utilización de células o tejidos autólogos en la ingeniería tisular, destacando: (a) una reducción significativa del número de infecciones del donante al receptor por agentes infecciosos; y (b) la ausencia de rechazo inmune injerto contra huésped, por lo que el paciente no tiene necesidad de tomar tratamiento inmunosupresor, evitándose los efectos secundarios y los problemas asociados a la inmunodepresión.

Por tanto, un **tercer aspecto** de la invención se refiere al uso del biomaterial o del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado.

Una realización más preferida refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una piel enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación o una malformación congénita.

Una realización preferida de este tercer aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una vejiga.

Una realización más preferida refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una vejiga enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (como por ejemplo, pero sin limitarse, una extrofia vesical, una extrofia de cloaca o una microvejiga), una vejiga neurógena, una incontinencia urinaria, una disfunción vesical, una infección o una litiasis vesical.

Una realización preferida de este tercer aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una uretra.

Una realización más preferida refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una uretra enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que

comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (como por ejemplo, pero sin limitarse, un hispospadias o un epispadias) o una estenosis.

Una realización preferida de este tercer aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una córnea. Una realización más preferida refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una córnea enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una úlcera corneal, un queratocono, un queratoglobo, un descematocele, un traumatismo, una causticación, una insuficiencia límibica, una queratitis atrófica, una distrofia corneal, una queratopatía primaria o secundaria, una infección, un leucoma, una queratopatía bullosa, un fallo endotelial corneal o una neoplasia benigna o maligna.

Una realización preferida de este tercer aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una mucosa, preferiblemente de una mucosa oral. Una realización aún más preferida se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una mucosa oral enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación, una malformación congénita, una pérdida de sustancia o una enfermedad periodontal. En una forma preferida de realización, el tejido que se usa para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una mucosa es un tejido que ha sido sometido a un paso de adición de una proteína. En una forma de realización aún más preferida, dicho paso se lleva a cabo mediante la adición de una composición que comprende colágeno tal y como se indicó en detalle anteriormente.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere al uso del tejido de la invención en la elaboración de un medicamento, o alternativamente, al biomaterial o el tejido de la invención para su uso en medicina.

Dicho medicamento es un medicamento de terapia celular somática. Se entiende por "terapia celular somática" la utilización de células somáticas vivas, autólogas, alogénicas o xenogénicas, cuyas características biológicas han sido alteradas sustancialmente como resultado de su manipulación, para obtener un efecto terapéutico, de diagnóstico o preventivo, por medios metabólicos, farmacológicos o inmunológicos. Entre los medicamentos de terapia celular somática se encuentran, por ejemplo, pero sin limitarse: células manipuladas para modificar sus propiedades inmunológicas, metabólicas o funcionales de otro tipo en aspectos cualitativos o cuantitativos; células clasificadas, seleccionadas y manipuladas, que se someten posteriormente a un proceso de fabricación con el fin de obtener el producto terminado; células manipuladas y

combinadas con componentes no celulares (por ejemplo, matrices o productos sanitarios biológicos o inertes) que ejercen la acción pretendida en principio en el producto acabado; derivados de células autólogas expresadas *ex vivo* (*in vitro*) en condiciones específicas de cultivo; o células modificadas genéticamente o sometidas a otro tipo de manipulación para expresar propiedades funcionales homologas o no homologas anteriormente no expresadas.

Un **quinto aspecto** de la invención se refiere a e refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano. En una realización preferida, el tejido o el órgano dañado se seleccionan de la lista que comprende: piel, vejiga, uretra, córnea, mucosa, conjuntiva, pared abdominal, conjuntiva, tímpano, faringe, laringe, intestino, peritoneo, ligamento, tendón, hueso, meninge o vagina.

Una realización preferida de este aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado como consecuencia de una enfermedad infecciosa, inflamatoria, genética o degenerativa, un daño físico o químico o una interrupción del flujo sanguíneo.

Una realización más preferida de este aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una piel. Una realización aún más preferida se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una piel enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación o una malformación congénita.

Una realización más preferida de este aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una vejiga. Una realización aún más preferida de este aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una vejiga enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (como por ejemplo, pero sin limitarse, una extrofia vesical, una extrofia de cloaca o una microvejiga), una vejiga neurógena, una incontinencia urinaria, una disfunción vesical, una infección o una litiasis vesical.

Una realización más preferida de este aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una uretra. Una realización aún más preferida de este

aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una uretra enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (como por ejemplo, pero sin limitarse, un hispospadias o un epispadias) o una estenosis.

Una realización más preferida de este aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una córnea. Una realización aún más preferida de este aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una córnea enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una úlcera corneal, un queratocono, un queratoglobo, un descematocele, un traumatismo, una causticación, una insuficiencia límibica, una queratitis atrófica, una distrofia corneal, una queratopatía primaria o secundaria, una infección, un leucoma, una queratopatía bullosa, un fallo endotelial corneal o una neoplasia benigna o maligna.

Una realización más preferida de este aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una mucosa, preferiblemente una mucosa oral. Una realización aún más preferida se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una mucosa oral enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación, una malformación congénita, una pérdida de sustancia o una enfermedad periodontal. En una forma preferida de realización, el tejido que se para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una mucosa es un tejido que ha sido sometido a la adición de una proteína. En una forma de realización aún más preferida, dicho paso se lleva a cabo mediante la adición de una composición que comprende colágeno al material tal y como se indicó en detalle anteriormente.

Un **sexto aspecto** de la invención se refiere a a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención.

Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para su uso en terapia celular somática.

Una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano. Preferiblemente, el tejido u órgano dañado se selecciona de entre: córnea, piel, mucosa oral, nervio periférico, vejiga y cartílago.

Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado como consecuencia de una enfermedad infecciosa, inflamatoria, genética o degenerativa, un daño físico o químico o una interrupción del flujo sanguíneo.

Una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una piel. Una realización aún más preferida se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una piel enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación o una malformación congénita.

Una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una vejiga. Una realización aún más preferida se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una vejiga enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (como por ejemplo, pero sin limitarse, una extrofia vesical, una extrofia de cloaca o una microvejiga), una vejiga neurógena, una incontinencia urinaria, una disfunción vesical, una infección o una litiasis vesical.

Una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una uretra. Una realización aún más preferida se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una uretra enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un

traumatismo, una malformación congénita (como por ejemplo, pero sin limitarse, un hispospadias o un epispadias) o una estenosis.

Una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una córnea. Una realización aún más preferida se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una córnea enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una úlcera corneal, un queratocono, un queratoglobo, un descematocele, un traumatismo, una causticación, una insuficiencia límibica, una queratitis atrófica, una distrofia corneal, una queratopatía primaria o secundaria, una infección, un leucoma, una queratopatía bullosa, un fallo endotelial corneal o una neoplasia benigna o maligna.

Una realización más preferida de este aspecto se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una mucosa, preferiblemente una mucosa oral. Una realización aún más preferida se refiere una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una mucosa oral enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación, una malformación congénita, una pérdida de sustancia o una enfermedad periodontal. En una forma preferida de realización la composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una mucosa o de una mucosa oral es un tejido al que se ha añadido una proteína. En una forma de realización aún más preferida, dicho paso se lleva a cabo mediante la adición de una composición que comprende colágeno al material obtenido tal y como se indicó en detalle anteriormente.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende el tejido artificial de la invención, y además, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende el tejido artificial de la invención, y además, otro principio activo. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende el tejido artificial de la invención y, además, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, otro principio activo.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden utilizarse en un método de tratamiento de forma aislada o conjuntamente con otros compuestos farmacéuticos.

PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DEL BIOMATERIAL Y EL TEJIDO DE LA INVENCIÓN

Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere a un método para elaborar el tejido artificial de la invención que comprende:

a) añadir un agente antifibrinolítico a una composición que comprende fibrinógeno (o fibrina);

b) añadir, al menos, un factor de coagulación, una fuente de calcio, trombina, o cualquier combinación de los anteriores al producto resultante del paso (a);

c) añadir una composición que comprende un polisacárido, al producto resultante del paso (b), y dejar gelificar;

d) someter el producto resultante del paso (c) a un proceso de nanoestructuración controlada;

e) inducir el cross-linking con un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito en el primer aspecto de la invención, del resultante del paso (b) y/o (d);

f) sembrar los productos del paso (c) y/o (e) con células de un mamífero.

Para la correcta diferenciación de algunos tipos celulares puede ser necesario un paso adicional. Por ejemplo, en el caso de las células del epitelio de la mucosa oral, los queratinocitos o las células del epitelio corneal, puede ser necesario exponer la superficie epitelial al aire para promover la correcta estratificación y maduración del epitelio manteniendo la matriz que comprende las células del paso (a) sumergida en medio de cultivo (técnica aire líquido).

Por tanto, en una realización preferida, el método de la invención, además de los pasos (a)-(g) descritos anteriormente comprende un paso adicional en el que el producto resultante del paso (f) se expone al aire. En general, el método de la invención incluye este paso cuando se emplea para obtener un tejido artificial que sirva para reemplazar a un tejido natural cuyo epitelio se encuentra expuesto normalmente al contacto con el aire como, por ejemplo, pero sin limitarnos, la piel, la córnea, la mucosa oral, la uretra o la vagina. Preferiblemente, este paso se realiza cuando se prepara un tejido sustituto de piel o una piel artificial, o cuando se prepara un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial, o cuando se prepara un tejido sustituto de mucosa oral o una mucosa oral artificial.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, el término "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS DE LA INVENCIÓN

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Método *in vitro* de preparación del tejido artificial

El tejido artificial de la invención se preparó tal como se describe en los siguientes pasos:

a) añadir una composición que comprende fibrinógeno humano (plasma purificado);

b) añadir un agente antifibrinolítico (ácido tranexámico) al producto resultante del paso (a);

c) añadir, al menos, un factor de coagulación, una fuente de calcio, trombina, o cualquier combinación de los anteriores al producto resultante del paso (b);

d) añadir una composición que comprende un polisacárido (agarosa o similar) al producto resultante del paso (c), y dejar gelificar;

e) someter el producto resultante del paso (c) a un proceso de nanoestructuración controlada;

f) inducir el cross-linking con Genipin del resultante del paso (c) y/o (e);

g) sembrar los productos del paso (c) y/o (e) con células humanas o de algún modelo animal de experimentación.

El tejido resultante se sometió a una serie de caracterizaciones y pruebas que se describen a continuación.

Resultados

Caracterización biomecánica (reología):

Las propiedades mecánicas de las muestras de tejidos se midieron, a las 24 horas de su preparación a 37 ºC, con un reómetro de esfuerzo controlado de la marca Haake MARS III (Thermo Fisher Scientific, USA). La geometría de medida empleada fue la de placas paralelas, que consistía en dos discos con un diámetro de 3,5 cm, dónde la superficie en contacto con la muestra presentaba rugosidad para evitar fenómenos de deslizamiento en superficie. La gelificación de las muestras de tejido se había realizado en placas de cultivo de 6 pocillos con un diámetro de 3,5 cm, igual que el de las placas del reómetro.

El procedimiento seguido fue el siguiente; se sitúa la muestra de tejido sobre la placa inferior del reómetro, y poco a poco se va acercando el plato superior hasta que la fuerza normal es ligeramente superior a 0 N (0,05 N aprox.). La distancia entre las dos placas del sistema de medida para la que se alcanzó dicho valor de fuerza normal varió de una muestra a otra, encontrándose para los geles no nanoestructurados (FAH) entre 2,5 - 5,8 mm y para los geles nanoestructurados (NFAH) entre 50-400 µm.

La consistencia biomecánica de los hidrogeles generados se evaluó tanto en régimen estacionario como en régimen dinámico, siguiendo los siguientes protocolos:

(i) Estado estacionario. En este tipo de ensayo, la muestra se somete a una rampa de esfuerzos de corte, midiéndose para cada valor el esfuerzo de corte necesario para mantener la deformación en estado estacionario. En los experimentos realizados, se mantuvo cada valor de deformación aplicada durante 10 s. Este proceso se repitió para valores crecientes de deformación (rampa de deformación) hasta alcanzarse la zona de dependencia esfuerzo-deformación no lineal. Una dependencia típica del esfuerzo con la deformación de cizalla para este tipo de experimentos se muestra en la Figura 1. Como se puede observar, a bajos valores de la deformación existe una dependencia aproximadamente lineal del esfuerzo con la deformación. A medida que aumenta la deformación aplicada, la linealidad comienza a perderse, tomando la curva una forma cóncava, que indica que la deformación sucesiva del material es más fácil a medida que este se encuentra más deformado –es decir, los incrementos de esfuerzo para igual incremento de deformación son menores a medida que aumenta la deformación. Se trata del comportamiento típico de los materiales elásticos reales. La consistencia de un material en régimen estacionario suele cuantificarse con el valor de su módulo de rigidez, que es la pendiente de la zona lineal en las curvas esfuerzo de corte vs deformación de corte.

