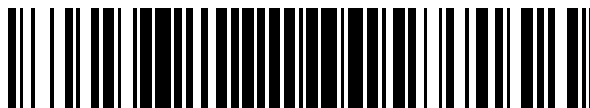


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 353 990**

21 Número de solicitud: 200930625

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61K 35/12 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **25.08.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **09.03.2011**

Fecha de la concesión: **16.01.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **26.01.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
26.01.2012

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
CUESTA DEL HOSPICIO, S/N
18071 GRANADA, ES y
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD**

72 Inventor/es:

**GARZON BELLO, INGRID JOHANNA;
MUÑOZ CAMPOS, ANTONIO;
GONZALEZ ANDRADES, MIGUEL;
ALAMINOS MINGORANCE, MIGUEL y
MUÑOZ AVILA, JOSE IGNACIO**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **ELABORACION DE TEJIDOS ARTIFICIALES MEDIANTE INGENIERIA TISULAR UTILIZANDO BIOMATERIALES DE FIBRINA Y AGAROSA.**

57 Resumen:

Elaboración de tejidos artificiales mediante ingeniería tisular utilizando biomateriales de fibrina y agarosa.

La presente invención proporciona un método in vitro de preparación de un tejido artificial, el tejido artificial obtenible por dicho método, la composición farmacéutica que lo comprende y el uso de este tejido o de esta composición para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano dañado, preferiblemente piel, vejiga, uretra, córnea, mucosa oral, conjuntiva, pared abdominal, tímpano, faringe, laringe, intestino, peritoneo, ligamento, tendón, hueso, meninge o vagina. El método de la invención comprende los pasos de añadir fibrinógeno a células aisladas, preferiblemente, a fibroblastos o queratocitos, añadir un agente antifibrinolítico a la mezcla, añadir además un factor de coagulación, una fuente de calcio y trombina, añadir un polisacárido, preferiblemente agarosa, cultivar células, preferiblemente células epiteliales o células madre del cordón umbilical, en o sobre el producto resultante e inducir la nanoestructuración de dicho producto.

ES 2 353 990 B1

DESCRIPCIÓN

Elaboración de tejidos artificiales mediante ingeniería tisular utilizando biomateriales de fibrina y agarosa.

La presente invención se encuadra en el campo de la biomedicina y, más específicamente, de la ingeniería tisular. Específicamente, se refiere a un método *in vitro* de preparación de un tejido artificial, al tejido artificial obtenible por dicho método y al uso de este tejido artificial para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano dañado.

Estado de la técnica anterior

La ingeniería tisular constituye un conjunto de técnicas y disciplinas que permite diseñar y generar en laboratorio tejidos artificiales a partir de células madre procedentes de muestras tisulares obtenidas de biopsias y, por tanto, supone un enorme avance en el trasplante de órganos y en la medicina regenerativa. La ingeniería tisular es una de las áreas de la biotecnología que más se ha desarrollado en los últimos años, debido a su utilidad potencial para la fabricación *in vitro* de tejidos y órganos para su implante en pacientes necesitados de estos tejidos. No obstante, los tejidos artificiales descritos hasta la fecha presentan numerosos problemas y complicaciones; algunos de los cuales se exponen a continuación, empleando como ejemplo, los tejidos artificiales de piel, córnea, vejiga y uretra.

La vejiga urinaria es el órgano encargado de la recepción y el almacenamiento de la orina. Situada en el suelo pélvico, la vejiga urinaria se caracteriza por su capacidad y su distensibilidad, lo cual permite a ésta almacenar y retener la orina. La continencia es resultado de la contracción del esfínter urinario, que cierra la uretra y el cuello vesical evitando la salida de orina, así como de la relajación y distensión de la vejiga para almacenar la orina que se va acumulando en ella. Numerosas patologías congénitas o adquiridas pueden afectar a la integridad de la vejiga, alterando la función continente de ésta. Por un lado, las malformaciones de la vejiga suelen asociarse a defectos graves de la pared vesical que requieren reparación quirúrgica urgente. Por otro lado, los traumatismos pélvicos, el cáncer vesical y las lesiones traumáticas de la médula espinal constituyen patologías de gran frecuencia que requieren el uso de tejidos extravesicales para reparar la vejiga dañada. En este contexto, actualmente se llevan a cabo ampliaciones vesicales utilizando intestino (enterocistoplastia), estómago (gastrocistoplastia) o urotelio (ureterocistoplastia), siendo muy frecuentes las complicaciones asociadas a estas técnicas.

