

(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
12 de diciembre de 2024 (12.12.2024) **WIPO | PCT**

(10) Número de publicación internacional
WO 2024/252053 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
A61L 27/36 (2006.01) *A61L 27/50* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2024/070365

(22) Fecha de presentación internacional:
10 de junio de 2024 (10.06.2024)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P202330486 09 de junio de 2023 (09.06.2023) ES

(71) Solicitantes: **UNIVERSIDAD DE GRANADA** [ES/ES]; Hospital Real. Avda. del Hospicio s/n, 18071 Granada Granada (ES). **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avda. de la Constitución, 18, 41071 Sevilla Sevilla (ES).

(72) Inventores: **CARRIEL ARAYA, Víctor Sebastián**; Universidad de Granada., Dpto. de Histología, 18071 Granada Granada (ES). **CAMPOS SÁNCHEZ, Fernando**; Universidad de Granada., Departamento de Histología, 18071 Granada Granada (ES). **SÁNCHEZ PORRAS, David**; Universidad de Granada., Departamento de Histología, 18071 Granada Granada (ES). **GARCÍA GARCÍA, Óscar Darío**; Universidad de Granada., Departamento de Histología, 18071 Granada Granada (ES). **CHATO ASTRAIN, Jesús**; Universidad de Granada., Departamento de Histología, 18071 Granada Granada (ES). **LLINARES MONLLOR, Claudia**; Universidad de Granada., Departamento de Histología, 18071 Granada Granada (ES). **ESCALANTE QUIRÓS, Sandra**; Universidad de Granada., Departamento de Histología, 18071 Granada 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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).

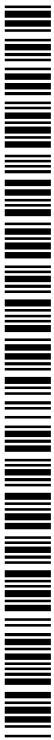
Publicada:
— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
— antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
— en blanco y negro; la solicitud internacional se presentó en colores o en escala de grises y puede descargarse de PATENTSCOPE.

(54) Title: EXTRACELLULAR MATRICES FOR USE THEREOF IN TISSUE ENGINEERING

(54) Título: MATRICES EXTRACELULARES PARA SU USO EN INGENIERÍA TISULAR

(57) Abstract: The present invention discloses a decellularisation method for generating acellular extracellular matrices having a specific structure and dimensions, said method optionally including a cross-linking treatment with chemical agents. The invention discloses additional treatments for the storage or functionalisation thereof. The present invention also relates to the acellular extracellular matrices obtained by said method and to the use of said matrices, preferably in the clinical setting, for repairing damaged tissue.

(57) Resumen: La presente invención describe un procedimiento de descelularización para la generación de matrices extracelulares acelulares, de estructura y dimensiones específicas, que incluye opcionalmente un tratamiento entrecruzante con agentes químicos. Se describen tratamientos adicionales para su almacenamiento o funcionalización. La presente invención también se refiere a las matrices extracelulares acelulares obtenidas por dicho método y el uso de dichas matrices, preferente en la clínica, para la reparación de tejidos dañados.



WO 2024/252053 A1

MATRICES EXTRACELULARES PARA SU USO EN INGENIERÍA TISULAR

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se enmarca en el campo de la ingeniería tisular, disciplina que aplica
5 principios de la biología, la medicina y la ingeniería para el desarrollo de estrategias encaminadas a la reparación, reemplazo, y/o mejora de tejidos u órganos dañados.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Gracias al desarrollo tecnológico, hoy en día existen diversas técnicas de biofabricación de tejidos y órganos que permiten generar sustitutos bioartificiales para uso clínico. Los procesos
10 de biofabricación convencional suelen emplear 3 elementos básicos: células (bien células madre o bien diferenciadas), biomateriales (sustancias diseñadas para interactuar con los sistemas biológicos con un propósito médico) y/o diversos factores de estimulación del crecimiento celular y tisular (bioreactores y factores de crecimiento). En este contexto, los biomateriales juegan un rol crucial, ya que imitan la estructura y propiedades físicas, biológicas y químicas de la matriz
15 extracelular (MEC) nativa, lo cual promueve los procesos de regeneración tisular y estimula la función celular.

Las propiedades fundamentales que debe presentar un biomaterial varían de acuerdo a su aplicación. En general, deben poseer ciertas propiedades biomecánicas, medidas como visco-elasticidad, memoria, deformación, resistencia; propiedades estructurales, tales como porosidad,
20 organización 3D, alineación; y propiedades biológicas que vienen dadas por la biodegradabilidad, biocompatibilidad y capacidad de ser proregenerativos. Además, la composición química y molecular de los biomateriales debe favorecer la función celular (adhesión, migración, proliferación y diferenciación) y evitar reacciones adversas.

Si bien, existe una gran variedad de biomateriales (naturales, sintéticos o mixtos) el componente
25 ideal no existe, y por tanto la generación de nuevos biomateriales para su uso clínico sigue siendo un reto importante en el ámbito de la ingeniería tisular.

Los biomateriales sintéticos aportan propiedades biomecánicas adecuadas y permiten una degradación controlada, pero suelen ser muy rígidos, hidrófobos y los productos de su biodegradación pueden ser tóxicos. Por el contrario, los biomateriales naturales son más
30 biocompatibles, promueven un alto grado de interacción célula-biomaterial, suelen ser hidrófilos

y favorecen los procesos celulares y por tanto la regeneración tisular. No obstante, algunos biomateriales naturales, sobre todo aquellos altamente purificados, presentan escasas propiedades biomecánicas, composición químico-molecular simple y son degradados rápidamente.

- 5 La alta complejidad estructural y de composición químico-molecular de la matriz extracelular (MEC), esencial para los procesos de regeneración tisular y protocolos de ingeniería tisular, es extremadamente difícil de reproducir en laboratorio por las técnicas de biofabricación convencionales. A día de hoy, los biomateriales, ya sea sintéticos o naturales, rara vez son capaces de recrear la estructura, composición y propiedades biomecánicas de una matriz nativa.
- 10 En este sentido, es fundamental poder generar matrices naturales que estén constituidas por los elementos principales de la MEC nativa.

Los biomateriales no reabsorbibles que se utilizan a nivel clínico, como siliconas, resinas y metales, suelen inducir una respuesta inflamatoria leve y transitoria, la cual se caracteriza por la formación de una capsula de tejido conectivo alrededor del biomaterial. Este proceso de

15 encapsulación, que generalmente es una respuesta no deseada, puede constituir una nueva estrategia para la generación de matrices 3D nativas para diversas aplicaciones biomédicas, incluida la ingeniería tisular. En un estudio previo [1], se indujo la encapsulación alrededor de tubos de cloruro de polivinilo (PVC) implantados junto al nervio ciático de ratas y, que se extrajeron al cabo de un tiempo. La matriz resultante, formada en la zona del implante, fue

20 utilizada como conducto para la reparación de una lesión nerviosa de 1,5 cm de longitud causada en el nervio adyacente. Este trabajo demostró la utilidad del tejido fibroso formado alrededor del biomaterial no reabsorbible en la reparación neural. Sin embargo, la estrategia utilizada en ese estudio no tiene aplicación clínica, ya que no es posible inducir la formación de este tipo de matrices en humanos y que estas estén disponibles clínicamente para aplicaciones

25 concretas. En el caso de las lesiones de nervios periféricos, la reparación quirúrgica debe ser realizada de urgencia, en una ventana de tiempo breve de aproximadamente 48-72 horas, con lo que esta no es una estrategia viable. Recientemente, conductos similares fueron generados y descelularizados para la reparación de segmentos vasculares. No obstante, no existen datos suficientes de las características de las matrices generadas, de sus propiedades biomecánicas

30 y de la composición químico-molecular de su MEC [2-4].

La generación *in vivo* de matrices naturales a través de la encapsulación de biomateriales inertes ha resultado ser una alternativa prometedora en ingeniería tisular a nivel experimental, pero con limitada aplicación clínica. Este método induce la formación de una MEC nativa, compuesta por diversas moléculas, las cuales podrán adquirir la morfología deseada (membranas, conductos,

mallas, estructuras saculares, etc.), siendo una gran ventaja en comparación a los biomateriales sintéticos e incluso la mayoría de los polímeros naturales comúnmente utilizados (fibrina, colágeno, alginato, quitosan, etc.). Este método permite generar una estructura con un nivel de organización y complejidad celular difícil de obtener mediante los procedimientos de biofabricación convencionales.

Dadas las limitaciones para aplicar este método a nuestra especie, se utilizan modelos animales, y por tanto, las matrices xenogénicas generadas deben ser sometidas a un proceso de descelularización eficiente, que asegure reducir la inmunogenicidad y preserve gran parte de las moléculas de MEC [5]. Gracias a este proceso se pueden generar nuevas matrices acelulares tejido-específicas que proporcionan una adecuada MEC debidamente organizada que provee un microambiente idóneo para la regeneración tisular. Esto ha sido demostrado mediante el uso de aloinjertos nerviosos en un modelo de lesión y reparación neural [6].

Sin embargo, los procesos de descelularización a menudo resultan en una alteración irreversible de la estructura, composición y biomecánica de la MEC lo que limita considerablemente sus aplicaciones biomédicas. Así pues, las actuales matrices acelulares comerciales de origen animal no presentan un patrón estructural definido y cuentan con escasas propiedades biomecánicas.

Las propiedades biomecánicas y estructurales de diversos biomateriales, incluidas las matrices descelularizadas, pueden ser mejoradas mediante técnicas de entrecruzamiento o *crosslinking*, proceso por el cual se unen químicamente dos o más moléculas mediante un enlace covalente.