(ii) Estado dinámico. En este tipo de ensayos, la muestra se somete a un esfuerzo de corte oscilatorio de frecuencia y amplitud dadas y se mide el esfuerzo de corte resultante. Habitualmente se aplican esfuerzos oscilatorios sinusoidales y, dentro de la llamada zonal viscoelástica lineal, el esfuerzo resultante es también sinusoidal, de la misma frecuencia que la deformación, pero desfasado respecto de ella [Macosko, 1994]. Bajo estas condiciones se puede descomponer el esfuerzo en la suma de la parte en fase con la deformación y la parte en oposición de fase con la misma. De este modo, se pueden definir los módulos viscoelásticos, G' (módulo elástico) y G'' (módulo viscoso), de la siguiente forma: siendo G' el cociente entre la amplitud de la parte del esfuerzo en fase con la deformación y la amplitud de la misma, y G'' el cociente entre la amplitud de la parte del esfuerzo en oposición de fase con la deformación y la amplitud de esta. Dentro de la zona viscoelástica lineal (ZVL), G' cuantifica la respuesta elástica del material, mientras que G'' su respuesta viscosa. Para la caracterización del estado dinámico realizamos dos tipos de ensayos, barridos de amplitud de deformación a frecuencia constante y barridos de frecuencia a amplitud constante.

a. Barrido en amplitud a frecuencia constante. Durante este ensayo, la muestra se sometió a una deformación de corte de amplitud creciente, manteniéndose constante la frecuencia, e igual a 1 Hz. Para cada valor de amplitud se realizaron 5 ciclos de oscilación, tomándose la media de los tres últimos ciclos, descartándose los 2 primeros para eliminar los transitorios. Una dependencia típica de G' y G'' en estos experimentos se muestra en la Figura 2. Como se puede observar, tanto G' como G'' presentan un valor inicial (bajos valores de amplitud de deformación) aproximadamente independiente de la amplitud de deformación, disminuyendo G' rápidamente para valores de amplitud de deformación superiores a aprox. 0,01. Esta brusca disminución de G' marca el inicio la pérdida de linealidad del material. Es habitual caracterizar la respuesta viscoelástica de un material a partir de los valores de G' y G'' correspondientes a la ZVL (zona plana). Téngase en cuenta que los materiales marcadamente elásticos (por ejemplo piel, elastómeros y caucho) presentan valores de G' muy superiores a los de G'' en la ZVL, mientras que los materiales de carácter marcadamente líquido (aceites, grasas, disoluciones acuosas, sangre, etc.) presentan valores superiores de G'' a G' en la ZVL. La muestras de la presente invención presentan todas ellas un carácter marcadamente elástico, con valores de G' muy superiores a los de G''.

b. Barrido de frecuencia a amplitud constante. En estos ensayos en régimen dinámico, se somete el material a esfuerzos oscilatorios de amplitud constante (perteneciente a la ZVL) y frecuencia variable. Para cada valor de amplitud se realizaron 5 ciclos de oscilación, tomándose la media de los tres últimos ciclos, descartándose los 2 primeros para eliminar los transitorios. Una dependencia típica de las tendencias obtenidas se muestra en la Figura 3. Como se puede observar en dicha figura, G' y G'' presentan una tendencia ligeramente ascendente a medida que la frecuencia de oscilación aumenta, siendo G' muy superior a G'' en todo el rango de valores. Esta tendencia es típica de materiales poliméricos con un elevado entrecruzamiento [Macosko, 1994]. Nótese además, que G'' presenta una marcada tendencia decreciente a elevados valores de la frecuencia, que parece ser típica de tejidos biológicos humanos [Rodriguez y cols. Cryobiology 67 (2013) 355–362].

Todos los ensayos mencionados se efectuaron con diferentes alícuotas de cada tipo de muestra. Los resultados que se describen a continuación siempre corresponden a los valores medios obtenidos con al menos 3 alícuotas diferentes.

Pasamos a continuación a analizar el efecto del agente químico Genipin en las propiedades mecánicas de los hidrogeles preparados. Aquí mostramos únicamente los valores para el módulo de rigidez G, y los módulos viscoelásticos G' y G'' correspondientes a la ZVL (Figuras 4, 5 y 6; tablas 1 y 2).

Geles no nanoestructurados	Módulo elástico, G' (Pa)	Módulo viscoso, G" (Pa)	Módulo de rigidez, G (Pa)
FA-Ctr	36 ±7	8,9 ±1,7	31,5 ±2,3
Gen 0.1	93 ±8	25 ±3	84 ±8
Gen 0.25	74 ±8	10,3 ±1,0	65 ±4
Gen 0.5	610 ±40	124 ±8	490 ±9
Gen 0.75	570 ±160	121 ±19	470 ±120

Tabla 1. Valor del módulo de rigidez, el módulo elástico y el módulo viscoso correspondiente a la zona viscoelástica lineal (correspondiente a una deformación de corte de 0,01 y una frecuencia de 1Hz) de los hidrogeles no nanoestructurados. Se indica la concentración en % v/v de agente químico Genipin.

Geles nanoestructurados	Módulo elástico, G' (Pa)	Módulo viscoso, G" (Pa)	Módulo de rigidez, G (Pa)
FA-Ctr	1130±220	350±90	500±60
Gen 0.1	3400±400	560±40	2700±300
Gen 0.25	3900±400	900±140	4000±800
Gen 0.5	7400±1000	2600±600	5100±1000
Gen 0.75	10600±1700	2200±600	7000±600

Tabla 2. Valor del módulo de rigidez, el módulo elástico y el módulo viscoso correspondiente a la zona viscoelástica lineal (correspondiente a una deformación de corte de 0,01 y una frecuencia de 1Hz) de los hidrogeles nanoestructurados. Se indica la concentración en % v/v de agente químico Genipin.

Como se puede observar por comparación de las figuras 5 y 6 y de las columnas 1 y 2 de las tablas 1 y 2, en todos los casos los valores de G' son muy superiores a los valores de G'', por lo que todos los hidrogeles presentan propiedades marcadamente elásticas, propias de un material polimérico entrecruzado. Es más, para todas las muestras los valores de G' son aproximadamente 4 veces superiores a los de G'', no afectando la cantidad de Genipin a esta relación de forma apreciable. Así pues, bajo esfuerzos externos, la mayor parte de la energía comunicada al hidrogel se almacenaría en forma de energía elástica (correspondiente al módulo elástico G'), mientras que una pequeña parte se disiparía por rozamiento viscoso (correspondiente al módulo viscoso). En cuanto al efecto de Genipin, podemos observar que consiste en un aumento gradual tanto del módulo de rigidez como de los módulos viscoelásticos, alcanzándose valores hasta un orden de magnitud más elevados (tanto para G, G' y G'') para la máxima concentración de Genipin respecto del hidrogel control (ausencia de Genipin), tanto para

los hidrogeles no nanoestructurados como para los nanoestructurados. Como se puede observar, la regulación de las propiedades mecánicas es progresiva, a medida que se pasa del hidrogel control al hidrogel que contiene 0.75 de Genipin, por lo que es posible preparar hidrogeles con propiedades mecánicas regulables en hasta un orden de magnitud eligiendo adecuadamente la concentración del agente químico. Obsérvese, no obstante, que existe una cierta saturación de las propiedades mecánicas para concentraciones de Genipin superiores a 0.5, especialmente evidente en el caso de los hidrogeles no nanoestructurados.

En cuanto al efecto de la nanoestructuración, como se puede observar por comparación directa de los datos de las Figuras 4, 5 y 6, los hidrogeles nanoestructurados presentan valores de los parámetros biomecánicos (G, G' y G'') unas 20-30 veces superiores a los correspondientes a los hidrogeles no nanoestructurados. Obsérvese además que los valores superiores de los parámetros mecánicos de los hidrogeles no nanoestructurados (alcanzados para las mayores concentraciones de Genipin) son aproximadamente la mitad de los valores de los hidrogeles nanoestructurados control.

En conclusión, a través del efecto de la nanoestructuración y de la concentración de Genipin, es posible regular las propiedades de los hidrogeles de fibrina y agarosa en un rango que va desde los valores de los hidrogeles control no nanoestructurados hasta unas 300 veces el valor de estos hidrogeles. Por último, nótese que el rango de valores de las propiedades mecánicas cubierto por los hidrogeles de esta invención abarca un amplio abanico de tejidos humanos naturales, como se puede comprobar por comparación con la Figura 1 del artículo [Scionti G, Moral M, Toledano M, Osorio R, Duran JDG, Alaminos M, Campos A, Lopez-Lopez MT. Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model. J Biomed Mater Res Part A 2014:102A:2573–2582]. Como se puede comprobar en dicha figura, un gran número de tejidos humanos nativos presentan valores de G' en el rango 1-10000 Pa, valores de G'' en el rango 0,1-7000 Pa, y de G en el rango que va hasta los 10000 Pa. Dichos rangos están cubiertos por los hidrogeles de la presente invención.

Caracterización estructural:

Los estudios estructurales llevados a cabo por microscopía electrónica de barrido (Figura 7) muestran la composición fibrilar característica del hidrogel de FA no nanoestructurada (FAH) y FA nanoestructurada (NFAH). Los geles no nanoestructurados se caracterizan por estar compuestos por fibras organizadas aleatoriamente, mientras que aquellos geles sometidos a un proceso de nanoestructuración mostraron un patrón más organizado. En ambos casos se conserva la alta porosidad de este biomaterial (Figura 7).

Los hidrogeles sometidos a cross-linking con Genipin mostraron un patrón fibrilar y de organización de las fibras comparable a los hidrogeles sin Genipin. Sin embargo, este análisis

demuestra que la reacción química con Genipin indujo una disminución en la porosidad de los biomateriales en función a la concentración del agente químico, como se muestra en las imágenes representativas de la Figura 7.

Biocompatibilidad ex vivo:

Para determinar la biocompatibilidad de las membranas generadas en esta invención, se utilizarón fibroblastos humanos, los cuales fueron sembrados en la superficie de FAH y de aquellos sometidos a cross-linking con Genipin. Posteriormente se realizó un análisis histológico y la prueba de *live-dead cell viability assay* (Gibco).

El análisis histológico muestra que los fibroblastos se adhieren a la superficie de la totalidad de los biomateriales. En el caso de la FAH sin cross-linking se ve una gran cantidad de células en el transcurso de tiempo (0-16 días ex vivo), las cuales incrementan su número, ingresan en el hidrogels y comienzan una progresiva degradación de sus fibras. Cuando se analizaron los hidrogeles sometidos a cross-linking con Genipin se observó que las células se adhieren a la superficie de los biomateriales. Sin embargo, los fibroblastos mostraron una actividad de degradación e invasión considerablemente menor que los hidrogeles sin cross-linking (Figura 8). El test de viabilidad celular (live-dead) mostró una gran cantidad de fibroblastos viables y metabólicamente activos en la superficie de todos los biomateriales analizados (Figura 9). En el caso de los hidrogeles de FAH sin cross-linking (CTR), se observe desde los 2 días un gran número de células de morfología fusiforme, las cuales incrementaron considerablemente su número después de 16 días de desarrollo *ex vivo*. Cuando se analizaron los hidrogeles sometidos a cross-linking con Genipin se observó que los fibroblastos se adhieren a la superficie del biomaterial y adoptan su característica morfología fusiforme, especialmente a bajas concentraciones de este agente. Sin embargo, y como demuestra este test, las células cultivadas en la superficie tienen dificultad en el proceso de adhesión celular los 2 primeros días, pero en el transcurso de tiempo incrementan considerablemente su número en aquellos hidrogeles sometidos a cross-linking con Genipin a 0,75% (Figura 9). En relación a las células muertas, estás se observan con fluorescencia roja. Sin embargo, debido a que las células muertas pierden la función de adhesión, estas son eliminadas de la superficie del biomaterial durante los cambios de medio de cultivo, por lo que no es posible verlas en la superficie de estos hidrogeles.

Finalmente, los análisis histológicos y el test de viabilidad demuestran que los hidrogeles de FAH sometidos a cross-linking con diferentes concentraciones de Genipin son altamente biocompatibles y más resistentes a la degradación por parte de las células cultivadas en la superficie. De esto se puede concluir que el proceso de cross-linking de hidrogeles de FAH con Genipin incrementa las propiedades biomecánicas, mantiene las propiedades de biocompatibilidad y retarda la degradación mediada por las células de estos biomateriales. Por

lo tanto, las membranas de FAH químicamente modificadas con Genipin desarrolladas en esta invención podrán ser utilizadas de forma segura en diversas aplicaciones en el campo de la IT.

Elaboración de hidrogeles de Fibrina-Agarosa

En este estudio se generaron constructos de FA siguiendo protocolos previamente descritos. Para preparar 30 ml de FA se utilizó 22,8 ml de plasma humano (proporcionado por el Doctor Fernández-Montoya, del centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada y Almería), 2,25 ml de PBS (con 5% de solución de antibióticos) y 450 µl de ácido tranexámico (amchafibrin®). Esta solución se mezcló cuidadosamente y luego se agregó 1,5 ml de agarosa tipo VII y 3 ml de cloruro de calcio al 2% (para promover la gelificación), la solución de mezclo cuidadosamente y se distribuyó en placas de 6 pocillos (con un volumen de 5 ml en c/u). Los constructos de FA se dejaron gelificar durante aproximadamente 2 horas a 37ºC. Como resultado, obtuvimos constructos de FA acelulares con un volumen de 5 mL, 0,5 cm de espesor y 3,5 de diámetro.

Una vez completada la gelificación de los constructos de FA se procedió a la nanoestructuración de los mismos mediante compresión plástica. Para ello se colocaron las muestras entre un par de filtros de nylon (con un tamaño de poro de 0,22 µm) y posteriormente se comprimieron entre un par de filtros absorbentes estériles de 3 mm de espesor. Posteriormente se ejerció un peso de 500 gr por un período de 3 minutos, obteniéndose constructos de FA de 30 mm de diámetro y entre 50-400 µm de espesor.

Cross-linking de constructos de fibrina-agarosa

En esta realización los constructos de FA (FAH y NFAH) fueron sometidos a cross-linking con 4 concentraciones de Genipin (0,1%, 0,25%, 0,5%, 0,75%). En este sentido, se añadió 5 ml de Genipin a cada pocillo y fueron cubiertos con papel de aluminio e incubados durante 72 horas a 37ºC. Transcurrido este tiempo se comprobó la reacción de entrecruzamiento por la coloración azul del constructo y posteriormente se procedió con el lavado con PBS con 5% de antibiótico durante 24 horas.