Hasta el momento, se han descrito muy pocos modelos de sustitutos de la vejiga urinaria que presenten utilidad clínica. Recientemente (Atala *et al.* Lancet. 2006 Apr 15; 367(9518):1241-6), investigadores del Children's Hospital de Boston lograron implantar un sustituto de vejiga artificial generado a partir de colágeno y ácido poliglicólico en siete pacientes con daño vesical grave. Sin embargo, los modelos de vejiga artificial disponibles para el tratamiento de los pacientes necesitados de ello, son muy escasos y presentan multitud de inconvenientes, incluyendo la mala calidad y la escasa manipulabilidad de los tejidos generados. Además, el colágeno es un producto que tiende a la contracción y a la pérdida de volumen cuando se usa en ingeniería tisular, siendo escasa su consistencia y, por tanto, su manipulabilidad quirúrgica.

La uretra es el conducto por el que se elimina hacia el exterior la orina almacenada en la vejiga urinaria. Además de su función excretora en ambos sexos, la uretra cumple una función reproductiva en el hombre, a permitir el paso del contenido seminal desde las vesículas seminales durante la eyaculación. Son múltiples las afecciones congénitas (hipospadias y epispadias principalmente) o adquiridas (traumatismos, estenosis, etc.) que afectan a su integridad funcional y que precisan que sea sustituida en mayor o menor extensión, para conseguir restablecer su función normal (Baird *et al.* J Urol. 2005; 174:1421-4; Persichetti *et al.* Plast Reconstr Surg. 2006; 117:708-10).

Tradicionalmente, la reparación de tejidos lesionados se ha venido haciendo con elementos protésicos artificiales o tejidos tomados de una parte del propio paciente (autoinjerto o autotransplante) o de otro individuo (transplante heterólogo). Actualmente, para la corrección de la mayor parte de las patologías uretrales, se recurre a colgajos autólogos de tejidos adyacentes o a injertos libres, principalmente de mucosa oral o vesical. Sin embargo, la obtención de colgajos locales no siempre es factible, y la extracción de mucosa oral o vesical no está exenta de complicaciones y efectos secundarios tanto en la zona donante como en la zona receptora (Corvin *et al.* Urology. 2004; 43(10):1213-6; Schultheiss *et al.* World J Urol. 2000; 18:84-90). Por otro lado, la utilización de tejidos heterólogos ha arrojado resultados bastante pobres en la sustitución de uretra, siendo muy frecuente la aparición de rechazos inmunológicos del tejido trasplantado.

Hasta la fecha, se han descrito muy pocos modelos de sustitutos de uretra con probable utilidad clínica, siendo muy escasos los casos descritos en la literatura en los que un sustituto uretral ha sido implantado en pacientes. La mayoría de los modelos descritos hasta la fecha se basan en biomateriales de colágeno (De Filippo *et al.* J Urol. 2002 Oct; 168 (4 Pt 2):1789-92; El-Kassaby *et al.* J Urol. 2003 Jan; 169(1):170-3; discussion 173) o en piel del propio paciente (Lin *et al.* Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2005 Apr 20; 85(15):1057-9). Sin embargo, todos estos modelos presentan numerosos problemas y complicaciones, y aún no se ha desarrollado ningún sustituto uretral exento de estos problemas. Por un lado, el colágeno es un producto que tiende a la contracción y a la pérdida de volumen cuando se usa en ingeniería tisular, siendo escasa su consistencia y, por tanto, su manipulabilidad quirúrgica. Por otro, el uso de piel autóloga aún no ha demostrado suficientemente su capacidad para adaptarse a las condiciones de la uretra, siendo muy difícil recellularizar fragmentos de dermis descelularizados.

La córnea es una estructura transparente y carente de vasos, a través de la cual la luz penetra en el ojo, constituyendo la principal barrera del globo ocular con el medio exterior. Por ese motivo, la integridad y el correcto funcionamiento de la misma son imprescindibles para una correcta función visual. La patología congénita o adquirida de la córnea constituye uno de los problemas más frecuentes en oftalmología, siendo numerosas las causas que provocan una alteración grave de la fisiología y la estructura corneal. En estos casos, suele ser necesario recurrir a tratamientos agresivos y no exentos de complicaciones, como son los implantes de membrana amniótica, los diferentes tipos de queratoprótesis e incluso el trasplante heterólogo de córnea (queratoplastia). Sin embargo, el trasplante corneal es una técnica altamente dependiente de la disponibilidad de córneas procedentes de donantes cadáveres, lo cual hace que un gran número de personas permanezcan en lista de espera para trasplante durante periodos de tiempo muy elevados. Por otro lado, es bien sabido que el trasplante de órganos procedentes de donante está sujeto a la posibilidad de rechazo inmunológico cuando estos órganos son implantados, obligando al paciente a someterse a terapia inmunosupresora durante toda su vida. Finalmente, el trasplante de cualquier tipo de órgano o tejido, incluida la córnea, es una técnica sujeta a la posibilidad de transmisión de todo tipo de enfermedades infecciosas desde el donante hasta el receptor, incluyendo VIH, hepatitis, herpes, enfermedades bacterianas y fúngicas, etc. Todos estos problemas y complicaciones derivadas del implante corneal, hacen necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas al trasplante heterólogo.