Dentro de los métodos entrecruzamiento los hay físicos como la nanoestructuración [8,9] y químicos como el uso de glutaraldehído y de genipín (GP) [6, 8]. El GP es un glucósido iridoide natural, extraído y purificado de la *Gardenia jasminoides*, el cual ha surgido como alternativa al glutaraldehído [8]. Este agente ha sido utilizado con éxito para el entrecruzamiento de diversos biomateriales (quitosano, colágeno, fibrina-agarosa, etc.) y MEC descelularizadas con una evidente mejora de las propiedades biomecánicas y una mejor biocompatibilidad y propiedades biológicas que el glutaraldehído [9, 10]. Recientemente, se ha aplicado GP para inducir el entrecruzamiento de los componentes de la MEC en nervios descelularizados logrando un incremento significativo de las propiedades biomecánicas y manteniendo un alto grado de biocompatibilidad y su patrón estructural [11].

También se han desarrollado diversos métodos químicos de descelularización tisular, los cuales han sido aplicados a la generación de nervios descelularizados con resultados *ex vivo* e *in vivo* [5] muy prometedores.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 La presente invención proporciona un nuevo producto de terapia avanzada generado por nuevas técnicas de ingeniería tisular, en concreto, describe una matriz extracelular (MEC) natural 3D para uso clínico en el campo de la biomedicina, medicina regenerativa y la cirugía.

Para ello, se parte de una técnica de síntesis *in vivo* de matriz extracelular (MEC) natural, mediante el implante en modelos animales de moldes inertes, con estructura y dimensiones
10 definidas, que permiten generar MEC naturales complejas con forma y dimensiones variables.

El modelo animal utilizado para la implantación del molde puede variar en su tamaño y características en función de las necesidades técnicas de cada caso, siendo, de forma general, un mamífero no humano. Se pueden utilizar diversos modelos animales (bovinos, cerdos, cabras, etc.) y, por tanto, llevar a cabo una producción a gran escala de estos productos. Esto no afectaría
15 al bienestar de los animales utilizados ni al destino de estos, por lo que se pueden utilizar animales destinados a la industria alimenticia, o pertenecientes a proyectos de investigación. Se tendría especial preferencia por el uso de aquellas especies que tengan un mayor porcentaje de homología genética y molecular.

Los moldes implantados en los modelos animales están constituidos por biomateriales de uso
20 clínico, los cuales no tienen impacto alguno en el bienestar animal. El procedimiento de implantación es simple, económico y rápido. Estos moldes pueden ser de distintos materiales inertes y no absorbibles tales como PVC, silicona, aluminio, titanio, etc. La implantación de biomateriales con estas características induce la formación de tejido conjuntivo alrededor de los mismos, que se extrae tras 1 o 2 meses, dependiendo del grado de maduración del tejido
25 requerido.

Así, los tejidos biológicos obtenidos por la implantación subcutánea de los moldes tienen unas dimensiones y un espesor controlado, con una morfología variable, atendiendo a las necesidades del producto deseado. Este tejido conjuntivo está compuesto por diversos elementos de la MEC, entre los que se encuentran diversas fibras y elementos no fibrilares. La MEC resultante además
30 de tener un espesor, dimensiones y estructura 3D predefinidos, está debidamente estructurada y se caracteriza por una adecuada proporción y organización de sus moléculas, asegurando un alto grado de biomimicidad. Esto supone una ventaja considerable en comparación con los

métodos de biofabricación convencionales como la impresión 3D y/o el electrospinning. Si bien estos métodos permiten regular diversos parámetros estructurales y de degradación, las matrices así obtenidas carecen de biomimicidad, tienen menor biocompatibilidad y no logran un grado de complejidad químico-molecular como el aquí descrito. Además, se reduce considerablemente la complejidad de los procesos de biofabricación respecto a los convencionales, ya que no se requiere de un equipamiento complejo (como impresoras 3D, electrospinning y/o bioreactores). Asimismo, se reduce el uso de biomateriales para la generación de las matrices, compuestos que en general requieren ser altamente purificados y están disponibles en cantidades muy escasas. En la presente memoria se describe un ejemplo una estructura tubular obtenida mediante este método.

Estas MEC se someten a un nuevo procedimiento de descelularización que disminuye la inmunogenicidad, capaz de eliminar eficazmente los elementos celulares, y que a su vez asegura la preservación de los principales elementos de la MEC, como son los componentes fibrilares (fibras colágenas) y no fibrilares (proteoglicanos y glicoproteínas) con un patrón microestructural adecuado para su utilización *in vivo*. Se trata de un protocolo novedoso de descelularización química basado en la combinación de detergentes y agentes enzimáticos (DNAsas y RNAsas), que permite obtener una matriz extracelular totalmente libre de elementos celulares.

De forma previa a someter a los tejidos biológicos aislados al proceso de descelularización puede ser necesario realizar un paso previo de eliminación del dimetilsulfóxido (DMSO) si la muestra ha estado preservada por congelación hasta su uso en una solución de criopreservación que contiene DMSO, siendo de forma habitual 10%DMSO en solución de suero fetal bovino (FBS). Así pues, en esos casos se procede de forma previa al procedimiento de descelularización de la invención, a la eliminación DMSO de la muestra, preferentemente mediante lavado con agua destilada.

El nuevo procedimiento de descelularización de la invención consta de las siguientes etapas:

- a) provocar la lisis celular, preferentemente por choque osmótico con agua destilada, ya que resulta mínimamente agresivo para la estructura de los tejidos,
- b) eliminar material citoplasmático y celular, preferentemente con un detergente tensoactivo aniónico, como el dodecilsulfato sódico (SDS), y retirar los restos de detergente mediante lavado con agua destilada,
- c) disociar interacciones lipídicas, preferentemente con un detergente tensoactivo no aniónico, como Tritón X-100, y retirar los restos de detergente mediante lavado con agua destilada,

d) disociar las proteínas intracelulares, preferentemente con un detergente aniónico, más preferentemente con uno distinto al utilizado previamente en el paso c), como el desoxicolato sódico (SDC), y retirar los restos de detergente mediante lavado con agua destilada, y

5 e) degradar ARN y ADN, preferentemente con RNasa y DNasa e inactivar los agentes enzimáticos y retirar los restos de enzimáticos y detergente mediante lavado con tampón fosfato salino (PBS).

La retirada de los restos de detergentes y agentes enzimáticos utilizados en el paso b) a e), mediante lavado con agua o con PBS según corresponda, se realiza preferentemente en frío, en concreto a 4°C de temperatura, para bloquear la actividad digestiva y enzimática. La digestión 10 enzimática del paso e) se realiza a preferentemente a 37°C, mientras que el resto del proceso se puede realizar a temperatura ambiente.

Los detergentes de los pasos b), c) y d) se solubilizan preferentemente en agua destilada, mientras que la degradación de ARN y ADN del paso e), se realiza preferentemente con RNasa y DNasa en disolución de tampón fosfato con sodio y magnesio.

15 La agitación acelera los procesos de lisis del paso b) y facilita el uso eficaz de los detergentes en los pasos b), c) y d). Este agente físico para acelerar los procesos puede ser sustituido por otros métodos como la sonicación (que requiere optimización) o no utilizar ninguna, pero incrementando las horas o días de duración de cada paso. En tal caso puede ser necesario un incremento de la temperatura en la que se llevan a cabo dichos procesos. Por tanto, se pueden 20 combinar los siguientes factores: tiempo de exposición, temperatura, concentraciones de los detergentes y agentes enzimáticos utilizados y la aplicación o no de agentes físicos (agitación o sonicación), para la optimización del procedimiento. En la presente invención el paso a) y la exposición a detergentes de los pasos b) a d) se realizan preferentemente en agitación.

Cabe la posibilidad de añadir en el último paso e) antibióticos y/o antimicóticos junto con el PBS 25 con el que se realiza el lavado para inactivar los agentes enzimáticos y retirar los restos de enzimáticos y detergente. Entre los antibióticos de preferencia están los de amplio espectro, y preferentemente se utilizan mezclas de penicilina y estreptomicina. Entre los antimicóticos de preferencia están los de amplio espectro, y preferentemente se utiliza anfotericina B.

Un ejemplo detallado de cómo llevar a cabo el protocolo de descellularización se describe a 30 continuación en la **Tabla 1**. Tanto los tiempos de exposición como las concentraciones de los detergentes y agentes enzimáticos se pueden variar para ajustarlos a las características concretas de los tejidos a tratar.

Tabla 1. Protocolo detallado de descelularización a partir de una muestra criopreservada.

Protocolo	Tiempo	Efecto
Lavados con agua destilada	8 x 5 min (TA/agitación)	Eliminar DMSO
Agua destilada	7 h (TA/agitación)	Lisis celular por choque osmótico
SDS 0,1%	24 h (TA/agitación)	Eliminar material citoplasmático y celular
Agua destilada	3 x 30 min (4°C)	Eliminar detergente
Tritón X-100 0,6 %	24 h (TA/agitación)	Disociación interacciones lipídicas
Lavados con agua destilada	3 x 30 min (4°C)	Eliminar detergente
SDC 1%	24 h (TA/agitación)	Disociación proteínas intracelulares
Lavados con agua destilada	3 x 30 min (4°C)	Eliminar detergente
100 mg/l DNasa + 20 mg/l RNasa	45 min (37°C)	Degradación ADN y ARN
Lavados con PBS	5 x 15 min (4°C)	Inactivar enzimas y eliminar residuos de las mismas y de detergentes remanentes.

TA: Temperatura Ambiente.

Las MEC acelulares obtenidas por dicho procedimiento son altamente biocompatibles y no inmunogénicas, presentando un bajo riesgo de rechazo, ya que los elementos capaces de inducir una respuesta inmunológica, las células, han sido eliminadas durante la descelularización.