Membranas biológicas

Se han generado membranas biológicas a partir de hidrogeles de fibrina-agarosa (HFA) con propiedades biomecánicas controladas. Los HFA se sometieron a un proceso de entrecruzamiento o *cross-linking* químico a través de su inmersión en una solución acuosa de genipin a diferentes concentraciones. Posterior a dicho proceso de cross-linking los hidrogeles fueron caracterizados como se detalla a continuación:

a. Análisis estructural a través de técnicas histológicas.
b. Evaluación de las propiedades biomecánicas.

c. Pruebas de biocompatibilidad celular *ex vivo*.

d. Estudio histológico de biocompatibilidad *in vivo*.

e. Análisis de sangre.

En el caso de los estudios *in vivo*, se han empleado ratas Wistar, a las cuales se les implantó hidrogeles con y sin *cross-linking* químico en el tejido celular subcutáneo a nivel dorsal, y se evaluó la biocompatibilidad de los biomateriales a nivel histológico, sanguíneo y sérico.

Fabricación de los hidrogeles de fibrina-agarosa

La elaboración de los constructos de fibrina-agarosa (HFA) se realizó siguiendo protocolos anteriormente descritos en este documento. En concreto para este ejemplo, para la elaboración de 30 ml de HFA se añaden 2,25 ml de PBS a 22,8ml de plasma sanguíneo humano procedente de donantes sanos de sangre humana suministrada de acuerdo con la normativa existente por el CRTSBT (Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada Almería). A continuación, se agregan 450 µl de ácido tranexámico (Amchafibrín®, FidesEcofarma, Valencia, España), con el fin de evitar la fibrinólisis espontánea de la fibrina. A la solución anterior se adicionan 3 ml de Cl2Ca 0,025 mM para iniciar la reacción de coagulación de la fibrina y, finalmente, 1,5 ml de agarosa tipo VII al 2% disuelta en PBS, previamente calentada hasta haber alcanzado su punto de fusión. El producto resultante se mezcla de forma cuidadosa y se mantiene a 37ºC hasta su completa gelificación, tras haberlo distribuido en placas de 6 pocillos.

Entrecruzamiento del HFA con genipin

Posteriormente se procede a la realización del entrecruzamiento con genipin (GP). Para ello los constructos se sumergieron en 5 ml de cada solución de genipin al 0,1 y 0,25%, durante 72h a 37ºC y a continuación se aclararon varias veces con PBS durante 24h.

De esta manera, quedan establecidos 4 grupos experimentales: grupo control, HFA, HFA- GP 0,1% y HFA-GP 0,25%, que se evaluaron en dos tiempos como se indica más adelante. Cada grupo fue evaluado por triplicado (n = 3 cada uno).

Implantación in vivo de HFA y obtención de muestras

Para el estudio *in vivo* de estos biomateriales se obtuvieron implantes de 3x3x1,5 mm a partir de lo geles, que serían alojados en ratas Wistar, los animales de experimentación empleados en este experimento. Tras eliminar el pelo que fuera necesario, estos implantes fueron cuidadosamente introducidos en el dorso de las ratas a través de una incisión a lo largo del eje axial con bisturí, en ambos bolsillos que se crearon en el tejido celular subcutáneo con tijeras de punta roma a uno y otro lado. En la Fig. 10 se puede observar el aspecto macroscópico de los implantes.

El análisis que se llevaría a cabo tuvo lugar en dos tiempos, a los 12 y a los 26 días tras la inclusión del implante. Dicho análisis abarca la muestra representada por el implante, una porción de piel y tejido subcutáneo adyacentes, muestras de riñones, hígado, pulmón y bazo, así como muestras de sangre de las que se obtuvo el hemograma.

Estos estudios sobre las ratas, desde la implantación del hidrogel hasta la extracción de muestras, se llevaron a cabo en la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario Virgen de las Nieves bajo la supervisión de personal acreditado.

Procesamiento de muestras y tinciones

Para el análisis por microscopía óptica de la zona del implante y de los diversos órganos estas muestras fueron procesadas como se detalla a continuación. En primer lugar se realizó una fijación en una solución de formol al 10%, tras lo que se procedió a la inclusión en parafina, previa deshidratación en soluciones con concentraciones crecientes de alcohol y empleo de benceno como agente intermediario. Como resultado final se obtienen bloques de parafina que albergaran las muestras. De dichos bloques se realizan cortes histológicos seriados de 5 µm de grosor en un micro tomo de parafina, que quedarían finalmente recogidos en los portaobjetos.

Para la visualización por microscopía óptica los cortes histológicos fueron desparafinados e hidratados, y posteriormente teñidos bien en hematoxilina-eosina (las muestras de la zona del implante y el resto de órganos) o bien mediante la tinción de picrosirius (sólo las muestras de la zona del implante).

a. Tinción de Hematoxilina-eosina:
   - Hematoxilina de Harris por seis minutos, tras desparafinar e hidratar.
   - Lavado en agua corriente durante 10 minutos.
   - Eosina durante 3 minutos.
   - Deshidratado en soluciones con concentraciones de alcohol crecientes, aclarado en xilol y montaje con cubreobjetos.

b. Tinción de Picrosirius (Carriel, 2011):
   - Picrosirio (ácido pícrico-rojo sirio) durante 30 minutos.
   - Lavado en agua destilada 2 minutos.
   - Hematoxilina durante 3 minutos.
   - Lavado en agua corriente por 4 minutos.
   - Deshidratado en soluciones con concentraciones de alcohol crecientes, aclarado en xilol y montaje con cubreobjetos.

Análisis macroscópico e histológico de los implantes, tejidos y órganos

La biocompatibilidad es una de las características más importantes que debe presentar un biomaterial empleado en ingeniería tisular y está definida por la reacción inflamatoria que genera en el tejido que lo aloja. Para su estudio se ha llevado a cabo la evaluación histológica de los tejidos adyacentes al biomaterial implantado, que es un método clásico (Anderson y Miller, 1984. *Biomaterials* 5:5-10).

El análisis histológico se realiza a partir de estudio macroscópico y microscópico de las muestras procesadas.

a. Estudio macroscópico: Mediante inspección directa de la porción de piel que corresponde al implante y del mismo implante, atendiendo a posibles parámetros presentes como signos de inflamación, infección y necrosis, cambios en volumen y textura del implante, o migración del mismo.

b. Estudio microscópico: Se hará atendiendo a la presencia y tipo de reacción inflamatoria que acompañe al implante, así como a la existencia de fibrosis y/o formación de cápsula fibrosa. También se caracterizaron parámetros relativos al implante como son su grado de degradación, presencia en su espesor de componentes celulares de la reacción inflamatoria y la posible presencia en su interior de elementos como células gigantes, granulomas o neovasos.

Análisis del patrón histológico de riñones, hígado, bazo y pulmones

De forma semejante a las muestras de los implantes este análisis incluye una evaluación macroscópica y una evaluación microscópica, considerando la presencia de cualquier parámetro que advierta la existencia de inflamación, fibrosis o necrosis.

Resultados

Se empleó un grupo control de ratas en el experimento. Como cabría esperar el examen histológico de la piel de estas ratas no mostraba alteración alguna en ninguno de los dos tiempos evaluados, tras 12 y 26 días (Fig. 11).

Hidrogel de fibrina-agarosa

ESTUDIO MACROSCÓPICO

A nivel macroscópico, en el momento de la extracción, no se apreció signo alguno de inflamación, necrosis o infección, ni otra alteración en la zona de piel que recubría el implante. No hubo migración del mismo. Su volumen parece haber disminuido de forma sutil tras los 26 días, sin cambios en la textura.

ESTUDIO MICROSCÓPICO

a. Tras 12 días (FIGs 12 y 13): Se aprecia una reacción inflamatoria aguda de predominio linfoplasmocitario y neutrofílico alrededor del implante, cuya degradación en la zona de los márgenes ya comienza a ser evidente. La presencia de macrófagos es reducida.

b. Tras 26 días (FIGs 14 y 15): La degradación del hidrogel es notable tras 26 días, y se mantiene la inflamación aunque ahora con gran participación histiocitaria. No parece haberse formado una cápsula fibrosa alrededor del implante de forma clara, pero sí se observa aumento de la fibrosis apreciable con la tinción de picrosirius. En ninguno de los dos tiempos se observan células gigantes ni granulomas de cuerpo extraño, ni formación de neovasos.

Hidrogel de fibrina-agarosa tras entrecruzamiento con genipin al 0,1%.

ESTUDIO MACROSCÓPICO

La observación macroscópica no apuntaba hacia ninguna alteración de la piel en la zona del implante en ninguno de los dos tiempos. No hubo migración a distancia de éstos hacia otra zona de la piel, ni se apreciaba cambio de volumen o textura evidente.

ESTUDIO MICROSCÓPICO

- Tras 12 días (Figs. 16 y 17): Observamos un infiltrado con predominio linfoplasmocitario y neutrofílico en los márgenes del implante, que avanza hacia el interior, con degradación parcial del hidrogel.
- Tras 26 días (Figs. 18 y 19): La degradación del hidrogel es tan evidente que los restos del mismo que se aprecian en la zona del implante son muy reducidos. A cambio podemos observar un infiltrado con predominio de macrófagos donde se hallaba el hidrogel. Así mismo se aprecia un aumento de la fibrosis, con formación de cápsula fibrótica más o menos bien delimitada alrededor del implante. Por el contrario en ninguno de ambos tiempos se observan células gigantes ni granulomas de cuerpo extraño, ni formación de neovasos.

Hidrogel de fibrina-agarosa tras entrecruzamiento con genipin al 0,25%.

ESTUDIO MACROSCÓPICO

El estudio macroscópico no revela ningún tipo de alteración en la piel que recubre nuestro implante, que tampoco había migrado desde su lugar original de introducción. El implante no muestra cambio alguno al tacto, ni en volumen ni en textura.

ESTUDIO MICROSCÓPICO

- Tras 12 días (figuras 11 y 12): El examen en microscopio óptico revela un infiltrado de predominio linfoplasmocitario que se limita únicamente a los márgenes del hidrogel, con escasa penetración de estos elementos en el interior del mismo. La destrucción del hidrogel es prácticamente nula.
- Tras 26 días (figuras 13 y 14): La inflamación mantiene su predominio linfoplasmocitario, aunque con ligero aumento de la presencia de macrófagos tras los 26 días. Dicho infiltrado sigue, no obstante, limitándose a los márgenes del hidrogel con escasa

penetración de células en su interior. La degradación del material es todavía mínima y se limita al exterior. No hay fibrosis en su espesor, aunque sí se aprecia la formación de una capsula fibrótica alrededor; tampoco se observan células gigantes, granulomas de cuerpo extraño ni neovasos.

-

Análisis de las muestras obtenidas de riñones, hígado, bazo y pulmón.

Al momento de la extracción no se apreció alteración alguna de los órganos citados a nivel macroscópico. Microscópicamente no se apreciaron diferencias significativas entre las muestras obtenidas del grupo control y el resto de grupos, sin advertirse la presencia de signos de inflamación, fibrosis o necrosis.

Análisis de sangre: hemograma

Los resultados del hemograma obtenidos a partir de las muestras de sangre de las ratas se recogen en la tabla 3.

De manera resumida, de los resultados de los ejemplos anteriores podemos decir que el genipin:

a. Con respecto a las características biomecánicas, el análisis reológico muestra que los patrones biomecánicos representados por los módulos de rigidez, elástico y viscoso mejoran significativamente en los geles sometidos a entrecruzamiento con genipin. De ellos, destacan las propiedades elásticas de los constructos.

b. En cuanto a la biocompatibilidad celular *ex vivo*, concentraciones crecientes de genipin ejercen cierto aumento de la citotoxicidad del biomaterial. Sin embargo, existen diferencias significativas respecto a la viabilidad celular favorables al genipin al 0,25%, con respecto a mayores concentraciones u otros agentes.

Respecto a la biocompatibilidad de estos hidrogeles en los tejidos de la rata los resultados obtenidos indican lo siguiente:

- Al examen macroscópico no se ha apreciado en ninguno de los hidrogeles tras el primer ni el segundo tiempo la migración o cambio notable en textura o volumen de los implantes. Tampoco se aprecian signos evidentes de infección, inflamación ni necrosis. El examen de riñones, hígado, bazo y pulmón no revela tampoco ninguna alteración apreciable ni diferencias con el grupo control, hecho por otra parte esperable pues cualquier cambio en relación a la inflamación en estos órganos no debería aparecer pasados sólo 26 días.