La fabricación en laboratorio de un sustituto corneal (constructo corneal o córnea artificial) es una de las áreas que está experimentando mayor auge dentro de la ingeniería tisular, siendo numerosos los laboratorios que actualmente están intentando sin demasiado éxito conseguir un sustituto corneal de calidad que pueda ser utilizado en la clínica humana o para la evaluación de productos farmacológicos y químicos (Griffith *et al.* Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science*. 1999; 286(5447):2169-72; Orwin *et al.* *Tissue Eng.* 2000; 6(4):307-19; Reichl *et al.* *Int J Pharm.* 2003; 250:191-201). En tal sentido, se han desarrollado córneas artificiales de origen animal y humano. En ambos casos, los modelos desarrollados han utilizado biomateriales diversos como el colágeno tipo I, fibroína procedente de la seda (Higa y Shimazaki. *Cornea*. 2008 Sep; 27 Suppl 1:S41-7), quitosán (Gao *et al.* *J Mater Sci Mater Med.* 2008 Dec; 19(12):3611-9), ácido poliglicólico (Hu *et al.* *Tissue Eng.* 2005 Nov-Dec; 11 (11-12):1710-7) y fibrina con agarosa (Alaminos *et al.* *Invest Ophthalmol Vis Sci (IOVS)*. 2006; 47: 3311-3317; González-Andrades *et al.* *J Tissue Eng Regen Med.* 2009 May 5). De todos estos biomateriales, los mejores resultados obtenidos hasta ahora son los que tienen por base la fibrina y la agarosa. Las córneas de colágeno tipo I presentan tendencia a la pérdida de volumen y a la retracción de las mismas, con el inconveniente añadido del origen animal del colágeno utilizado. La fibroína y el quitosán son productos generados a partir de animales invertebrados, lo cual genera problemas significativos en relación con la biocompatibilidad. Las córneas de fibrina y agarosa desarrolladas, por el contrario, tienen la ventaja de que contienen fibrina procedente de la sangre del mismo paciente, mientras que la agarosa constituye un producto inerte desde el punto de vista inmunológico.

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano, y juega un papel fundamental en el mantenimiento del equilibrio interno, formando la principal barrera protectora del organismo frente a cualquier tipo de agresión externa. Existen numerosas patologías que afectan a la piel, destacando por su frecuencia las heridas, las úlceras por presión y las quemaduras. Los tratamientos actuales, basados en el uso de colgajos o injertos de piel o incluso en el implante de piel procedente de donante, están asociados a numerosos problemas.