La MEC generada mediante este proceso de descelularización sigue presentando un alto nivel de complejidad estructural y química, lo que supone una ventaja importante en comparación a los procesos de biofabricación convencionales.

La MEC una vez descelularizada puede ser sometida a un proceso posterior de entrecruzamiento químico con genipín (GP) u otro agente de similares características, el cual otorga estabilidad biomecánica y estructural al producto generado. Las matrices tridimensionales acelulares tratadas con GP ven incrementadas sus propiedades biomecánicas, estabilidad estructural y reducida su biodegradabilidad *in vivo*, manteniendo un alto grado de biocompatibilidad *ex vivo* e *in vivo*, lo que las convierte en candidatas idóneas para su utilización en diversos protocolos de ingeniería tisular.

Por resumir, el procedimiento de la invención parte de tejidos biológicos crecidos por la implantación subcutánea o intramuscular de un material inerte no reabsorbible de estructura y dimensiones definidas en un modelo animal. La cápsula de tejido conectivo generada espontáneamente por el animal tras 1, 2 o más meses desde la implantación del implante es
5 posteriormente recolectado junto con material implantado. Los implantes son lavados y almacenados en solución buffer fosfato (PBS) con 5% de antibióticos por al menos 24 hrs para después proceder a la liberación del biomaterial generado del dispositivo implantado. Este tejido biológico aislado puede ser conservado hasta su uso mediante técnicas de criopreservación en una solución al 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) en suero bovino fetal o similar a -80°C.

- 10 El tejido biológico o biomaterial así obtenido se somete al proceso de descelularización de la presente invención, el cual se lleva cabo tal y como se ha descrito previamente.

Posteriormente cabe la posibilidad de someter la matriz extracelular acelular a un entrecruzamiento químico con agentes químicos como el genipín, tras el cual se procede a un lavado de la matriz, preferentemente en PBS 0.1M pH 7.2-7.4.

- 15 Tanto el proceso de descelularización, como el de entrecruzamiento que aquí se describen son procedimientos simples y no requieren de equipamiento específico.

Para su uso a corto plazo las MEC descelularizadas se pueden almacenar en frío, preferentemente a 4°C, en PBS estéril y opcionalmente suplementado con antibióticos por un período de 7 días.

- 20 Las matrices extracelulares acelulares, bien tras la descelularización o bien tras el entrecruzamiento químico, pueden ser funcionalizadas mediante la adición de diversos tipos celulares, factores de crecimiento, vesículas extracelulares, biomoléculas y/o secuencias esenciales para inducir la regeneración tisular y función celular en cada caso. Por ejemplo, las MEC pueden funcionalizarse con secuencias RGD (Arg-Gly-Asp), secuencias bastante comunes
25 en las proteínas de unión a la superficie celular, o mediante la incorporación de moléculas de la MEC como laminina, fibronectina o ácido hialurónico y nanopartículas entre otros.

Todos estos pasos se realizan bajo condiciones de esterilidad.

- El método de la presente invención permite controlar las propiedades biomecánicas de las matrices obtenidas, y tras el proceso de descelularización y entrecruzamiento proporciona un
30 material muy resistente y, por tanto, fácil de manejar desde el punto de vista quirúrgico.

Por tanto, la presente invención describe matrices extracelulares acelulares, generadas a partir de tejidos biológicos, preferentemente tejidos biológicos crecidos por inducción controlada de los procesos de síntesis de matriz extracelular en animales mamíferos no humanos permitiendo obtener tejidos biológicos de dimensiones y formas predeterminadas. El tejido biológico de
5 partida no se ve particularmente limitado, pudiéndose aplicar el tratamiento de descelerización de la presente invención a cualquier tejido biológico aislado. El procedimiento de descelerización de la presente invención permite obtener matrices extracelulares acelulares que presentan las propiedades biomecánicas y biológicas necesarias para su aplicación en ingeniería tisular, ya que no se alteran las propiedades biomecánicas de los tejidos biológicos de
10 partida. Posteriormente, las matrices extracelulares acelulares obtenidas pueden ser opcionalmente tratadas con el agente entrecruzante GP para la mejora de sus propiedades. Finalmente, estas matrices extracelulares acelulares pueden ser preparadas para su almacenamiento o funcionalizadas con diversos tipos celulares, factores de crecimiento o biomoléculas esenciales.

15 En definitiva, las matrices extracelulares acelulares tal y como se describen en la presente memoria constituyen un nuevo producto de terapia avanzada para uso clínico.

Las aplicaciones de las matrices extracelulares acelulares de la presente invención son muy diversas, ya que se trata de biomateriales naturales cuya estructura, dimensiones y biomecánica puede ser controlada en función de las necesidades. Pueden ser utilizadas en protocolos de
20 ingeniería tisular con fines de investigación; también para uso clínico, con un alto potencial de aplicación en diversas patologías y lesiones estructurales que afecten a distintos tejidos.

Además, utilizando moldes de determinadas dimensiones y morfología es posible generar matrices extracelulares que respondan a necesidades anatómicas concretas, como pueden ser nervios periféricos, vasos sanguíneos, tendones, túnica ocular, uretra o vejiga, o como la
25 estructura tubular que se describe en el ejemplo de realización de esta invención.

La implantación de estas matrices promueve la regeneración tisular en el tiempo. Su implantación en combinación con células y factores de crecimiento potencia la adhesión y proliferación celular, de modo que el biomaterial resultante puede llegar a sustituir al material nativo, cumpliendo sus funciones fisiológicas de forma satisfactoria. Así pues, estas matrices extracelulares acelulares
30 pueden servir de plataformas para la generación de sustitutos más complejos, los cuales pueden ser funcionalizados con diversas fuentes celulares y/o factores de crecimiento mejorando considerablemente sus futuras aplicaciones biomédicas.

Un **primer aspecto** de la invención describe un procedimiento para la obtención *ex vivo* de una matriz extracelular acelular a partir de un tejido conectivo previamente aislado de un animal mamífero no humano, o **procedimiento de la invención**, caracterizado por que comprende un proceso de descelularización que comprende el lavado del tejido biológico, la lisis celular por choque osmótico y la aplicación de una combinación de detergentes tensoactivos aniónicos y no aniónicos, y de agentes enzimáticos para degradar ADN y ARN.

Preferentemente se incluye una fase lavado tras la aplicación de los detergentes y los agentes enzimáticos.

Preferentemente, las etapas del proceso de descelularización comprenden:

- 10 a) lisis celular con agua destilada,
- b) uso de un detergente tensoactivo aniónico, y posterior lavado con agua destilada,
- c) uso de un detergente tensoactivo no aniónico, y posterior lavado con agua destilada,
- d) uso de un detergente aniónico, idéntico o distinto al del paso c), y posterior lavado con agua destilada, y
- 15 e) uso de RNasa y DNasa, y posterior lavado con una solución que comprende tampón fosfato salino.

En una realización preferida el detergente tensoactivo aniónico del paso b) es dodecilsulfato sódico. En otra realización preferida el detergente tensoactivo no aniónico del paso c) es Tritón X-100. En otra realización preferida el detergente aniónico del paso d) es desoxicolato sódico.

- 20 En otra realización preferida el lavado con agua destilada de los pasos b) a d) y el lavado con tampón fosfato salino del paso e) se realiza en frío, preferentemente a 4°C de temperatura, la aplicación de RNasa y DNasa del paso e) se realiza a 37°C, y el resto del procedimiento se realiza a temperatura ambiente.

- 25 En otra realización preferida el paso a) y la aplicación de detergentes de los pasos b), c) y d) se realizan en agitación.

En otra realización preferida en el paso e) la solución que comprende tampón fosfato salino además comprende antibióticos y/o antimicóticos.

En otra realización aún más preferida en el paso a) la lisis celular se provoca con un lavado en agua destilada de 7 horas, a temperatura ambiente con agitación, en el paso b) el tratamiento con dodecilsulfato sódico es al 0,1% durante 24 horas a temperatura ambiente, con agitación y el posterior lavado con agua destilada consiste en 3 lavados de 30 min cada uno a 4°C, en el

5 paso c) el tratamiento con Tritón X-100 es al 0,6% durante 24 horas, a temperatura ambiente, con agitación, y el posterior lavado con agua destilada consiste en 3 lavados de 30 min cada uno a 4°C, en el paso d) el tratamiento con desoxicolato sódico es al 1% durante 24 horas a temperatura ambiente, con agitación y el posterior lavado con agua destilada consiste en 3 lavados de 30 min cada uno a 4°C, en el paso e) la digestión enzimática se lleva a cabo con

10 100mg/l DNasa + 20mg/l RNasa por 45 min, a 37°C, y posterior el lavado con tampón fosfato salino 0.1M (pH 7.2-7.4) con 2% antibióticos y antimicóticos consiste en 5 lavados de 15 min cada uno a 4°C.

En otra realización aún más preferida adicionalmente se lleva a cabo un paso adicional f) de entrecruzamiento químico, preferentemente con genipín, y posterior lavado.

15 En otra realización aún más preferida el tejido biológico aislado ha sido sometido antes de su descelularización a criopreservación. En ese caso, preferentemente de forma previa al procedimiento de descelularización se realiza el lavado de tejido biológico con agua destilada.

En otra realización aún más preferida la matriz extracelular acelular obtenida tras el paso e) de la descelularización o tras el paso f) del entrecruzamiento es funcionalizada mediante la adición

20 de tipos celulares y/o factores de crecimiento y/o biomoléculas esenciales para inducir la regeneración tisular y función celular.