RESULTADOS DEL HEMOGRAMA									
				CONTROL		FAH			
				12 DÍAS	26 DÍAS	12 DÍAS		26 DÍAS	
				media	media	media	SD	media	SD
HEMOGRAMA		WBC	µL+1	2,40E+03	3,40E+03	1,97E+03	± 9,01E+02	3,80E+03	± 1,01E+03
		RBC	µL+1	8,83E+06	8,47E+06	8,97E+06	± 2,54E+05	6,93E+06	± 1,36E+05
		HGB	g/dL	14,10	13,60	13,93	± 0,32	11,77	± 0,70
		HCT	%	45,00	42,40	45,60	± 1,28	34,67	± 0,57
		MCV	fL	51,00	50,10	50,73	± 0,12	50,00	± 0,40
		MCH	pg	16,00	16,10	15,53	± 0,64	16,93	± 0,71
		MCHC	g/dL	31,30	32,10	30,63	± 1,34	33,93	± 1,45
		PLT	µL+1	9,60E+04	6,27E+05	2,13E+05	± 1,76E+05	2,43E+05	± 2,25E+05
	WBC / Glóbulos blancos	LYM	%	66,20	87,00	66,87	± 7,22	88,37	± 3,15
		MXD	%	9,20	3,30	15,27	± 2,06	2,93	± 1,93
		NEUT	%	24,60	9,70	17,87	± 5,33	8,70	± 1,23
		LYM	µL+1	1,60E+03	3,00E+03	1,33E+03	± 6,03E+02	3,37E+03	± 1,01E+03
		MXD	µL+1	2,00E+02	1,00E+02	3,00E+02	± 1,73E+02	1,17E+02	± 7,64E+01
		NEUT	µL+1	6,00E+02	3,00E+02	3,33E+02	± 1,53E+02	3,33E+02	± 5,77E+01
	RBC / Glóbulos rojos	RDW_SD	fL	28,50	27,60	28,30	± 0,26	27,27	± 0,21
		RDW_CV	%	14,10	13,00	14,33	± 0,57	12,37	± 0,31
	PLT / Plaquetas	PDW	fL	7,70	7,20	6,70	± 0,57	9,03	± 1,80
		MPV	fL	6,10	6,00	5,90	± 0,00	6,40	± 0,20
		P_LCR	%	5,20	5,20	3,75	± 2,47	7,33	± 2,27

Tabla 3. Parámetros del hemograma obtenidos de las muestras de sangre de todos los grupos experimentales

RESULTADOS DEL HEMOGRAMA											
				FAH5GP 0,1%				FAH5GP 0,25%			
				12 DÍAS		26 DÍAS		12 DÍAS		26 DÍAS	
				media	SD	media	SD	media	SD	media	SD
HEMOGRAMA		WBC	µL+1	1,77E+03	± 7,23E+02	5,27E+03	± 2,03E+03	2,47E+03	± 3,51E+02	4,67E+03	± 8,14E+02
		RBC	µL+1	8,68E+06	± 6,93E+04	6,57E+06	± 3,00E+05	7,87E+06	± 4,90E+05	7,97E+06	± 7,46E+05
		HGB	g/dL	13,97	± 0,12	12,20	± 0,50	12,33	± 1,04	12,97	± 0,55
		HCT	%	44,80	± 0,17	33,03	± 1,10	40,30	± 2,81	39,87	± 3,69
		MCV	fL	51,60	± 0,17	50,30	± 0,62	51,17	± 1,15	50,03	± 0,29
		MCH	pg	16,10	± 0,20	18,60	± 1,51	15,67	± 0,35	16,33	± 0,85
		MCHC	g/dL	31,17	± 0,31	37,00	± 2,59	30,60	± 0,70	32,63	± 1,67
		PLT	µL+1	1,31E+05	± 1,15E+05	2,99E+05	± 1,15E+05	6,53E+04	± 6,53E+04	5,63E+05	± 3,27E+05
	WBC / Glóbulos blancos	LYM	%	72,83	± 17,68	86,40	± 2,78	69,55	± 2,05	82,83	± 3,20
		MXD	%	9,27	± 7,51	3,83	± 1,85	14,00	± 11,31	9,17	± 5,60
		NEUT	%	17,90	± 11,16	9,77	± 0,97	16,45	± 9,26	8,00	± 2,44
		LYM	µL+1	1,23E+03	± 3,06E+02	4,50E+03	± 1,61E+03	1,85E+00	± 7,07E+01	3,83E+03	± 5,77E+02
		MXD	µL+1	2,17E+02	± 1,76E+02	2,33E+02	± 1,15E+02	4,00E+02	± 2,83E+02	4,33E+02	± 3,06E+02
		NEUT	µL+1	3,33E+02	± 3,21E+02	5,33E+02	± 3,06E+02	4,00E+02	± 1,41E+02	4,00E+02	± 1,00E+02
	RBC / Glóbulos rojos	RDW_SD	fL	28,43	± 0,12	27,47	± 0,35	29,43	± 2,40	27,83	± 0,15
		RDW_CV	%	13,97	± 0,25	12,63	± 0,21	14,73	± 2,92	13,13	± 0,15
	PLT / Plaquetas	PDW	fL	6,80	± +	7,37	± 0,40	+	± +	6,80	± 0,00
		MPV	fL	6,40	± +	6,23	± 0,29	+	± +	6,00	± 0,14
		P_LCR	%	9,30	± +	7,67	± 1,70	+	± +	4,70	± 1,13

Tabla 3 (cont.). Parámetros del hemograma obtenidos de las muestras de sangre de todos los grupos experimentales.

La inflamación observada en la zona del implante comparte características generales entre los distintos hidrogeles. Pasado el primer tiempo, tras 12 días, la inflamación tiene un predominio linfoplasmocitario, con participación de polimorfonucleares neutrófilos y escasa presencia de macrófagos. Este infiltrado se aprecia algo más intenso en el HFA y HFA GP-0,1%, en los que un pequeño número de células inflamatorias se adentra en el espesor del implante. Los datos

del hemograma, como se puede observar en la tabla presentada con anterioridad, apoyan el predominio de linfocitos sobre el resto de estirpes celulares. La degradación del implante a los 12 días es muy marcada en el HFA GP-0,1%, algo menor en el HFA y prácticamente inexistente en el HFA GP-0,25%, limitándose en todo caso a la zona más marginal. El hecho de que el HFA GP-0,1% presente una degradación aparente más acelerada que el HFA sin cross-linking parece contradictorio a lo que cabría esperar. Este resultado podría atribuirse a la forma en que el genipin modifica la configuración estructural del hidrogel, probablemente haciéndolo más fácil de degradar por el sistema inmunitario a esta baja concentración.

Transcurridos 26 días (segundo tiempo), la inflamación presenta un marcado aumento de macrófagos en comparación con el análisis a los 12 días, mucho menor en el HFA GP- 0,25%. Este aumento de macrófagos se acompaña de un avance en el proceso de degradación de los hidrogeles, que es casi completo en el caso del HFA y el HFA GP- 0,1%. No obstante, el HFA GP-0,25% sigue prácticamente íntegro, limitándose de nuevo la inflamación y la degradación a la zona más externa y de forma larvada. Parece destacable por tanto que la estructura y las características biomecánicas del HFA GP- 0,25% varían de tal forma que se retrasa muy significativamente su degradación, en comparación con la concentración de genipin al 0,1% o su ausencia en el hidrogel.

En este segundo tiempo también se puede observar en HFA, HFA GP-0,1% y HFA GP- 0,25% un aumento de la fibrosis más evidente alrededor de los implantes, perfilando de manera más o menos clara una cápsula fibrótica. Por el contrario, en ninguno de los implantes en ninguno de los dos tiempo se observan fenómenos de infección ni necrosis, ni la presencia de células gigantes de cuerpo extraño o granulomas, ni la formación de otros elementos como los neovasos.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos tras los experimentos realizados, parece evidente afirmar que la variabilidad de características que presentan *ex vivo* los distintos biomateriales en función de su composición, supone así mismo una variabilidad in vivo de la respuesta de un tejido vivo frente a estos. Sabiendo que la respuesta inflamatoria del tejido frente al implante tiene características semejantes en todos los hidrogeles analizados, la principal diferencia *in vivo* entre ellos reside en el particularmente lento proceso de degradación que caracteriza al HFA GP-0,25%. Esta variación en la degradación puede ser aprovechada para el diseño de implantes con velocidad de degradación variable, según interese en la aplicación médica.

REIVINDICACIONES

1.- Un biomaterial que comprende:

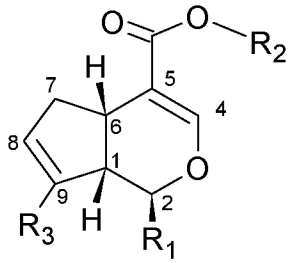
a) Fibrinógeno;

b) un agente antifibrinolítico;

c) un elemento que se seleciona de entre: un factor de coagulación, una fuente de calcio, trombina, o cualquiera de sus combinaciones;

d) un polisacárido; y

e) un compuesto de fórmula (I)



Fórmula (I)

o cualquiera de sus esteres, tautómeros y sales farmacéuticamente aceptables, donde:

- R_1 es -H, =O ó $-OR_4$, en donde R_4 es -H, alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-3}, o alcanoilo C_{1-12} que puede estar sustituido con fenilo, fenoxi, piridilo o tienilo;
- R_2 es H, alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-3}, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, w-butilo, i-butilo, isobutilo, o sec-butilo;
- R_3 es un alcohol primario seleccionado entre $-CH_2-OH$ y $-R_5-CH_2-OH$, donde $-R_5-$ es alquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-3}, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *n*-butilo, *t*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo.

2.- El biomaterial según la reivindicación anterior, donde R_1 es $-OR_4$

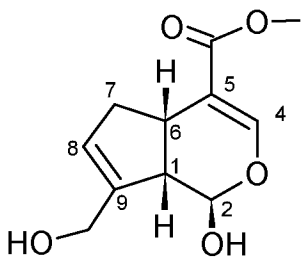
3.- El biomaterial según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde R_4 es -H ó alquilo C_{1-3}

4.- El biomaterial según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde R_2 es H ó alquilo C_{1-3} y/o R_3 es $-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-OH$, o $-CH_2-CH_2-CH_2-OH$.

5.- El biomaterial según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde R_2 es H ó alquilo C_{1-3}.

6.- El biomaterial según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde R_3 es $-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-CH_2-OH$.

7.- El biomaterial según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el compuesto de (e) tiene la fórmula (II):



Fórmula (II)

8.- El biomaterial según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el origen del fibrinógeno o la fibrina es el plasma sanguíneo.

9.- El biomaterial según la reivindicación 8, donde el plasma sanguíneo es de origen autólogo.

10.- El biomaterial según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el agente antifibrinolítico de (b) es ácido tranexámico.

11.- El biomaterial según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde la fuente de calcio del paso (c) es una sal de calcio.

12.- El biomaterial según la reivindicación 11, donde la sal de calcio de (c) es cloruro cálcico.

13.- El biomaterial según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el polisacárido (d) es agarosa.

14.- El biomaterial según la reivindicación 13, donde la agarosa es de tipo VII.

15.- El biomaterial según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que además comprende una proteína.

16.- El biomaterial según la reivindicación 15, donde la proteína se selecciona de entre fibronectina, colágeno, o su combinación.

17.- El biomaterial según cualquiera de las reivindicaciones 15-16 donde la proteína es colágeno tipo I.

18.- El biomaterial según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que consiste en

a) Fibrinógeno según se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones 8-9;

b) un agente antifibrinolítico, preferiblemente según se ha descrito en la reivindicación 10;

c) un elemento que se selecciona de entre: un factor de coagulación, una fuente de calcio según se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones 11-12, trombina, o cualquiera de sus combinaciones;

d) un polisacárido según se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones 13-14;

e) un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

19.- Un tejido artificial que comprende el biomaterial según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, y además comprende células de un mamífero.

20.- El tejido artificial según la reivindicación anterior, donde las células de mamífero son células humanas.

21.- El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 19-20, donde las células se seleccionan de entre: queratinocitos, células del urotelio, células del epitelio de la uretra, células del epitelio corneal, células del epitelio de la mucosa oral, células estromales, células gliales, células neuronales, células madre, o cualquiera de sus combinaciones, donde las células madre no han sido obtenidas por métodos que utilicen o destruyan embriones humanos.

22.- El tejido artificial según la reivindicación anterior, donde las células madre se seleccionan de entre células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre adultas o combinaciones de las mismas, donde las células madre no han sido obtenidas por métodos que utilicen o destruyan embriones humanos.

23.- El tejido artificial según la reivindicación anterior, donde las células madre mesenquimales son obtenidas a partir de médula ósea, tejido adiposo, hígado, bazo, testículos, sangre menstrual, fluido amniótico, páncreas, periostio, membrana sinovial, músculo esquelético, dermis, pericitos, hueso trabecular, cordón umbilical, pulmón, pulpa dental y sangre periférica.

24.- El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 19-23, donde las células son fibroblastos o queratocitos.

25.- El tejido artificial según la reivindicación anterior donde los fibroblastos proceden del estroma de un tejido o un órgano seleccionado de la lista que comprende: mucosa oral, pared abdominal, piel, vejiga, uretra o córnea.

26.- El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 19-25, obtenido u obtenible por un procedimiento que comprende:

a) añadir un agente antifibrinolítico a una composición que comprende fibrinógeno;

b) añadir, al menos, un factor de coagulación, una fuente de calcio según se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones 11-12, trombina, o cualquier combinación de los anteriores al producto resultante del paso (a);

c) añadir una composición que comprende un polisacárido, preferiblemente según se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones 13-14, al producto resultante del paso (b), y dejar gelificar;

d) someter el producto resultante del paso (c) a un proceso de nanoestructuración controlada;

e) inducir el cross-linking con un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, del resultante del paso (b) y/o (d);

f) sembrar los productos del paso (c) y/o (e) con células de un mamífero según se describen en cualquiera de las reivindicaciones 19-23.

27.- El tejido artificial según la reivindicación 26 que además comprende un paso (paso a2) entre los pasos (a) y (b) en el que se añade una proteína (preferiblemente fibronectina).

28.- El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 26-27, que además comprende un paso (paso e2) entre los pasos (e) y (f) en el que se añade una proteína, preferiblemente colágeno.

29.- El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 19-28, donde el proceso de nanoestructuración comprende la deshidratación y/o la compresión mecánica del producto resultante del paso (e).

30.- El tejido artificial según la reivindicación 29, donde la deshidratación comprende un procedimiento seleccionado de la lista que consiste en: drenaje, evaporación, succión, presión capilar, osmosis o electro-osmosis.

31.- El tejido artificial según la reivindicación anterior, donde la deshidratación mediante presión capilar comprende la aplicación de un material absorbente sobre el producto resultante del paso (e).

32.- El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 29-31, donde la compresión mecánica comprende un procedimiento seleccionado de la lista que comprende: aplicación de una carga estática, aplicación de u hidráulico, aplicación de una leva, aplicación de uno o más rodillos, aplicación de un globo, extrusión o centrifugación.