La necesidad de solucionar estos problemas hace necesaria la búsqueda de alternativas basadas en la generación de productos de piel artificial humana generados mediante ingeniería tisular (Horch *et al.* *Burns*. 2005 Aug; 31 (5):597-602). En concreto, hasta el momento se han diseñado distintos tipos de piel artificial, incluyendo coberturas cutáneas sintéticas y biológicas, aunque ninguno de ellos ha logrado reproducir fielmente la estructura y las funciones de la piel humana nativa. Por un lado, las coberturas dérmicas sintéticas consisten en biomateriales no reabsorbibles y exentos de células vivas que se pueden utilizar como cubiertas temporales o como agentes inductores de la reparación tisular guiada. Estos tejidos artificiales e inertes poseen muy poca actividad biológica, por lo que no pueden ser empleados en lesiones profundas o extensas. Por otro lado, las coberturas biológicas consisten en la utilización de piel humana artificial en la que existen células vivas y matrices extracelulares que tratan de reproducir la estructura de la piel humana normal. Hasta el momento, la piel humana artificial que mejores resultados está ofreciendo es la piel artificial generada mediante ingeniería tisular a partir de células madre de la piel utilizando fibrina procedente del plasma humano como biomaterial (Meana *et al.* *Burns* 1998; 24: 621-630; Del Rio *et al.* *Hum Gene Ther.* 2002 May 20; 13(8):959-68; Llames *et al.* *Transplantation*. 2004 Feb 15; 77(3):350-5; Llames *et al.* *Cell Tissue Bank* 2006; 7: 4753.). Aunque estas técnicas supusieron un gran avance, su utilización clínica es limitada debido al hecho, fundamentalmente, de su escasa consistencia, su difícil manipulación y su enorme fragilidad. Uno de los sustitutos de tejido más consistentes es aquel que combina el uso de fibrina con la agarosa. Hasta el momento, la agarosa ha sido utilizada para la generación de sustitutos del cartílago (Miyata *et al.* *J Biomech Eng.* 2008 Oct; 130(5):051016), la córnea (Alaminos *et al.* *Invest Ophthalmol Vis Sci (IOVS)*. 2006; 47: 3311-3317) y la mucosa oral humana (Alaminos *et al.* *J Tissue Eng Regen Med.* 2007 Sep-Oct; 1(5):350-9; Sánchez-Quevedo *et al.* *Histol Histopathol.* 2007 Jun; 22 (6):631-40), pero no existe experiencia previa en el uso de este biomaterial para la fabricación de piel artificial.

La ingeniería tisular es una de las áreas que está experimentando mayor auge dentro de la biotecnología. Sin embargo, las desventajas de los tejidos artificiales hasta ahora existentes hacen necesario el desarrollo de nuevas técnicas que permitan la obtención de tejidos artificiales que puedan ser utilizados en la clínica humana o para la evaluación de productos farmacológicos y químicos, superando las limitaciones hasta ahora detectadas.

Explicación de la invención

La ingeniería tisular es una de las áreas de la biotecnología que más se ha desarrollado en los últimos años, debido a su utilidad para la fabricación *in vitro* de tejidos y órganos para su implante en pacientes necesitados de estos tejidos. Sin embargo, las limitaciones de los tejidos artificiales hasta ahora existentes hacen necesario el desarrollo de nuevas técnicas que permitan la obtención de tejidos artificiales que puedan ser utilizados en la clínica humana o para la evaluación de productos farmacológicos y químicos.

La presente invención proporciona un método *in vitro* de preparación de un tejido artificial, al tejido artificial obtenible por dicho método y al uso de este tejido artificial para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano dañado.

Un primer aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* de preparación de un tejido artificial (de aquí en adelante, método de la invención) que comprende:

- a) añadir una composición que comprende fibrinógeno a células aisladas,
- b) añadir un agente antifibrinolítico 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 al producto resultante del paso (c),
- e) cultivar células aisladas en o sobre el producto resultante del paso (d), y
- f) inducir la nanoestructuración del producto resultante del paso (e).

En el paso (a) del método de la invención se añade una composición que comprende fibrinógeno a células aisladas, preferiblemente, de un mamífero. 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, procesamiento 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. Algunos de estos procedimientos se describen en detalle en los Ejemplos de esta memoria.

Las células del paso (a) 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.

En una realización preferida del método de la invención, las células del paso (a) 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 del paso (a) 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 una vejiga sustituto de vejiga o una vejiga artificial, los fibroblastos proceden, preferiblemente, de vejiga; o cuando se emplea para preparar un tejido sustituto de uretra o una uretra artificial los fibroblastos proceden, preferiblemente, de uretra. 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.

En otra realización preferida del método de la invención, las células del paso (a) 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 trasplante de dicho tejido pueda realizarse sin que sea necesaria la inmunosupresión del sujeto transplantado. Sin embargo, los componentes del tejido artificial también pueden 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 trasplante 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.

Mediante la adición a las células del paso (a) de los diferentes componentes descritos en los pasos (a)-(d) del método de la invención, y tras dejar reposar el producto resultante del paso (d) en un soporte, se produce la formación

de una matriz que comprende fibrina y el polisacárido, en la que quedan embebidas 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.

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.

La composición que comprende fibrinógeno del paso (a) puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, plasma sanguíneo. La composición del paso (a) 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 del paso (a) puede contener otros factores de coagulación.

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

En una realización preferida, el fibrinógeno de la composición del paso (a) o la composición que comprende fibrinógeno del paso (a) es de origen autólogo. No obstante, el fibrinógeno de la composición del paso (a) o la composición que comprende fibrinógeno del paso (a) también puede ser de origen alogénico o xenogénico.