En una realización aún más preferida el tejido biológico aislado de partida ha crecido en el animal mamífero no humano gracias a la implantación de un molde compuesto de biomateriales no reabsorbibles. En una realización aún más preferida el tejido biológico aislado del animal

25 mamífero no humano de partida ha crecido alrededor de un molde compuesto de biomateriales no reabsorbibles.

Un **segundo aspecto** de la invención describe una **matriz extracelular acelular** obtenible por el procedimiento de la invención.

Preferentemente, la matriz extracelular acelular tiene una estructura tubular, sacular, plana o

30 mallada.

Un **tercer aspecto** de la invención describe el **uso** de la matriz extracelular acelular de la invención en ingeniería tisular, preferiblemente en la reparación y/o la sustitución del material nativo dañado y más preferiblemente para reparar y/o sustituir nervios periféricos, vasos sanguíneos, uretra, vejiga, tendones, túnica ocular, pared abdominal, mucosas o superficies epiteliales.

Un experto en la materia podría introducir cambios o modificaciones en los ejemplos o realizaciones particulares de realización descritos sin salirse de esta invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Implante y extirpación de conductos de silicona en el tejido subcutáneo de roedores.

Figura 2. Prueba de transparencia y cuantificación del ADN de los bioconductos nativos y descelularizados de 1 mes (T1M) y 2 meses (T2M). **(A)** Imágenes macroscópicas de bioconductos de T1M y T2M representativos de cada condición: control (CTR) y descelularizados (D). **(B)** Resultados gráficos la cuantificación del ADN y **(C)** el análisis de la transparencia de los nervios nativos y descelularizados en T1M y T2M.

Figura 3. Resultados mecánicos de tracción de los bioconductos nativos de 1 mes y de 2 meses control (T1M-CTR y T2M-CTR), descelularizados (T1M-D y T2M-D) y descelularizados y entrecruzados con genipín (T1M-DG y T2M-DG). Representación gráfica de los resultados del **(A)** Módulo de Young, **(B)** la deformación por tracción y **(C)** el esfuerzo a la rotura.

Figura 4: Análisis histológico de tejidos de 1 y 2 meses (T1M y T2M) en condiciones control, descelularizados y descelularizados y entrecruzados con genipín (CTR, D y DG), realizado en secciones histológicas teñidas con HE y DAPI. Análisis estructural de T1M-CTR, T1M-D, T1M-DG, T2M-CTR, T2M-D y T2M-DG con técnica SEM. **(A)** Imágenes de tinción HE a 4x de aumento. Se observa un tejido conectivo denso que define una estructura tubular. **(B)** Imágenes de tinción HE a 20 aumentos. En las muestras D y DG de T1M y T2M no se observa ningún núcleo. **(C)** Imágenes de la tinción con DAPI donde se observan muchos núcleos en T1M-CTR y T2M-CTR y la ausencia de estos en la condición D y DG. **(D)** Vista general de CTR, D y DG en los bioconductos T1M y T2M obtenida con la técnica microscopía electrónica de barrido. **(E)** Imágenes de la técnica SEM que aprecian la organización fibrilar del tejido conectivo denso en cada condición en T1M y T2M.

Figura 5: Análisis histológico de los componentes de la matriz extracelular de los bioconductos nativos, descelularizados y descelularizados y entrecruzados con genipín en T1M y T2M. **(A)**

Tinción con azul Alcian en todas las condiciones y tiempos (**B**) Tinción con orceína en las distintas matrices generadas (**C**) Las imágenes del método histoquímico Picrosirius muestran la conservación de las fibras de colágeno en todos los grupos. (**D**) Las imágenes de Picrosirius con luz polarizada demuestran la modificación de la disposición de las fibras de colágeno tras el entrecruzamiento con genipín. Barra de escala= 100µm.

Figura 6: Resultados del análisis histológico cuantitativo para T1M-CTR, T1M-D, T2M- CTR, T2M-D. Los gráficos muestran los resultados de la prueba de intensidad (**A, B**) de Azul Alcian y de intensidad de Picrosirius (**C, D**) en T1M y T2M en cada condición, tejido conectivo laxo vs denso.

Figura 7: Evaluación de la citocompatibilidad *ex vivo*. Se muestra el comportamiento de las células mesenquimales alogénicas de la grasa (ADMSC) cultivadas sobre las matrices generadas para (**A**) el análisis Live&Dead (L/D) y (**B**) el ensayo metabólico WST-1. Para el ensayo L/D se incluyeron controles técnicos en 2D, donde se aprecian las células vivas en color verde y las muertas en color rojo. Barra de escala = 500 µm. Para WST-1 se graficaron los valores medios con sus respectivas barras de error que corresponden a las desviaciones estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se determinaron con la prueba de Mann-Whitney como sigue: # = frente a CTR – 2D; * = frente a CTR + 2D; a = T1M-D vs T2M-D; b = frente su homólogo entrecruzado con genipín.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A continuación, se detallan brevemente las principales características histológicas, biomecánicas, bioquímicas y de biocompatibilidad de las distintas matrices de tejido conectivo generadas *in vivo* (en este caso en forma de bioconductor) mediante la encapsulación de material no reabsorbible por parte del animal de experimentación. Posteriormente se describen los procesos de descelularización y entrecruzamiento o crosslinking químico, en este caso con el agente natural genipín (GP).

Generación de las matrices

Para la generación de las matrices, se procede a la implantación de un conductor de silicona en el tejido subcutáneo en ratas Wistar. El procedimiento se realiza mediante anestesia general. Tras la implantación, los animales son mantenidos en laboratorio y transcurrido 1 y 2 meses, los animales son sacrificados para la recolección de muestras.

Descelularización tisular

Las matrices fueron descelularizadas mediante un método combinado que se detalla a continuación:

1. Lavado en agua destilada: 8 lavados de 5 min cada uno y un lavado de 7 horas, a temperatura ambiente con agitación.
- 5 2. Tratamiento con dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,1% durante 24 horas a temperatura ambiente, con agitación.
3. Lavado en agua destilada: 3 lavados de 30 min cada uno a 4°C.
4. Tratamiento con Tritón X-100 al 0,6% durante 24 horas, a temperatura ambiente, con agitación.
5. Lavado en agua destilada: 3 lavados de 30 min cada uno a 4°C.
- 10 6. Tratamiento con desoxicolato sódico (SDC) al 1% durante 24 horas a temperatura ambiente, con agitación.
7. Lavado en agua destilada: 3 lavados de 30 min cada uno a 4°C.
8. Digestión enzimática: 100mg/L DNasa + 20mg/L RNasa por 45 min, a 37°C.
9. Lavado en PBS 0.1M (pH 7.2-7.4) con 2% de un coctel de antibióticos y antimicóticos: al menos
15 5 lavados de 15 min cada uno a 4°C. El coctel de antibióticos (100x), de origen comercial, contiene: 10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina y 25 µg de anfotericina B por ml.

Análisis de la descelularización de los bioconductos

En primer lugar, se realizó un análisis de la descelularización de los bioconductos generados en
20 ambos tiempos (**Figura 2**). Para ello se realizó una evaluación del porcentaje de transparencia y un análisis de la cantidad de ADN de los bioconductos nativos al mes (T1M) y a los 2 meses (T2M).

Los bioconductos descelularizados son en general más blancos y transparentes que sus
respectivos bioconductos control (CTR) que conservan aún algún residuo sanguíneo en su
25 interior lo que genera un tono rosáceo del bioconductor.

Posteriormente, y con el fin de alcanzar los criterios establecidos por Crapo *et al.* [12] para el tejido descelularizado, <50ng de ADN de doble cadena (dsDNA) por mg de peso de MEC, se

cuantificó el ADN de los bioconductos antes y después del proceso de descelularización y se comprobó cómo el proceso de descelularización satisfactoriamente generó matrices correctamente descelularizadas con un contenido de ADN mucho menor que su respectivo control cumpliendo con los criterios establecidos en la literatura científica.

5 **Análisis biomecánicos**

Con el fin de mejorar las propiedades biomecánicas de los bioconductos generados, se realizaron procesos de entrecruzamiento químico con una solución acuosa de Genipin (GP) al 0.1% de acuerdo con protocolos establecidos [8,11]. En este sentido, las muestras fueron sumergidas en una solución estéril de GP durante 72 horas a 37°C.

- 10 GP es un agente entrecruzante capaz de inducir la formación de interacciones moleculares entre los componentes de la MEC, incrementando las propiedades biomecánicas de los mismos (DG) respecto a los tejidos descelularizados (D) y también respecto a los controles (CTR) (**Figura 3**).

Este proceso de entrecruzamiento generó matrices con diferencias significativas con respecto al tejido descelularizado no entrecruzado. Aumentó significativamente el módulo de Young (**Figura**
15 **3A**) y el esfuerzo de tracción a la rotura (**Figura 3C**) en los tiempos estudiados (T1M y T2M), lo que nos indica que la reticulación de la MEC aumentó la rigidez en nuestros bioconductos aumentando así su capacidad de resistencia ante las fuerzas externas o deformación por tracción (**Figura 3B**).

Cabe destacar que las matrices descelularizadas pero no tratadas con GP, si bien no ven
20 mejoradas sus características biomecánicas, mantienen valores muy similares a los tejidos control, no sometidos a ningún tratamiento, con lo que podemos concluir que el proceso de descelularización no afecta negativamente a ninguno de los parámetros medidos.

Análisis histológicos y ultraestructurales

Los análisis histológicos se centraron en la evaluación de la MEC generada a los 1 y 2 meses
25 tanto en el momento previo a su descelularización (T1M-CTR y T2M-CTR), como tras el proceso de descelularización (T1M-D y T2M-D), y tras el procedimiento de entrecruzamiento químico con genipín (T1M-DG y T2M-DG).