33.- El tejido artificial según la reivindicación 32, donde la aplicación de una carga estática comprende la colocación de un peso sobre el producto resultante del paso (e).

34.- El uso el tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 19-33 en medicina.

35.- El uso del tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 19-34 en la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado.

36.- El uso del tejido artificial según la reivindicación anterior, donde el tejido u órgano dañado se selecciona de entre: córnea, piel, mucosa oral, nervio periférico, vejiga y cartílago.

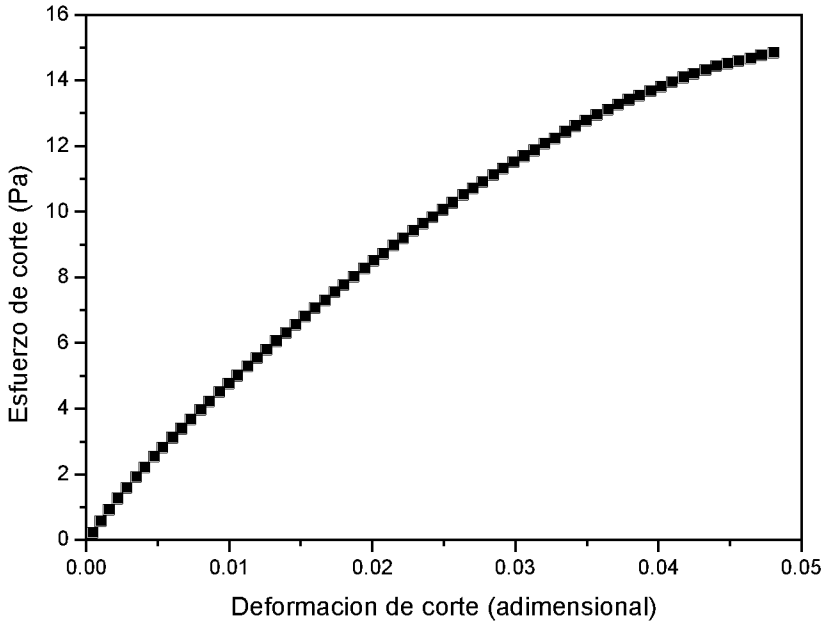


Figura 1

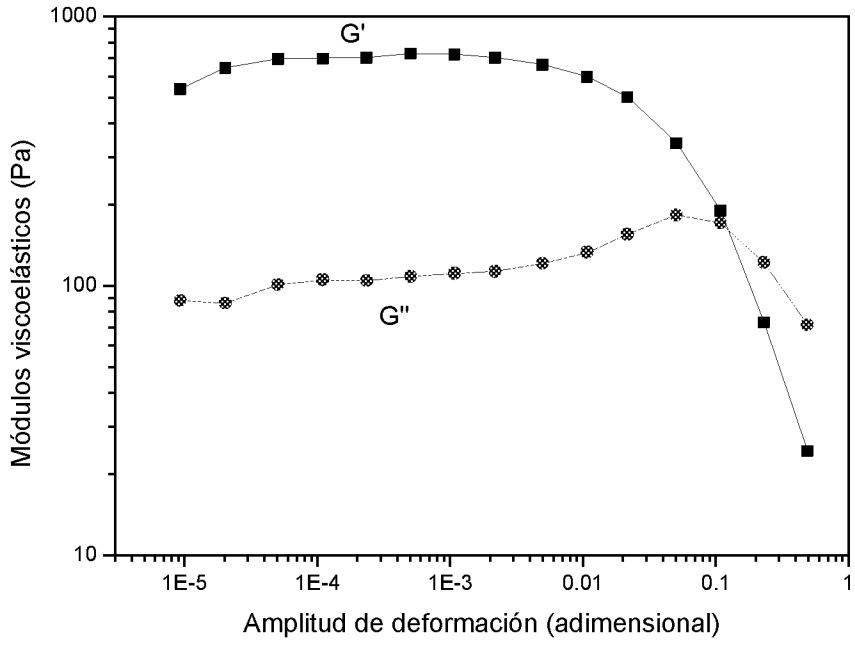


Figura 2

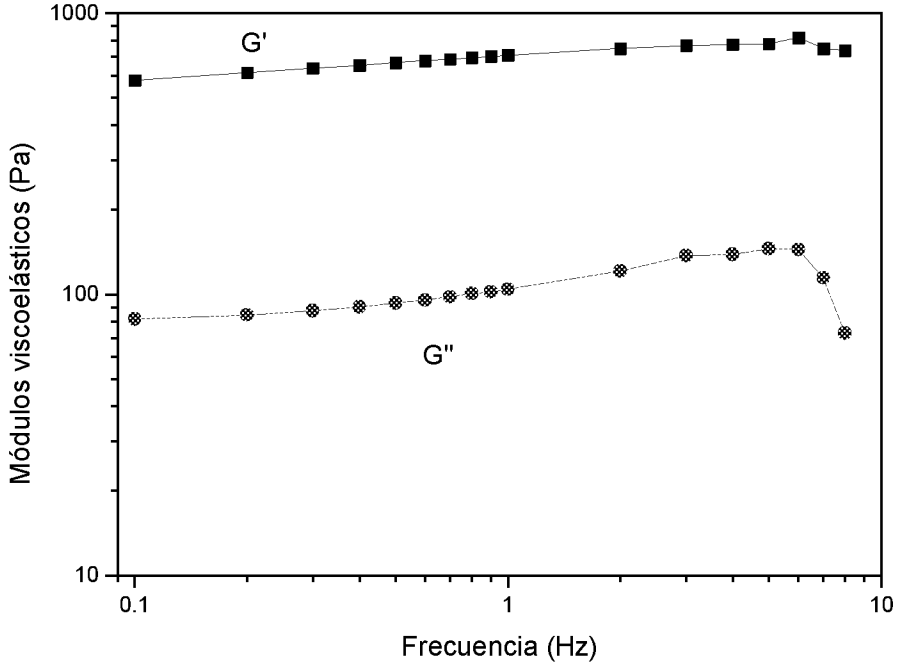


Figura 3

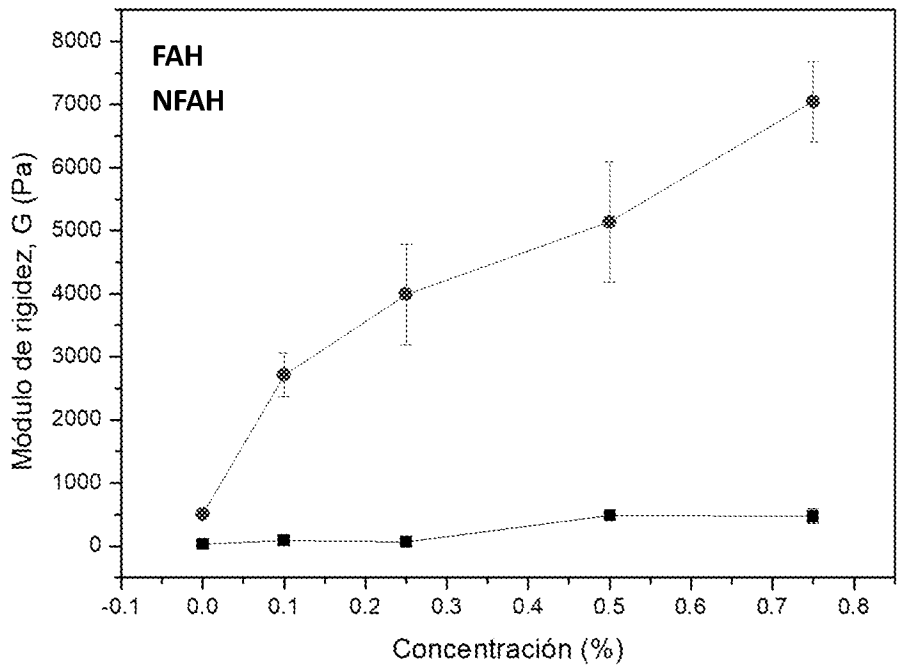


Figura 4

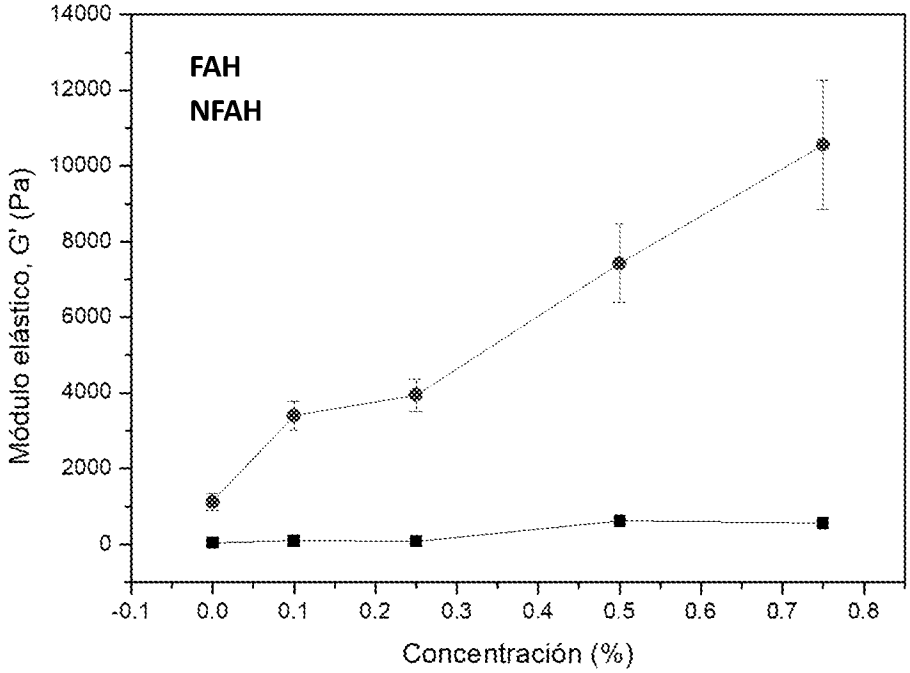


Figura 5

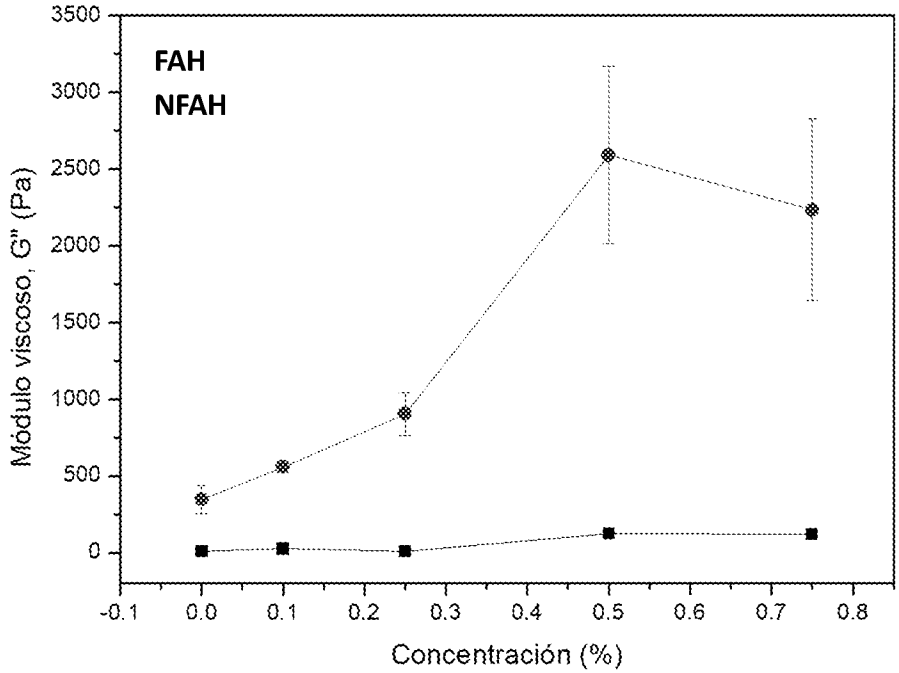


Figura 6

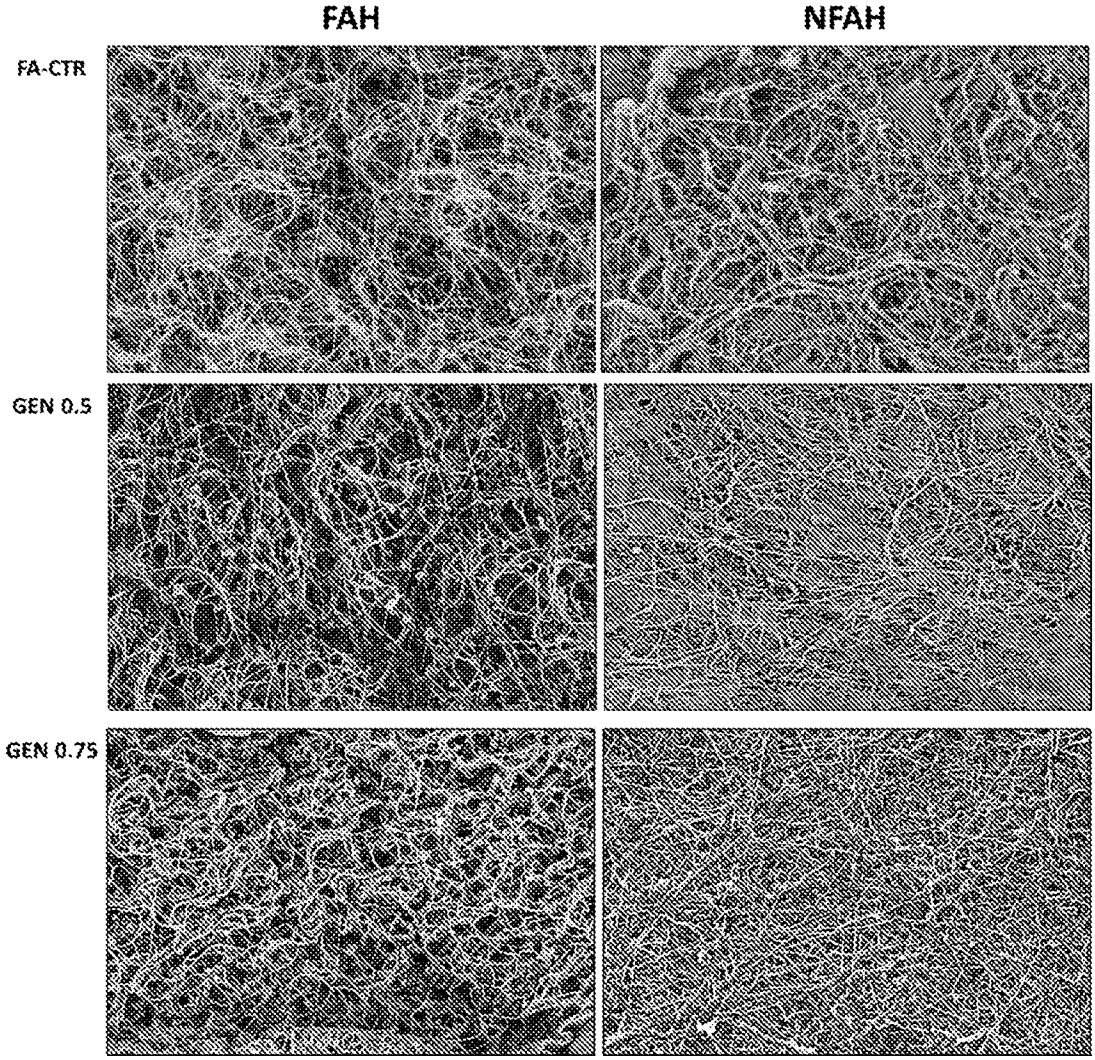


Figura 7

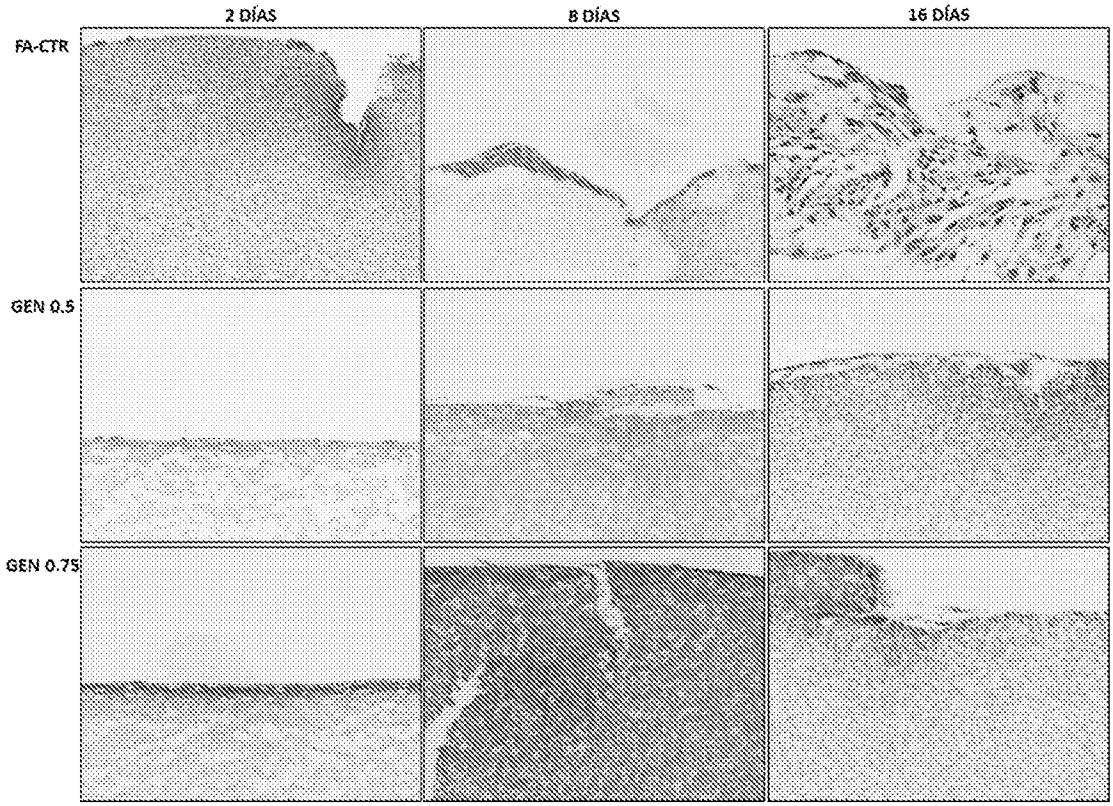


Figura 8

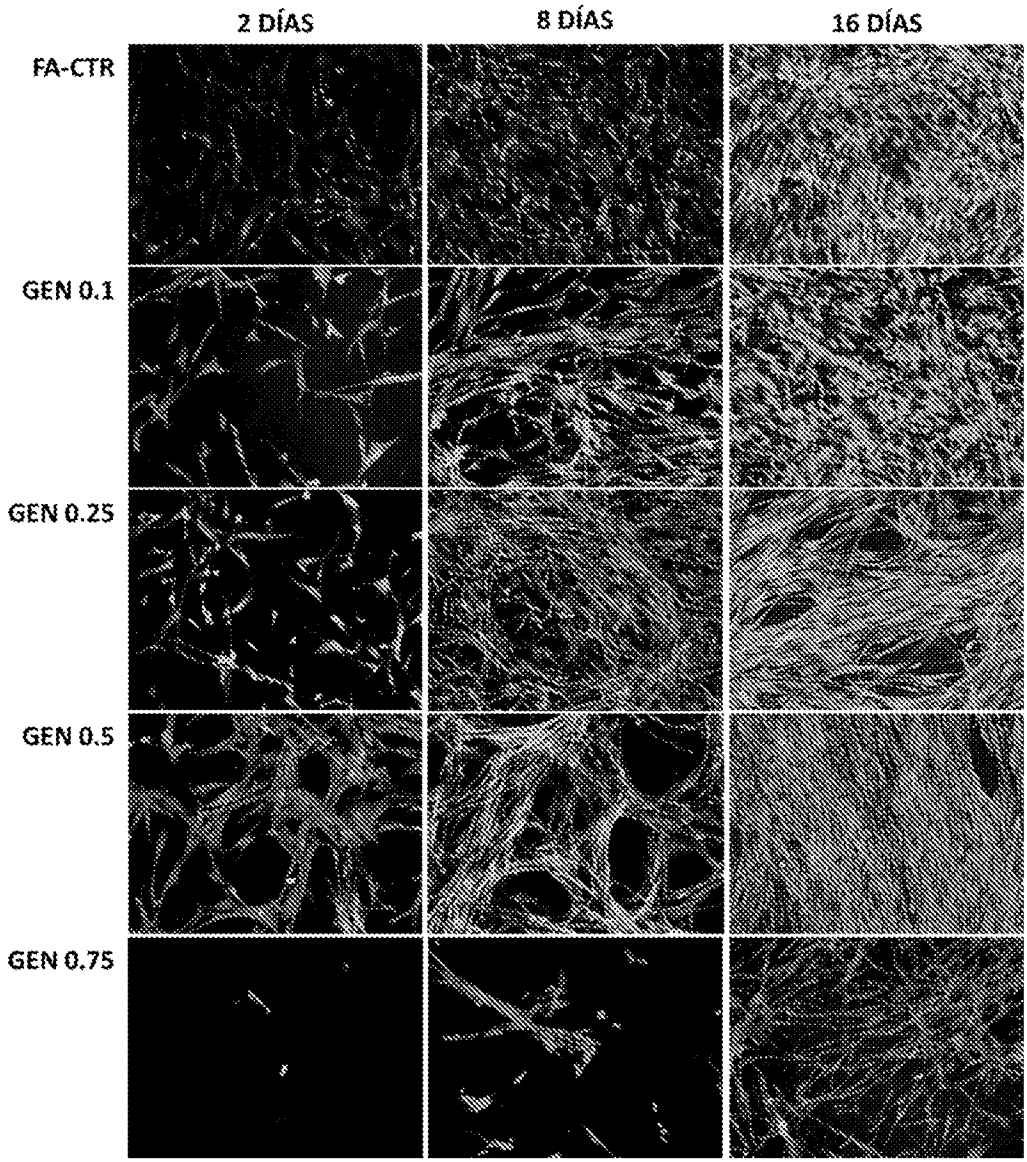


Figura 9

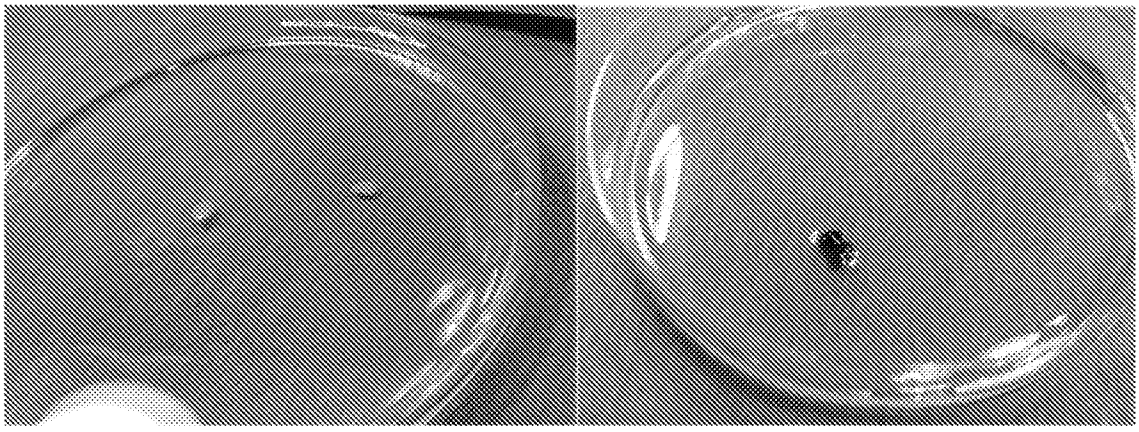


Figura 10

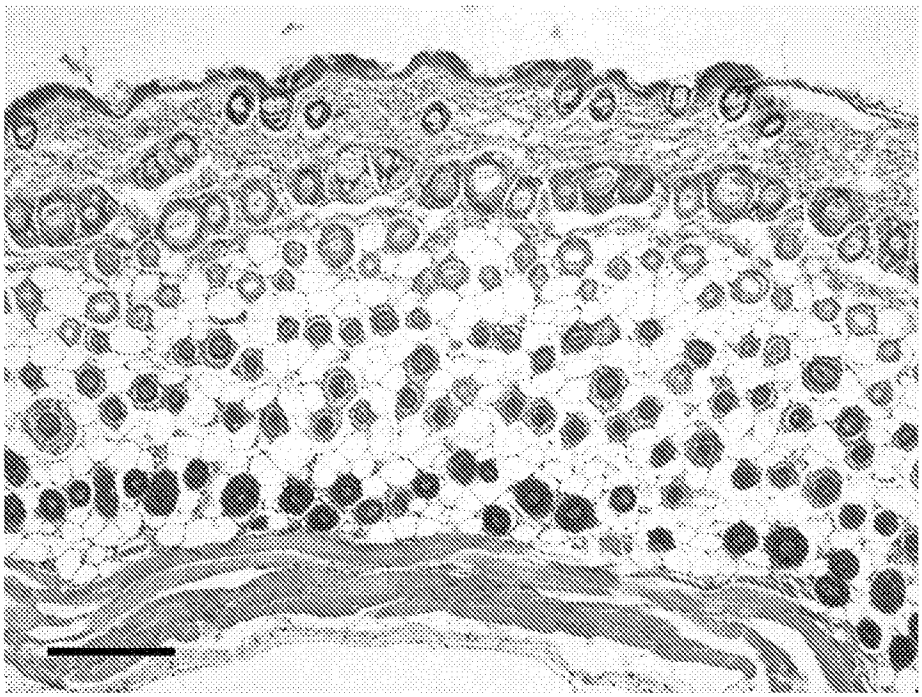


Figura 12

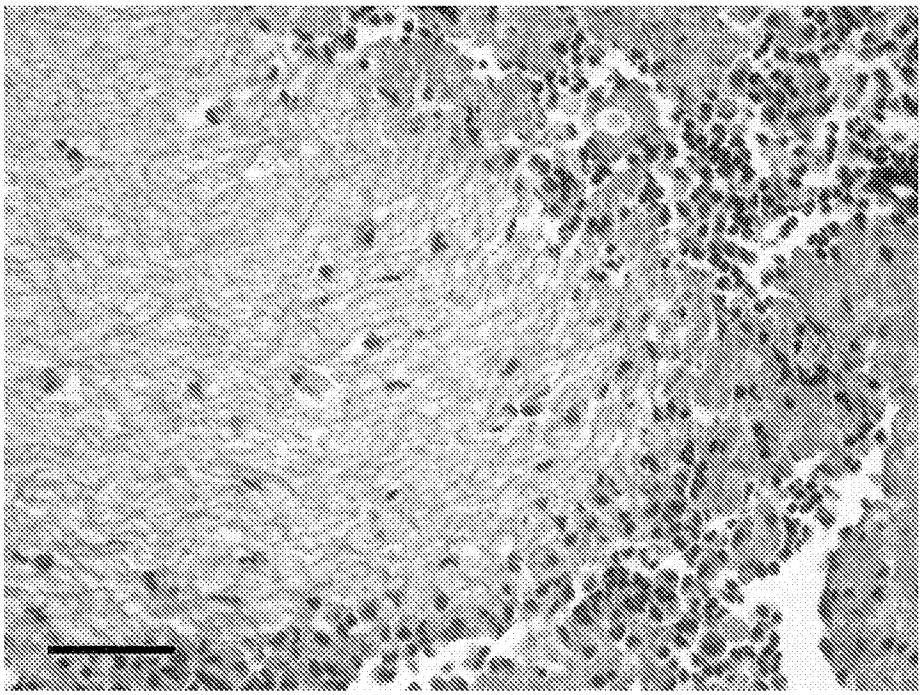


Figura 13

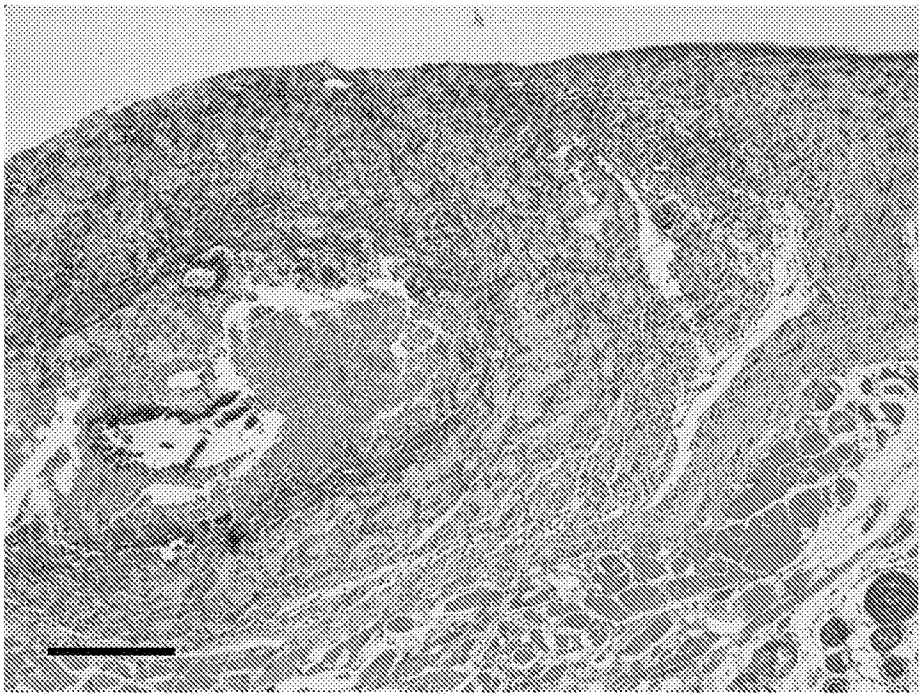


Figura 14

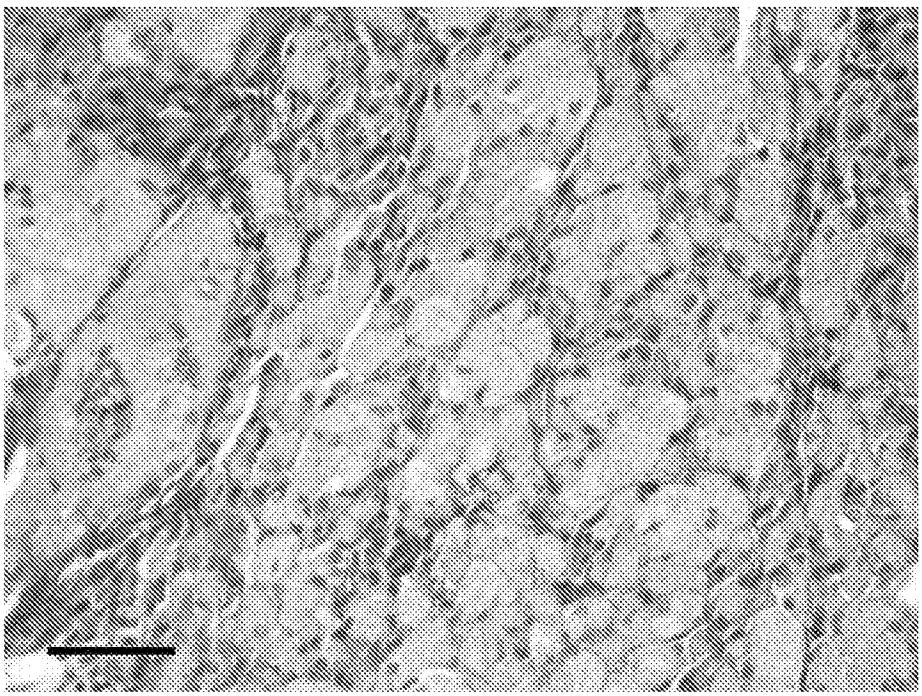


Figura 15

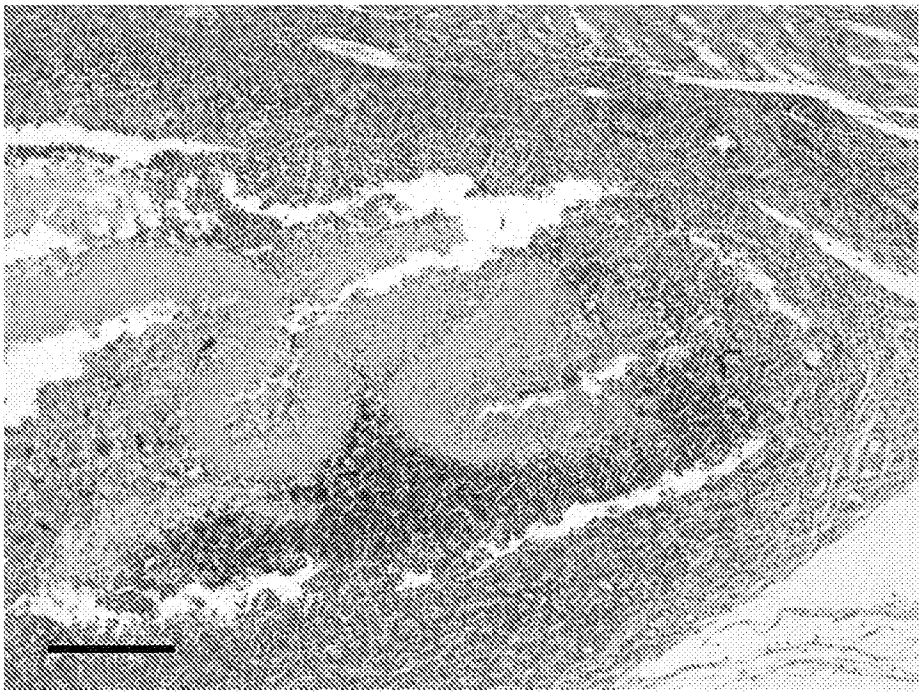


Figura 16

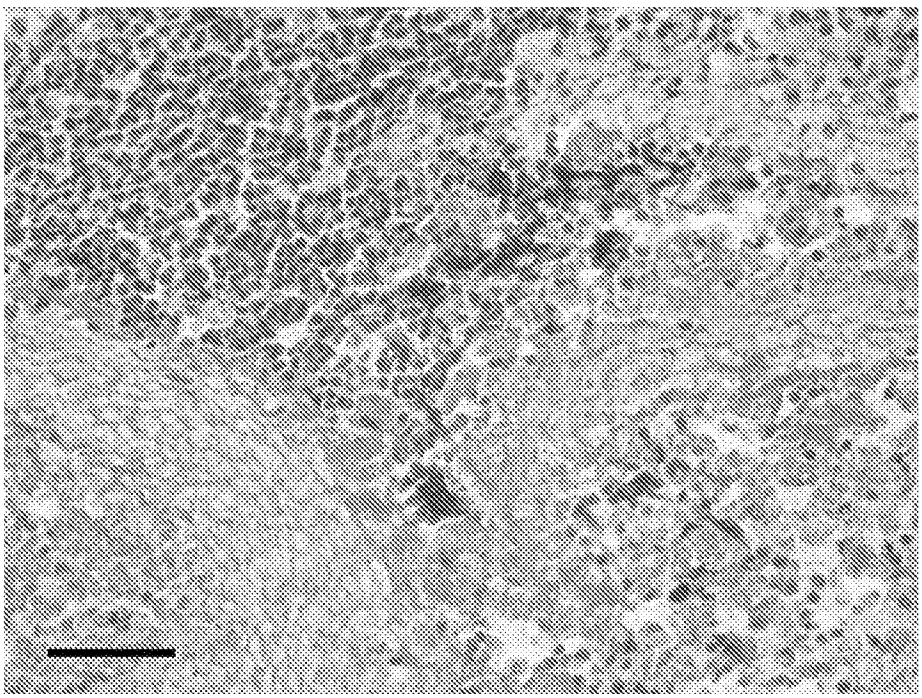


Figura 17

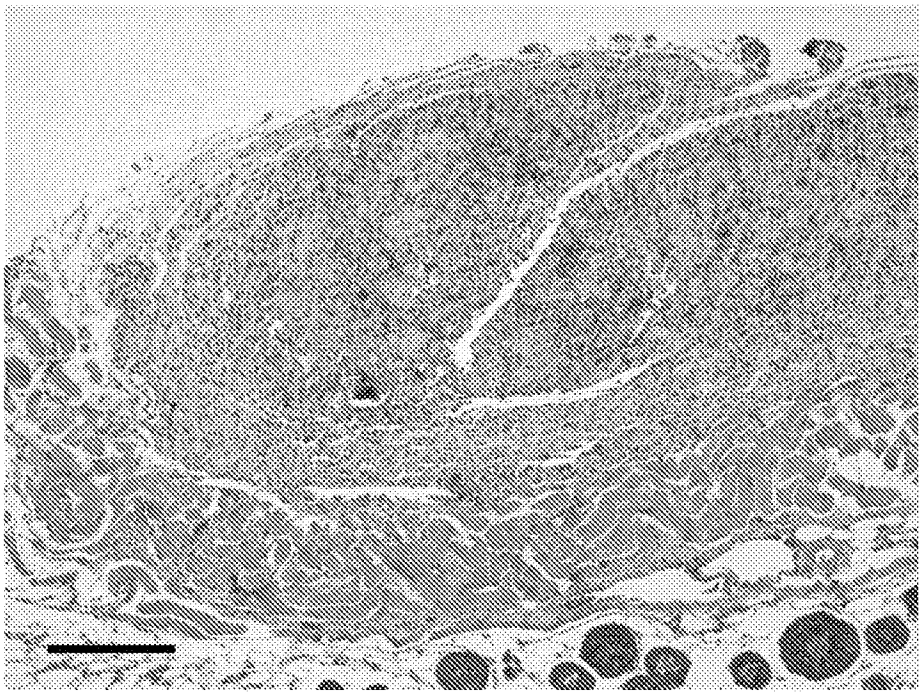


Figura 18

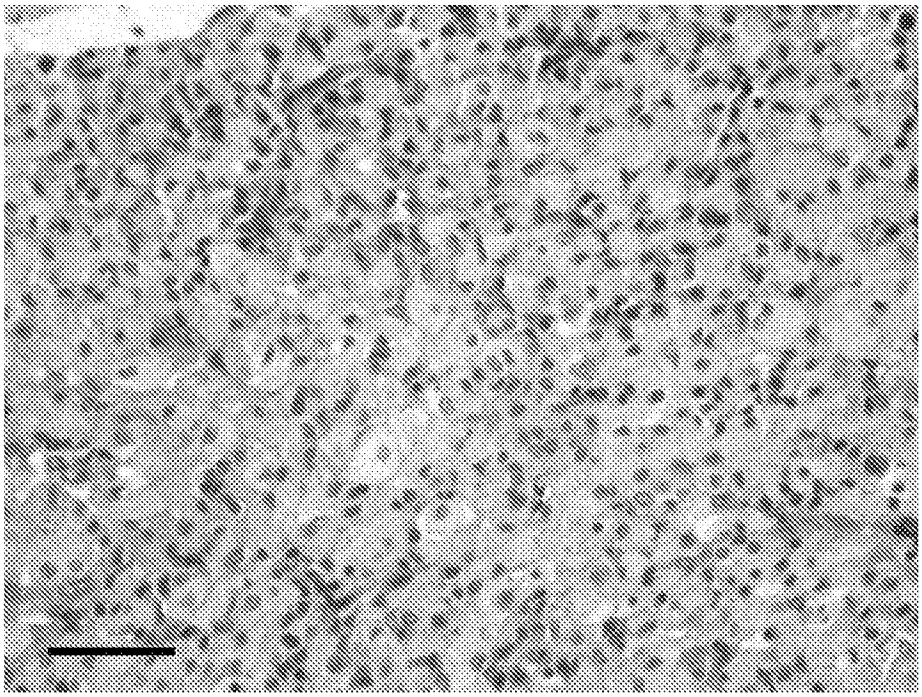


Figura 19

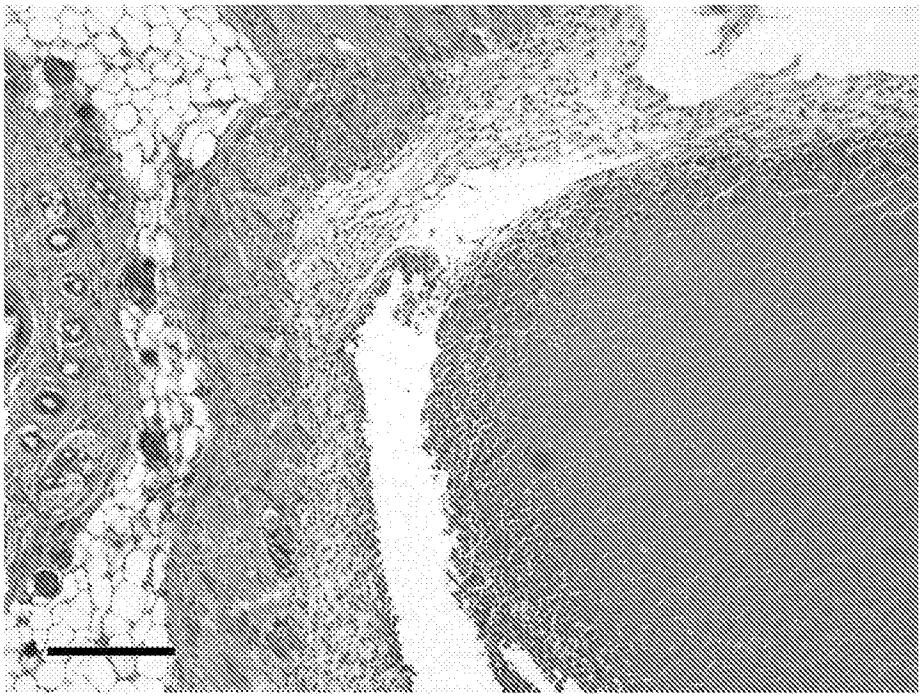


Figura 20

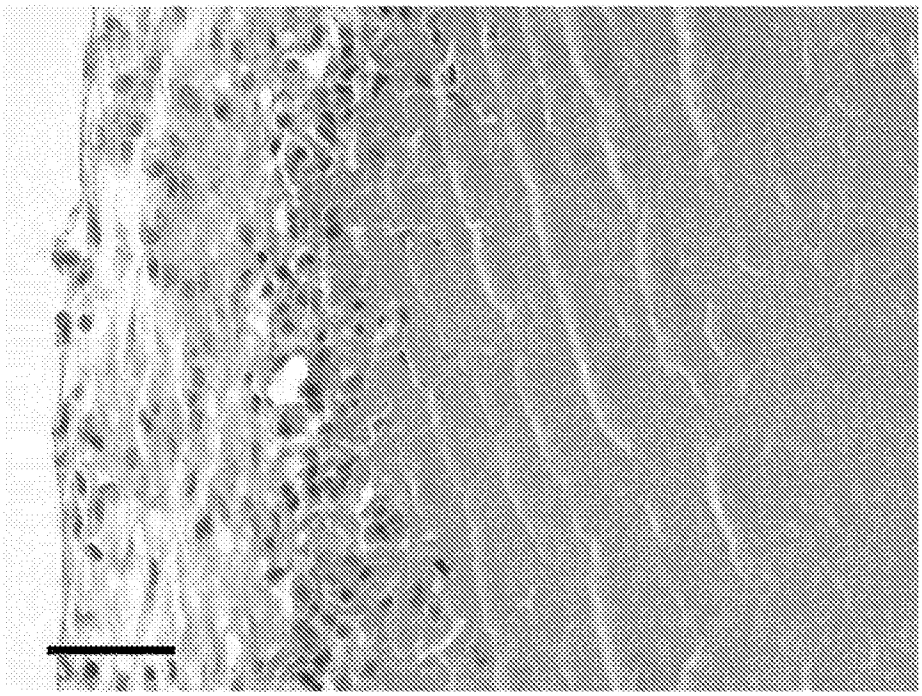


Figura 21

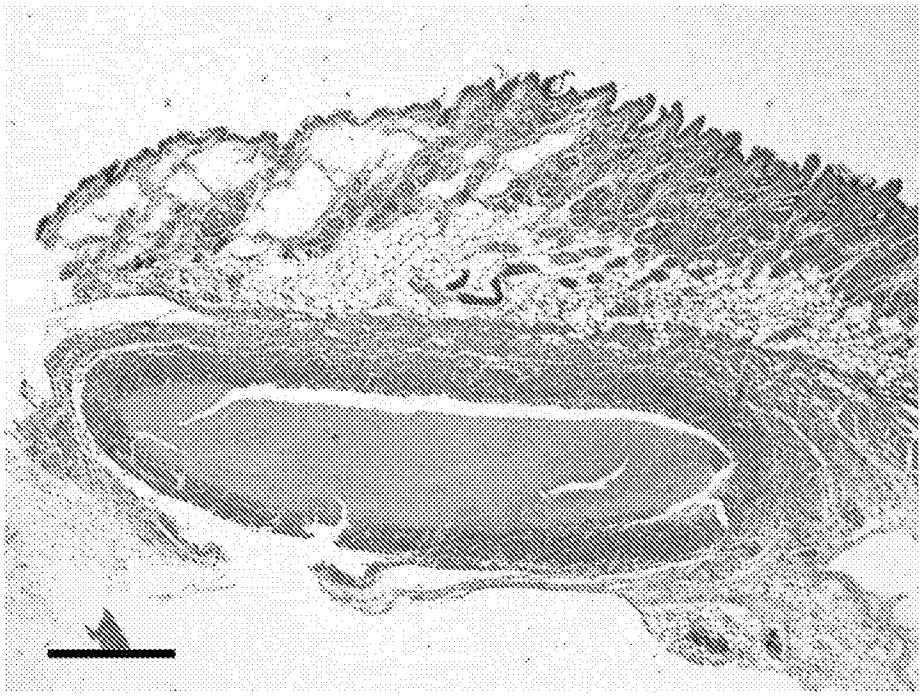


Figura 22

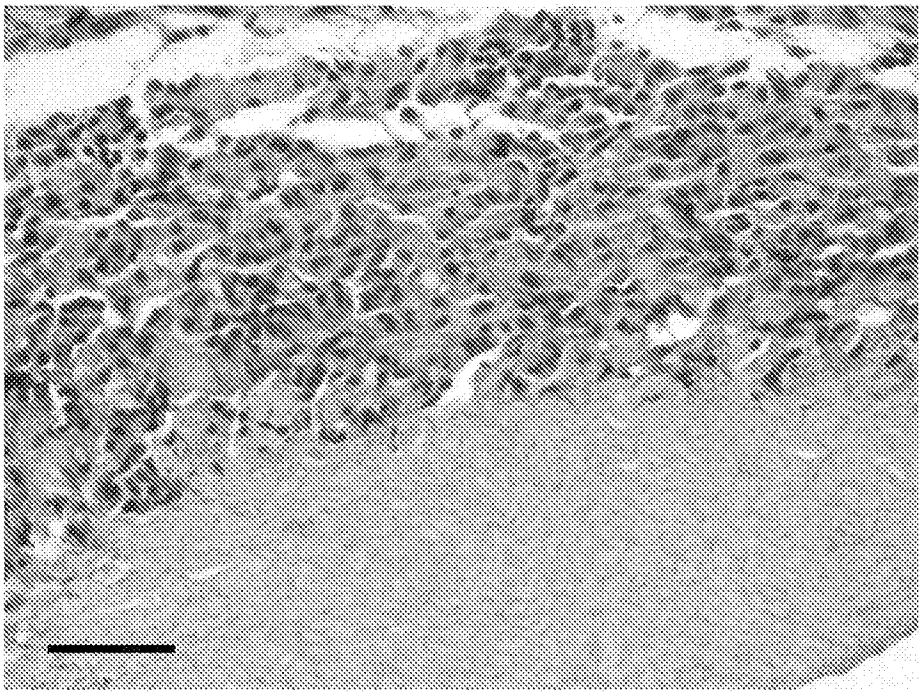


Figura 23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2017/070680