En una realización preferida de este primer aspecto de la invención, la composición que contiene fibrinógeno del paso (a) es plasma sanguíneo. En este caso, la polimerización del fibrinógeno puede inducirse mediante la adición en el paso (c) de una fuente de calcio.

En una realización más preferida de este primer aspecto de la invención, la fuente de calcio del paso (c) es una sal de calcio como, por ejemplo, pero sin limitarse, cloruro cálcico, gluconato cálcico o una combinación de ambas. 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 del paso (d) es de entre 0,5 y 3 g/L. No obstante, una concentración menor o mayor también podría emplearse.

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.

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.

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 (d) es de entre 1 y 2 g/L. No obstante, una concentración menor o mayor también podría emplearse.

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, en el paso (d) del método de la invención 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 en el paso (d) del método de la presente invención son pero, sin limitarse, agar-agar, agarosa, alginato, quitosano o carragenatos, o cualquier combinación de los anteriores.

La agarosa es un polisacárido formado por galactosas alfa y beta que se extrae de algas de géneros como *Gellidium* o *Gracillaria*. La agarosa, frente a otros polisacáridos que pueden ser empleados en el paso (d) 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 del paso (d) del método 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 del paso (d) del método de la invención 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 en el paso (d) del método de la invención es de tipo VII. En una realización aún más preferida, la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, en el producto resultante del paso (d) está a una concentración, ventajosamente, de entre 0,2 y 6 g/L, preferiblemente, de entre 0,3 y 3 g/L, y más preferiblemente, de entre 0,5 y 2 g/L. No obstante, una concentración menor o mayor también podría emplearse.

En una realización preferida, el método de la invención además de los pasos (a)-(f) descritos comprende un paso adicional entre el paso (b) y el paso (c) en el que se añade una proteína. Ejemplos de proteínas que pueden emplearse en el paso (d) del método de la presente invención son pero, sin limitarse, fibronectina, laminina, colágeno tipo VII o entactina, o cualquier combinación de los anteriores.

La fibronectina es una glicoproteína presente en la matriz extracelular (MEC) de la mayoría de los tejidos celulares animales desempeñando un importante papel en la adhesión de las células a la matriz. En una realización más preferida, la proteína añadida entre el paso (b) y el paso (c) del método de la invención es fibronectina. El objeto de esta adición es la de favorecer la adhesión de las células del paso (e) al producto resultante del paso (d). Por ejemplo, cuando el método de la invención se emplea para preparar un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial, la adición de fibronectina minimiza el desprendimiento de las células del epitelio corneal añadidas en el paso (e), lo que supone una importante ventaja con respecto a otros métodos descritos en el estado de la técnica. En una realización aún más preferida, la concentración de fibronectina en el producto resultante del paso (d) es de entre 0,5 y 1 g/L. No obstante, una concentración menor o mayor también podría emplearse.

Una vez realizados los pasos (a)-(d) del método de la invención, el producto resultante del paso (d) se deja reposar en un soporte para que se produzca la formación de la matriz que comprende la fibrina y el polisacárido, y que tiene embebidas las células del paso (a). 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.

El paso (e) del método de la invención consiste en cultivar células aisladas, preferiblemente, de un mamífero, en o sobre el producto resultante del paso (d). Dichas células pueden obtenerse mediante diferentes procedimientos descritos en el estado de la técnica y 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. Algunos de estos procedimientos se describen en detalle en los Ejemplos de esta solicitud de patente.

Las células del paso (e) pueden ser células diferenciadas como, por ejemplo, pero sin limitarse, células epiteliales, o células no diferenciadas con la capacidad para diferenciarse en dichas células como, por ejemplo, células madre adultas.

En una realización preferida, las células diferenciadas del paso (e) son células epiteliales, como, por ejemplo, pero sin limitarse, queratinocitos, células de la mucosa oral, células del epitelio de la vejiga, células del epitelio de la uretra, células del epitelio corneal o células endoteliales vasculares.

Preferiblemente, las células epiteliales del paso (e) 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, las células epiteliales proceden, preferiblemente, de la epidermis de la piel, es decir, son queratinocitos; cuando se emplea para preparar un tejido sustituto de vejiga o una vejiga artificial, las células epiteliales proceden, preferiblemente, del epitelio de la vejiga o urotelio; cuando se emplea para preparar un tejido sustituto de uretra o una uretra artificial las células epiteliales proceden, preferiblemente, del epitelio de la uretra; cuando se emplea para preparar un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial las células epiteliales son células del epitelio corneal.