En primer lugar, la tinción con hematoxilina-eosina (HE) reveló que la matriz generada con forma
30 de bioconductor presenta una estructura homogénea tras 1 y 2 meses de implantación del material no reabsorbible (silicona) que se mantiene tras la descelularización y el tratamiento con

GP (**Figura 4Ay 4B**). Los bioconductos se componen de una parte interna densa, en contacto con los moldes de silicona implantados, y una capa externa de tejido conectivo menos densa en el resto del material. En general, se observa un tejido conectivo bien estructurado que presenta un estado de maduración y compactación mayor en el segundo mes, que tras la descelularización
5 carece de núcleos celulares.

Además, la tinción con DAPI, un marcador fluorescente que se une al ADN, reveló específicamente una gran cantidad de núcleos celulares, celularidad, dentro de la pared de los bioconductos (**Figura 3C**), que parecen en el segundo tiempo, y que en cualquier caso desaparecen en ambos tiempos tras la descelularización (T1M-D y T2M-D), lo que da muestra
10 de la efectividad del procedimiento de descelularización confirmando los resultados de HE.

La histología revela que ni el proceso de descelularización (observando los grupos descelularizados (D)) ni el proceso de entrecruzamiento químico con GP (DG) afectan al patrón y definición estructural de la matriz generada.

El análisis con microscopio electrónico de barrido (SEM) mostró claramente un aumento de la cantidad de tejido conectivo y de la densidad de los bioconductos generados si se comparan las
15 muestras crecidas 1 y 2 meses (CTR). El proceso de descelularización (D) y entrecruzamiento (DG) de los bioconductos no afectó a la estructura, composición y organización 3D de la matriz extracelular en cada periodo en comparación con el grupo control (**Figura 4D y 4E**).

Para determinar el impacto de la descelularización y del entrecruzamiento con genipín en la conservación de la matriz extracelular, realizamos tinciones con azul Alcian (**Figura 5A**), orceína (**Figura 5B**) y Picrosirius (**Figura 5C y 5D**). La tinción con azul Alcian reveló la presencia de proteoglicanos en el tejido denso de los bioconductos generados en las tres condiciones y dos periodos de tiempo. Curiosamente, no se observa ninguna fibra elástica con la tinción de Orceína en la pared de todas las matrices generadas. La tinción histoquímica de Picrosirius fue positiva
20 en las partes laxas y densas de la pared de todos los bioconductos, confirmando la presencia de abundantes fibras de colágeno. Además, la microscopía de luz polarizada mostró birrefringencia en la mayoría de los bioconductos generados, haciendo evidente el alto grado de organización de las fibras de colágeno (**Figura 5D**).

Posteriormente se realizó un estudio cuantitativo de los elementos principales de la matriz extracelular de los bioconductos antes (CTR) y después del proceso de descelularización (D)
30 (**Figura 6**). Estos resultados mostraron una ligera disminución de las fibras de colágeno y de los

proteoglicanos ácidos para los bioconductos descelularizados que no resultan en ningún caso significativos.

Biocompatibilidad de los biomateriales generados

Para comprobar los posibles efectos citotóxicos producidos en las matrices tras el proceso de descelularización y/o entrecruzamiento químico, las matrices generadas fueron sometidas a un análisis de biocompatibilidad. Para ello, células madre mesenquimales alogénicas de la grasa (ADMSC) fueron cultivadas sobre las matrices descelularizadas y las descelularizadas y entrecruzadas con GP. Tras 72 horas de cultivo, se determinó la interacción célula-biomaterial mediante los ensayos WST-1 (Laboratorios Roche, Suiza) y Live/Dead® Cell Viability Assay (L/D) (Thermo-Fisher Scientific, EE.UU.).

Brevemente, en el L/D las muestras con células y los controles se incubaron con la solución de trabajo compuesta por calceína/homodímero de etidio-1 durante 15 minutos a 37°C, mostrando las células viables y metabólicamente activas en color verde en todos los grupos de estudio, con una morfología similar control positivo en 2D (**Figura 7A**). Por otro lado, las distintas matrices no presentaron células muertas, que se muestran en color rojo en el control negativo en 2D, ya que tras ser tratadas con Tritón X-100 permitieron que el agente intercalante etidio entrara al núcleo. Por otro lado, la actividad metabólica de las ADSC sembradas en las diferentes matrices generadas se midió cuantitativamente con el ensayo de la sal de tetrazolio soluble en agua (WST-1) (**Figura 7.B**). Tras ser incubadas con el reactivo de la solución de trabajo durante 4 h a 37°C, todos los grupos experimentales presentaron signos claros de actividad metabólica, siendo mayor en el grupo de T1M. El tratamiento con GP resultó en una disminución de los valores metabólicos, pero no acompañado de muerte celular (L/D), lo que sugiere que un número menor de células han interactuado con la matriz generada.

Referencias:

1. Penna V, Munder B, Stark GB, Lang EM. An in vivo engineered nerve conduit--fabrication and experimental study in rats. *Microsurgery*. 2011;31(5):395-400.
2. Qiu X, Lee BL, Wong SY, Ding X, Xu K, Zhao W, et al. Cellular remodeling of fibrotic conduit as vascular graft. *Biomaterials*. 2021;268:120565.
3. Yamanami M, Kanda K, Kawasaki T, Kami D, Watanabe T, Gojo S, et al. Development of xenogeneic decellularized biotubes for off-the-shelf applications. *Artif Organs*. 2019;43(8):773-9.

4. Philips C, Campos F, Roosens A, Sanchez-Quevedo MDC, Declercq H, Carriel V. Qualitative and Quantitative Evaluation of a Novel Detergent-Based Method for Decellularization of Peripheral Nerves. *Annals of biomedical engineering*. 2018;46(11):1921-37.
5. Chato-Astrain J, Philips C, Campos F, Durand-Herrera D, Garcia-Garcia OD, Roosens A, et al. Detergent based decellularized peripheral nerve allografts: An in vivo preclinical study in the rat sciatic nerve injury model. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2020;14(6):789-806.
6. Carriel V, Vizcaino-Lopez G, Chato-Astrain J, Durand-Herrera D, Alaminos M, Campos A, et al. Scleral surgical repair through the use of nanostructured fibrin/agarose-based films in rabbits. *Experimental eye research*. 2019;186:107717.
7. Carriel V, Scionti G, Campos F, Roda O, Castro B, Cornelissen M, et al. In vitro characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2015.
8. Campos F, Bonhome-Espinosa AB, Vizcaino G, Rodriguez IA, Duran-Herrera D, Lopez-Lopez MT, et al. Generation of genipin cross-linked fibrin-agarose hydrogel tissue-like models for tissue engineering applications. *Biomed Mater*. 2018;13(2):025021.
9. Arora B, Tandon R, Attri P, Bhatia R. Chemical Crosslinking: Role in Protein and Peptide Science. *Curr Protein Pept Sci*. 2017;18(9):946-55.
10. Courtman DW, Errett BF, Wilson GJ. The role of crosslinking in modification of the immune response elicited against xenogenic vascular acellular matrices. *J Biomed Mater Res*. 2001;55(4):576-86.
11. Garcia-Garcia OD, El Soury M, Gonzalez-Quevedo D, Sanchez-Porras D, Chato-Astrain J, Campos F, et al. Histological, Biomechanical, and Biological Properties of Genipin-Crosslinked Decellularized Peripheral Nerves. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(2).
12. Crapo, P.M.; Gilbert, T.W.; Badylak, S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* **2011**, *32*, 3233-3243, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención *ex vivo* de una matriz extracelular acelular a partir de un tejido conectivo previamente aislado de un animal mamífero no humano adecuado para su uso como xenoinjertos, caracterizado por que comprende un proceso de descelularización del tejido biológico que comprende las siguientes etapas:
 - a) provocar la lisis celular con agua destilada,
 - b) aplicar un detergente tensoactivo aniónico, y posteriormente lavar con agua destilada,
 - c) aplicar un detergente tensoactivo no aniónico, y posteriormente lavar con agua destilada,
 - d) aplicar un detergente aniónico, idéntico o distinto al del paso c), y posteriormente lavar con agua destilada, y
 - e) aplicar RNasa y DNasa, y posteriormente lavar con una solución que comprende tampón fosfato salino.
2. El procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado por que el detergente tensoactivo aniónico del paso b) es dodecilsulfato sódico.
3. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que el detergente tensoactivo no aniónico del paso c) es Tritón X-100.
4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que el detergente aniónico del paso d) es desoxicolato sódico.
5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que el lavado con agua destilada de los pasos b) a d) y el lavado con tampón fosfato salino del paso f) se realiza en frío, la aplicación de RNasa y DNasa del paso e) se realiza a 37°C, y el resto del procedimiento se realiza a temperatura ambiente.
6. El procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado por que el lavado con agua destilada de los pasos b) a d) y el lavado con la solución que comprende tampón fosfato salino del paso e) se realizan a 4°C de temperatura.
7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que el paso a) y la aplicación de detergentes de los pasos b), c) y d) se realizan en agitación.

8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que en el paso e) la solución de lavado que comprende tampón fosfato salino además comprende antibióticos y/o antimicóticos.