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2012269776 A1 (ALAMINOS MINGORANCE MIGUEL ET AL.) 25/10/2012, claims	1-36
Y	US 2003049301 A1 (HEDMAN THOMAS P) 13/03/2003, paragraphs 12-19	1-36
A	CHEN FA-MING et al.. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. Progress in polymer science pergamon press, Oxford, GB. 01/02/2016. Vol. 53, Pages 86 - 168, ISSN 0079-6700, <DOI: doi:10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004> paragraphs 2.1, 2.2 and 2.3	1-36
A	US 2013225669 A1 (REICH MICHAEL SETH ET AL.) 29/08/2013, the whole document	1-36

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24/01/2018	**(01/02/2018)**
Name and mailing address of the ISA/ OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Facsimile No.: 91 349 53 04	Authorized officer H. Aylagas Cancio Telephone No. 91 3498563

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2017/070680

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L27/22 (2006.01)
A61L27/54 (2006.01)
A61L27/20 (2006.01)
A61L27/38 (2006.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/ES2017/070680

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2012269776 A1	25.10.2012	JP2016165280 A	15.09.2016
		JP2013502915 A	31.01.2013
		JP6010460B B2	19.10.2016
		ES2362139 A1	29.06.2011
		ES2362139 B1	11.06.2012
		WO2011023843 A2	03.03.2011
		WO2011023843 A3	07.07.2011
		EP2471902 A2	04.07.2012
		EP2471902 A4	25.06.2014
		ES2353990 A1	09.03.2011
		ES2353990 B1	26.01.2012
---	---	---	---
US2003049301 A1	13.03.2003	US2016015555 A1	21.01.2016
		TW200526203 A	16.08.2005
		US2013087155 A1	11.04.2013
		US9192507 B2	24.11.2015
		US2011082199 A1	07.04.2011
		US9101602 B2	11.08.2015
		US2010266544 A1	21.10.2010
		US8450276 B2	28.05.2013
		US2010158887 A1	24.06.2010
		US8211938 B2	03.07.2012
		AU2002335683B B2	20.11.2008
		US2008260712 A1	23.10.2008
		WO2005020862 A1	10.03.2005
		WO2005020862 A8	19.05.2005