Sin embargo, las células epiteliales del paso (e) también pueden obtenerse a partir de un tejido u órgano distinto 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 vejiga o una vejiga artificial, o cuando se emplea para preparar un tejido sustituto de uretra o una uretra artificial, las células epiteliales pueden ser queratinocitos o células del epitelio de la mucosa oral.

Uno de los problemas que se asocian a la generación de tejido artificial en laboratorio es la obtención de un número significativo de células diferenciadas, por lo que con frecuencia, se considera como una fuente alternativa el uso de células madre, con capacidad para diferenciarse a dichas células. Se entiende por "célula madre" aquella que tiene una elevada capacidad para dividirse y diferenciarse morfológica y funcionalmente en distintos tipos de células más especializadas. Durante el proceso de diferenciación, una célula indiferenciada modifica su fenotipo y morfología para convertirse en una célula diferenciada, con una estructura y función especializada.

Las células madre se pueden clasificar atendiendo a su potencialidad, es decir, a su capacidad para diferenciarse en distintos tipos celulares en: (a) totipotenciales: capaces de diferenciarse tanto en tejido embrionario como en tejido extraembrionario; (b) pluripotenciales con capacidad para diferenciarse a cualquiera de los tejidos procedentes de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo); (c) multipotenciales: capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares derivados de una misma capa embrionaria (endodermo, mesodermo o ectodermo); y (d) unipotenciales: capacidad para formar un único linaje celular.

Según su origen, las células madre se han dividido en: (a) embrionarias: de la masa celular interna del blastocisto en el estadio del embrión preimplantatorio o de la cresta gonadal, y que son totipotenciales o pluripotenciales; y (b) adultas: en el adulto, el feto y el cordón umbilical, y que son multipotenciales o unipotenciales. Dentro de las células madre adultas, nos encontramos con las células madre mesenquimales, que se encuentran repartidas en el tejido conectivo de diversos órganos, como, por ejemplo, pero sin limitarse, la médula ósea, la sangre periférica, el tejido adiposo o el cordón umbilical. En una realización preferida, las células madre adultas son células madre adultas de la médula ósea, del tejido adiposo o del cordón umbilical.

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 (e) 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*.

En una realización preferida, las células del paso (e) de la invención son de origen autólogo. No obstante, las células del paso (e) también pueden ser de origen alogénico o xenogénico.

Sobre el producto resultante del paso (d) y/o en su interior las células del paso (e) son capaces de proliferar. Preferiblemente, las células del paso (e) proliferan sobre la superficie del producto resultante del paso (d).

Las células del paso (e) 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.

Para la correcta diferenciación de algunos tipos celulares puede ser necesario un paso adicional. Por ejemplo, en el caso de 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).

5 Por tanto, en una realización preferida, el método de la invención, además de los pasos (a)-(f) descritos anteriormente comprende un paso adicional en el que el producto resultante del paso (e) se expone al aire. 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.

10 Una de las innovaciones más importantes del método de la invención consiste en la existencia de un paso (f) en el que se induce la nanoestructuración del producto resultante del paso (e). La expresión “nanoestructuración”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una modificación estructural consistente en la generación de enlaces de tamaño inferior a una micra entre las fibras de fibrina y entre éstas y las moléculas de agarosa.

15 En una realización preferida, la inducción de la nanoestructuración del paso (f) comprende la deshidratación y/o la compresión mecánica del producto resultante del paso (e). El objetivo del paso (f) es generar una modificación estructural entre las fibras de fibrina y las moléculas de agarosa del tejido artificial para alcanzar niveles óptimos de consistencia y elasticidad, que no se obtienen mediante otros métodos descritos en el estado de la técnica. El resultado final es una modificación irreversible de las fibras que genera unas cualidades biomecánicas muy favorables para la manipulación quirúrgica y el implante clínico.

20 El término “deshidratación” se refiere a una eliminación parcial y/o total del fluido intersticial del producto resultante del paso (e). Por ejemplo, la cantidad de fluido intersticial eliminado del producto resultante del paso (e) puede ser de, al menos, un 50%, al menos, un 60%, al menos, un 70%, al menos, un 80%, al menos, un 90% o, al menos, un 99% del fluido intersticial contenido originalmente en el producto resultante del paso (e).

25 La deshidratación del producto resultante del paso (e) puede conseguirse por medio de cualquier procedimiento físico o químico. En una realización preferida, la deshidratación del producto resultante del paso (e) comprende un procedimiento seleccionado de la lista que comprende: drenaje, evaporación, succión, presión capilar, ósmosis o electro-ósmosis.