5 9. El procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado por que en el paso a) la lisis celular se provoca con un lavado en agua destilada de 7 horas, a temperatura ambiente con agitación, en el paso b) el tratamiento con dodecilsulfato sódico es al 0,1% durante 24 horas a temperatura ambiente, con agitación y el posterior lavado con agua destilada consiste en 3 lavados de 30 min cada uno a 4°C, en el paso c) el tratamiento con Tritón X-100 es al 0,6%
10 durante 24 horas, a temperatura ambiente, con agitación, y el posterior lavado con agua destilada consiste en 3 lavados de 30 min cada uno a 4°C, en el paso d) el tratamiento con desoxicolato sódico es al 1% durante 24 horas a temperatura ambiente, con agitación y el posterior lavado con agua destilada consiste en 3 lavados de 30 min cada uno a 4°C, en el paso e) la digestión enzimática se lleva a cabo con 100mg/l DNasa + 20mg/l RNasa por 45 min, a 37°C, y posterior
15 el lavado con tampón fosfato salino 0.1M (pH 7.2-7.4) con 2% antibióticos y antimicóticos consiste en 5 lavados de 15 min cada uno a 4°C.

10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que comprende un paso adicional f) de entrecruzamiento químico y posterior lavado.

20 11. El procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado por que el agente entrecruzante químico utilizado es genipín.

12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por
25 que el tejido biológico aislado de partida ha sido sometido antes de su descelularización a criopreservación.

13. El procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado por que de forma previa al procedimiento de descelularización se realiza el lavado de tejido biológico con agua destilada.

30 14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que la matriz extracelular acelular obtenida tras el paso e) o f) es funcionalizada mediante la adición de tipos celulares y/o factores de crecimiento y/o biomoléculas esenciales para inducir la regeneración tisular y función celular.

35

15. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que el tejido biológico aislado de un animal mamífero no humano de partida es el crecido alrededor de un molde compuesto de biomateriales no reabsorbibles.

5 16. Matriz extracelular acelular obtenible por el procedimiento de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

17. La matriz extracelular acelular según la reivindicación anterior caracterizada por tener estructura tubular, sacular, plana o mallada.

10

18. Uso de la matriz extracelular acelular según cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17 en ingeniería tisular.

15 19. El uso según la reivindicación anterior caracterizado por que comprende la reparación y/o la sustitución del material nativo dañado.

20. El uso según la reivindicación anterior caracterizado por que los tejidos a reparar y/o sustituir son nervios periféricos, vasos sanguíneos, uretra, vejiga, tendones, túnica ocular, pared abdominal, mucosas o superficies epiteliales.

20

FIGURAS



FIG. 1

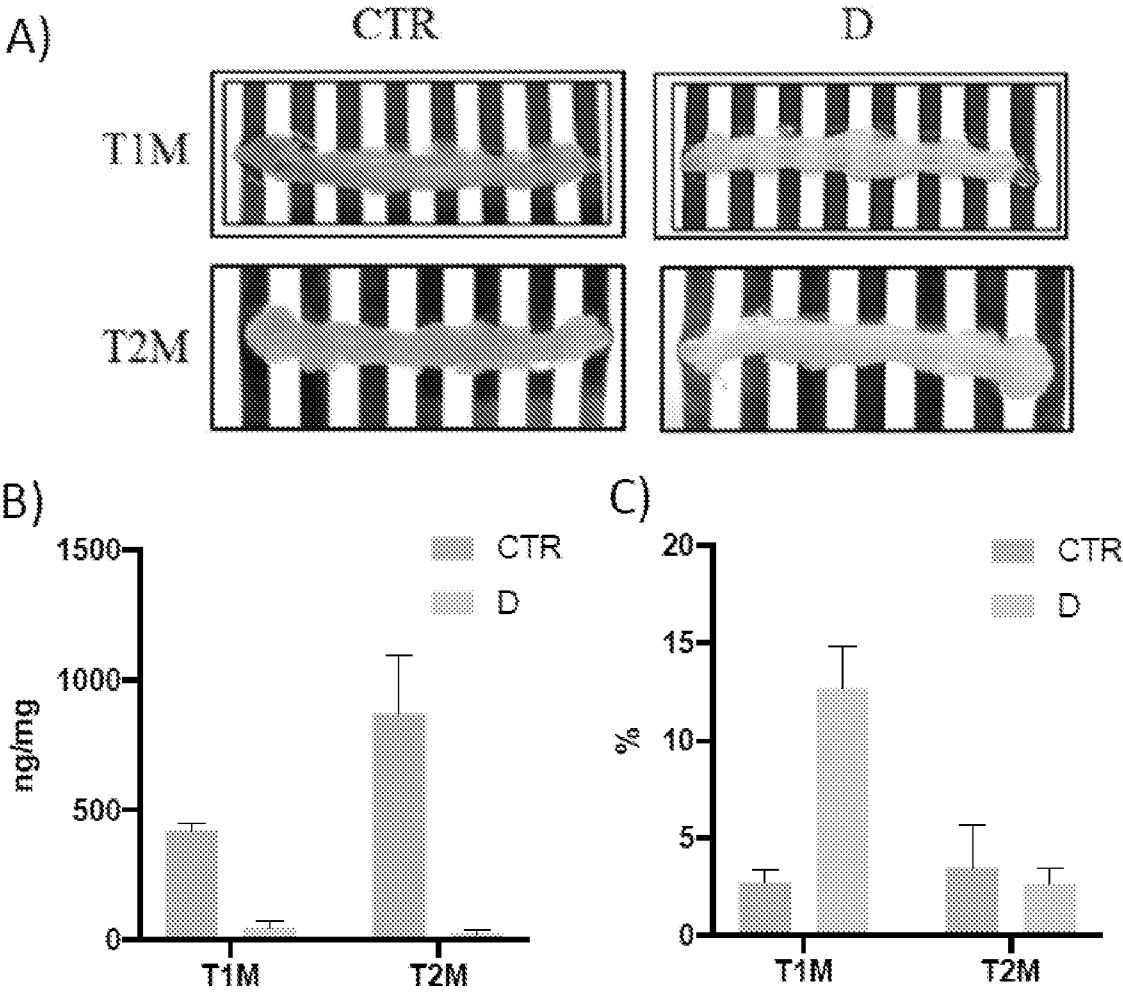
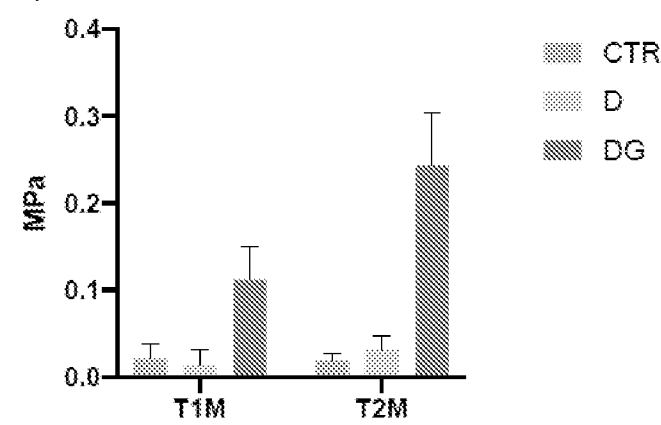
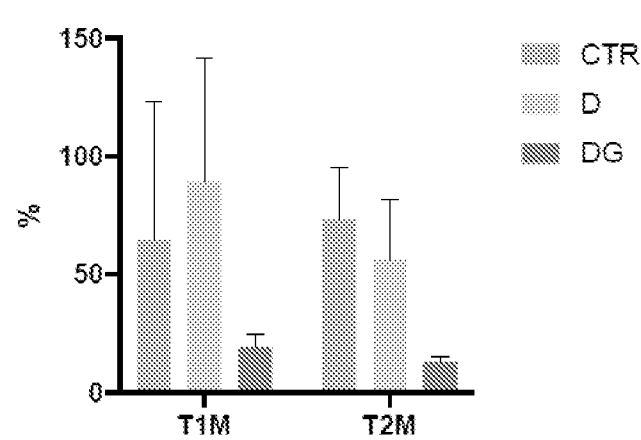


FIG. 2

A) Módulo de Young (MPa)