		US2008064021 A1	13.03.2008
		US8119599 B2	21.02.2012
		US2004253219 A1	16.12.2004
		US7435722 B2	14.10.2008
		US2007202143 A1	30.08.2007
		US2007196351 A1	23.08.2007
		US8022101 B2	20.09.2011
		US2007183973 A1	09.08.2007
		US8153600 B2	10.04.2012
		US9084772 B2	21.07.2015
		WO03020031 A1	13.03.2003
		JP2007504162 A	01.03.2007
		JP4955388B B2	20.06.2012
		JP2005501874 A	20.01.2005
		EP1660001 A1	31.05.2006
		EP1660001 A4	15.12.2010
		EP1432312 A1	30.06.2004
		EP1432312 A4	08.12.2004
		CN1578624 A	09.02.2005
		CA2536415 A1	10.03.2005
		CA2536415 C	23.07.2013
		CA2458821 A1	13.03.2003
		CA2458821 C	10.01.2012
		AU2004268628 A1	10.03.2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/ES2017/070680

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		AU2004268628B B2	12.11.2009
US2013225669 A1	29.08.2013	NONE	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2017/070680

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
A61L

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
EPODOC, INVENES, WPI, NPL, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, XPESP

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	US 2012269776 A1 (ALAMINOS MINGORANCE MIGUEL ET AL.) 25/10/2012, reivindicaciones	1-36
Y	US 2003049301 A1 (HEDMAN THOMAS P) 13/03/2003, párrafos 12-19	1-36
A	CHEN FA-MING et al.. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. Progress in polymer science pergamon press, Oxford, GB. 01/02/2016. Vol. 53, Páginas 86 - 168, ISSN 0079-6700, <DOI: doi:10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004> apartados 2.1, 2.2 y 2.3.	1-36
A	US 2013225669 A1 (REICH MICHAEL SETH ET AL.) 29/08/2013, todo el documento	1-36

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
24/01/2018	**01 de febrero de 2018 (01/02/2018)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04	Funcionario autorizado H. Aylagas Cancio Nº de teléfono 91 3498563