30 El líquido intersticial puede ser eliminado mediante la inclinación del producto resultante del paso (e); el líquido intersticial es entonces drenado debido al efecto de la gravedad y el gradiente.

35 El líquido puede ser eliminado mediante succión. Por ejemplo, aplicando vacío mediante una bomba mecánica a la superficie donde se encuentra el producto resultante del paso (e).

40 El líquido intersticial puede ser eliminado mediante evaporación, por ejemplo, incubando el producto resultante del paso (e) en condiciones que promueven la evaporación, por ejemplo, a una presión menor que la presión atmosférica y/o a una temperatura mayor que la temperatura ambiente.

El líquido intersticial también puede ser eliminado empleando un agente osmótico con tendencia a absorber agua como, por ejemplo, pero sin limitarse, una solución de cloruro sódico hiperosmolar, separando al producto resultante del paso (e) de esta solución mediante una membrana semipermeable, una esponja u otro material secante.

45 En una realización preferida, el líquido intersticial puede ser eliminado mediante presión capilar, por ejemplo, mediante la aplicación de un material absorbente al producto resultante del paso (e). Algunos ejemplos de material absorbente que podrían ser empleados en el paso (f) de la invención, pero sin limitarse, son papel de filtro, papel 3M de la casa comercial Whatman, fibra de celulosa, o tela absorbente. Preferiblemente, el material absorbente estará esterilizado.

50 El tiempo requerido para la deshidratación dependerá del procedimiento o procedimientos empleados, y puede ser determinado con facilidad por un experto en la materia. La idoneidad del tejido artificial obtenido mediante la aplicación de un determinado procedimiento de deshidratación durante un determinado periodo de tiempo puede comprobarse mediante diversos métodos de evaluación conocidos en el estado de la técnica como, por ejemplo, pero sin limitarse, los descritos en los ejemplos de esta memoria.

55 El líquido intersticial también puede ser eliminado mediante la compresión mecánica del producto resultante del paso (e). La compresión mecánica del producto resultante del paso (e) además puede servir para dar al producto resultante del paso (e) una forma definida deseada.

60 La compresión del producto resultante del paso (e) puede realizarse mediante cualquier procedimiento descrito en el estado de la técnica. Puede emplearse un procedimiento de compresión “estático”, donde el producto resultante del paso (e) permanece estacionario como, por ejemplo, pero sin limitarse, la aplicación de una carga estática (por ejemplo, un peso muerto), un hidráulico o una leva. También puede emplearse un procedimiento de compresión “dinámico”, donde el producto resultante del paso (e) se mueve durante la compresión como, por ejemplo, mediante la aplicación de uno o más rodillos o mediante la extrusión a través de un orificio constrictor.

La compresión mecánica del producto resultante del paso (e) puede realizarse mediante extrusión, por ejemplo, mediante el paso del producto resultante del paso (e) a través de un orificio que lo constriña, por ejemplo, una cámara cónica. La cámara cónica puede tener paredes porosas, de manera que permitiría la eliminación del fluido intersticial del producto resultante del paso (e) mientras éste pasa a su través.

La compresión del producto resultante del paso (e) puede realizarse mediante la centrifugación del producto resultante del paso (e). Por ejemplo, el producto resultante del paso (e) puede colocarse sobre un tubo con el fondo poroso, de manera que, además de la compresión mecánica, se produciría la eliminación del líquido intersticial del producto resultante del paso (e).

La compresión del producto resultante del paso (e) puede realizarse mediante la aplicación de un globo en su interior para comprimir el producto resultante del paso (e) contra una superficie sólida. La superficie sólida puede, por ejemplo, formar un tubo alrededor del producto resultante del paso (e), permitiendo la formación de un tejido artificial tubular.

En una realización preferida, la compresión del producto resultante del paso (e) comprende la aplicación de un peso encima del producto resultante del paso (e), de manera que se ejerce una acción mecánica de presión sobre el tejido. Resulta evidente que cuanto mayor sea el peso menor será el tiempo necesario para obtener un tejido artificial con las características apropiadas. El peso empleado para la compresión puede tener una superficie plana o puede colocarse sobre un material que tenga una superficie plana, por ejemplo, plástico, cerámica, metal o madera.