B) Deformación por tracción



C) Esfuerzo de tracción a Rotura

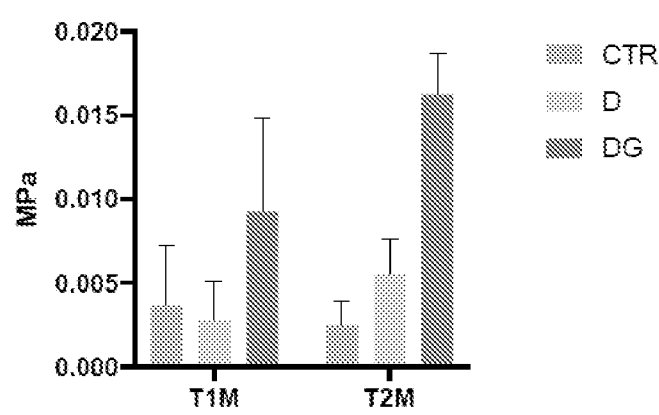


FIG. 3

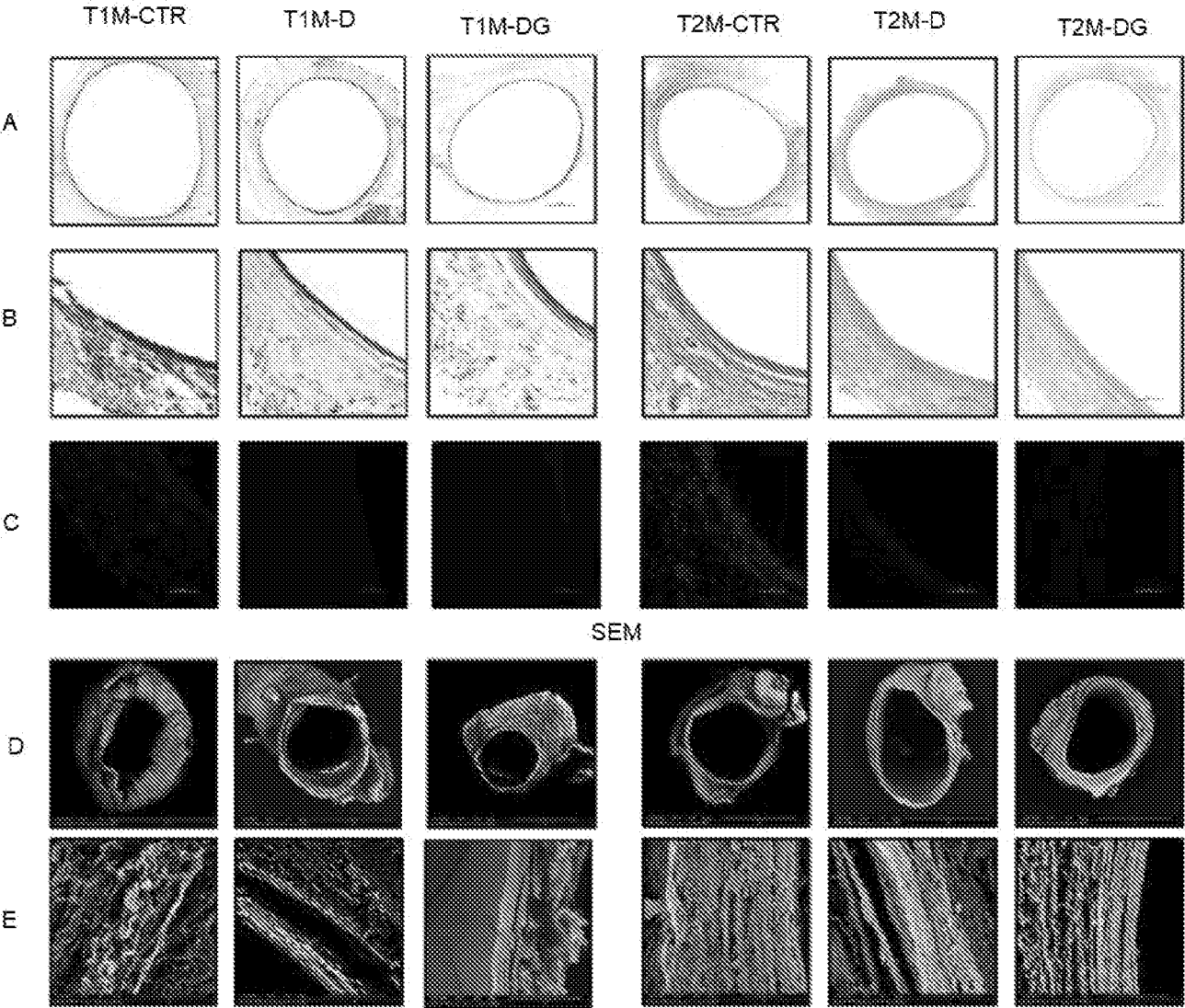


FIG. 4

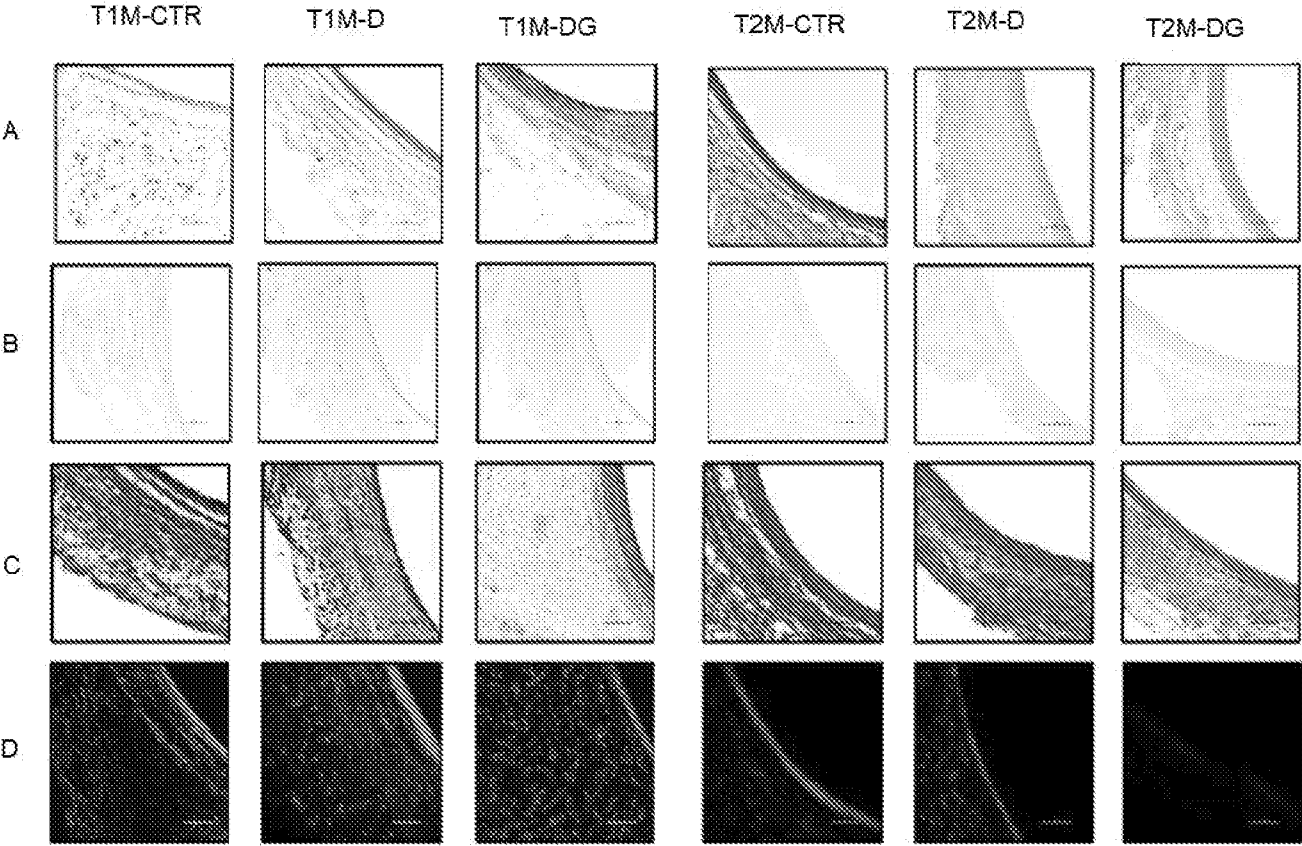


FIG. 5

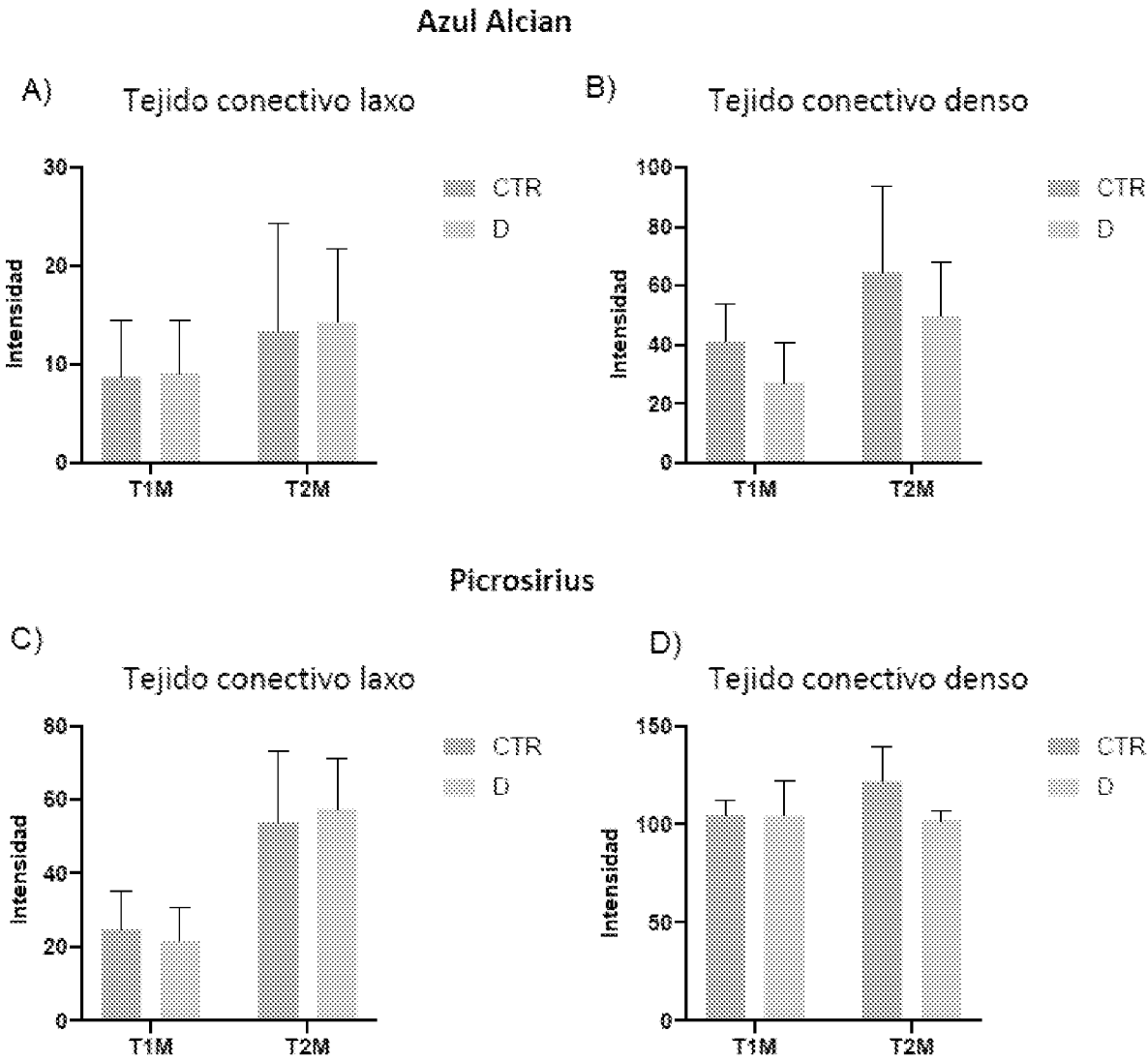


FIG. 6

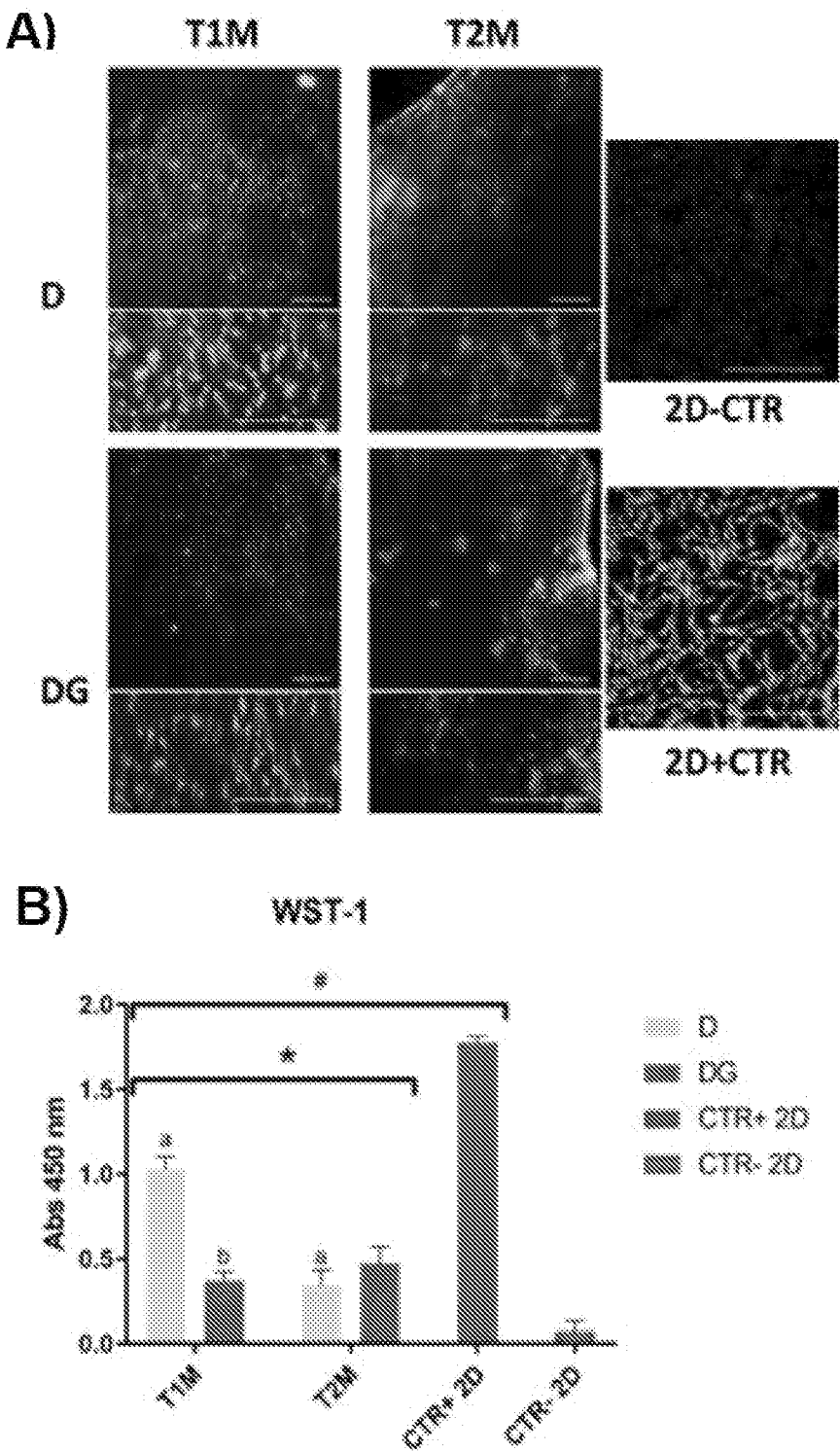


FIG. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2024/070365

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L27/36 (2006.01)

A61L27/50 (2006.01)

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, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INTERNET.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ORTIZ-ARRABAL, O. <i>et al.</i> Generation and evaluation of novel biomaterials based on decellularized sturgeon cartilage for use in tissue engineering. Biomedicines. Jul 2021, Vol. 9, N° 7, article n°.775, ISSN 2227-9059 (electronic), <DOI: 10.3390/biomedicines9070775> page 4, first, second, third paragraphs; page 11, second paragraph; page 12 first paragraph; page 13, third paragraph.	1-9, 12-14, 16-20
Y		10, 11, 15
X	ES 2905713 A1 (UNIV GRANADA <i>et al.</i>) 11/04/2022, page 8, lines 11-24; page 16, line 18; page 17, line 2.	1-9, 12-14, 16-20
Y		10, 11, 15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"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
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05/11/2024

Date of mailing of the international search report
(07/11/2024)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
S. González Peñalba

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 913493025

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2024/070365

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WANG, Z. <i>et al.</i> Regeneration of skeletal system with genipin crosslinked biomaterials. Journal of Tissue Engineering. November 2020, Vol. 11, article n° 204173142097486, ISSN 2041-7314 (electronic), <DOI: 10.1177/2041731420974861>. the whole document.	10, 11
Y	QIU, X.. <i>et al.</i> Cellular remodeling of fibrotic conduit as vascular graft. Biomaterials. January 2021, Vol. 268, article n° 120565. ISSN 0142-9612, <DOI:10.1016/j.biomaterials.2020.120565>. page 2, left column, second paragraph.	15
A	KEANE, T. J. <i>et al.</i> Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and <i>in vivo</i> relevance. Methods. August 2015, Vol. 84, pages 25 - 34, ISSN 1046-2023, <DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.03.005> Tables 2 and 4.	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2024/070365

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 18-20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 18-20 relate to a subject matter that is considered by this Authority to be affected by PCT Rule 67.1(iv), concerning a method for treatment of the human or animal body by therapy. Nevertheless, a search in respect of these claims has been carried out on the basis of the alleged effects of the extracellular matrix.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2024/070365

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES2905713 A1	11.04.2022	WO2022074281 A1	14.04.2022

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2024/070365

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61L27/36 (2006.01)
A61L27/50 (2006.01)