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2017/070680

CLASIFICACIONES DE INVENCIÓN

A61L27/22 (2006.01)
A61L27/54 (2006.01)
A61L27/20 (2006.01)
A61L27/38 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2017/070680

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2012269776 A1	25.10.2012	JP2016165280 A	15.09.2016
		JP2013502915 A	31.01.2013
		JP6010460B B2	19.10.2016
		ES2362139 A1	29.06.2011
		ES2362139 B1	11.06.2012
		WO2011023843 A2	03.03.2011
		WO2011023843 A3	07.07.2011
		EP2471902 A2	04.07.2012
		EP2471902 A4	25.06.2014
		ES2353990 A1	09.03.2011
		ES2353990 B1	26.01.2012
US2003049301 A1	13.03.2003	US2016015555 A1	21.01.2016
		TW200526203 A	16.08.2005
		US2013087155 A1	11.04.2013
		US9192507 B2	24.11.2015
		US2011082199 A1	07.04.2011
		US9101602 B2	11.08.2015
		US2010266544 A1	21.10.2010
		US8450276 B2	28.05.2013
		US2010158887 A1	24.06.2010
		US8211938 B2	03.07.2012
		AU2002335683B B2	20.11.2008
		US2008260712 A1	23.10.2008
		WO2005020862 A1	10.03.2005
		WO2005020862 A8	19.05.2005
		US2008064021 A1	13.03.2008
		US8119599 B2	21.02.2012
		US2004253219 A1	16.12.2004
		US7435722 B2	14.10.2008
		US2007202143 A1	30.08.2007
		US2007196351 A1	23.08.2007
		US8022101 B2	20.09.2011
		US2007183973 A1	09.08.2007
		US8153600 B2	10.04.2012
		US9084772 B2	21.07.2015
		WO03020031 A1	13.03.2003
		JP2007504162 A	01.03.2007
		JP4955388B B2	20.06.2012
		JP2005501874 A	20.01.2005
		EP1660001 A1	31.05.2006
		EP1660001 A4	15.12.2010
		EP1432312 A1	30.06.2004
		EP1432312 A4	08.12.2004
		CN1578624 A	09.02.2005
		CA2536415 A1	10.03.2005
		CA2536415 C	23.07.2013
		CA2458821 A1	13.03.2003
		CA2458821 C	10.01.2012
		AU2004268628 A1	10.03.2005

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2017/070680

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
		AU2004268628B B2	12.11.2009
US2013225669 A1	29.08.2013	NINGUNO	