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, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INTERNET.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	ORTIZ-ARRABAL, O. <i>et al.</i> Generation and evaluation of novel biomaterials based on decellularized sturgeon cartilage for use in tissue engineering. Biomedicines. Julio 2021, Vol. 9, Nº 7, artículo nº.775, ISSN 2227-9059 (electronic), <DOI: 10.3390/biomedicines9070775> página 4, primer, segundo y tercer párrafo; página 11, segundo párrafo; página 12 primer párrafo; página 13, tercer párrafo.	1-9, 12-14, 16-20
Y		10, 11, 15
X	ES 2905713 A1 (UNIV GRANADA <i>et al.</i>) 11/04/2022, página 8, líneas 11-24; página 16, línea 18; página 17, línea 2.	1-9, 12-14, 16-20
Y		10, 11, 15

☒ 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:	"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.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"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.
"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).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"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.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 05/11/2024	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional. 07 de noviembre de 2024 (07/11/2024)
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 S. González Peñalba Nº de teléfono 913493025

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2024/070365

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	WANG, Z. <i>et al.</i> Regeneration of skeletal system with genipin crosslinked biomaterials. Journal of Tissue Engineering. Noviembre 2020, Vol. 11, artículo nº 204173142097486, ISSN 2041-7314 (electronic), <DOI: 10.1177/2041731420974861> Todo el documento.	10, 11
Y	QIU, X. <i>et al.</i> Cellular remodeling of fibrotic conduit as vascular graft. Biomaterials. Enero 2021, Vol. 268, artículo nº 120565. ISSN 0142-9612, <DOI:10.1016/j.biomaterials.2020.120565>. página 2, columna izquierda, segundo párrafo.	15
A	KEANE, T. J. <i>et al.</i> Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and <i>in vivo</i> relevance. Methods. Agosto 2015, Vol. 84, páginas 25 - 34, ISSN 1046-2023, <DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.03.005> Tablas 2 y 4.	1-20

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2024/070365

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2). a) por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones n°s: 18-20

se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

Las reivindicaciones 18-20 se refieren a una materia que esta Administración considera que están afectadas por las disposiciones de la Regla 67. 1 (iv) PCT, relativas a un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal. A pesar de ello, se ha efectuado una búsqueda para estas reivindicaciones basada en los efectos atribuidos a la matriz. extracelular.

2. ☐ Las reivindicaciones n°s:

se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

3. ☐ Las reivindicaciones n°s:

son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.

3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:

4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2024/070365

Información relativa a los miembros de familia de patentes			
Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
ES2905713 A1	11.04.2022	WO2022074281 A1	14.04.2022