En la figura 1 de la presente memoria se muestra un esquema no limitativo de cómo puede realizarse la nanoestructuración del producto resultante del paso (e) mediante su deshidratación y compresión. En dicho esquema puede observarse como la nanoestructuración puede obtenerse situando el producto resultante del paso (e) entre dos papeles de filtro estéril, y colocando sobre el mismo un peso de aproximadamente 250 g (equivalente a aproximadamente 2.000 N/m²) sobre una superficie plana de vidrio estéril durante aproximadamente 10 minutos; entre el tejido y el papel de filtro sobre el que se coloca el peso se puede disponer un material poroso para evitar que el producto resultante del paso (e) se adhiera al papel de filtro. El material empleado para evitar la adherencia debe ser poroso para permitir la salida de agua desde el tejido hacia el agente deshidratante: dicho material poroso empleado para evitar la adherencia puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, una membrana de policarbonato, nylon, vidrio, cerámica o metal perforado.

En una realización preferida, la compresión del producto resultante del paso (e) comprende la aplicación de una presión sobre el mismo. Preferiblemente, la magnitud de la presión es de entre 1.000 y 5.000 N/m², más preferiblemente, de entre 1.500 y 2.500 N/m² y, aún más preferiblemente, de aproximadamente 2.000 N/m². La aplicación de dicha presión puede hacerse manual, automática o semi-automáticamente. El tiempo que se necesita ejercer la presión depende de la magnitud de la presión aplicada y puede ser determinado con facilidad por un experto en la materia. Resulta evidente que cuanto mayor sea la presión menor será el tiempo necesario para obtener un tejido artificial con las características apropiadas. La idoneidad del tejido artificial obtenido mediante la aplicación de una determinada magnitud de presión durante un determinado periodo de tiempo puede comprobarse mediante diversos métodos de evaluación conocidos en el estado de la técnica como, por ejemplo, pero sin limitarse, los descritos en los ejemplos de esta memoria.

Para inducir la nanoestructuración del producto resultante del paso (e) pueden emplearse uno o más procedimientos, de manera secuencial o simultánea. El tiempo requerido para la nanoestructuración puede ser menor de 12 horas, menor de 6 horas, menor de 3 horas, menor de 1 hora, menor de 30 minutos, menor de 10 minutos, menor de 2 minutos o menor de 1 minuto. El tiempo requerido para la nanoestructuración dependerá del procedimiento o procedimientos empleados, y puede ser determinado con facilidad por un experto en la materia. La idoneidad del tejido artificial obtenido mediante la aplicación de un determinado procedimiento durante un determinado periodo de tiempo puede comprobarse mediante diversos métodos de evaluación conocidos en el estado de la técnica como, por ejemplo, pero sin limitarse, los descritos en los ejemplos de esta memoria.

Un segundo aspecto de la presente invención, se refiere a un tejido artificial obtenible por el método de la invención anteriormente descrito (de ahora en adelante, tejido artificial de la invención).

En una realización preferida de este segundo aspecto de la invención, el tejido artificial de la invención es un tejido sustituto de piel o una piel artificial.

En otra realización preferida de este segundo aspecto de la invención, es un tejido sustituto de vejiga o una vejiga artificial.

En otra realización preferida de este segundo aspecto de la invención, el tejido artificial de la invención es un tejido sustituto de uretra o una uretra artificial.

En otra realización preferida de este segundo aspecto de la invención, el tejido artificial de la invención es un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial.

El tejido artificial obtenible por el método de la invención se puede cortar en el tamaño deseado y/o disponer en una conformación adecuada para su uso.

Previamente a su uso, puede evaluarse la idoneidad del tejido artificial de la invención para ejercer su función, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante cualquiera de los procedimientos descritos en los ejemplos de la presente descripción.

Los fármacos y productos químicos deben ser evaluados antes de su comercialización en animales de experimentación. A este respecto, son varios los informes y directivas aprobados por la Unión Europea que tratan de restringir o incluso prohibir la experimentación con animales en el sector de los productos cosméticos (Directiva 76/768/CEE del Consejo Europeo relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros en materia de productos cosméticos), y es de esperar que la prohibición total sea efectiva durante los próximos años. La Unión Europea apoya todas las medidas cuyo objetivo principal sea el bienestar de los animales utilizados con fines experimentales y para lograr métodos científicos de sustitución para reducir al mínimo el número de animales utilizados en experimentación (Decisión 1999/575/CE del Consejo, de 23 de marzo de 1998, relativa a la celebración por la Comunidad del Convenio Europeo sobre la protección de los animales vertebrados utilizados para experimentación y otros fines científicos - Diario Oficial L 222 de 24.08.1999).

Por tanto, un tercer aspecto de la invención se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la evaluación de un producto farmacológico y/o químico.

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 cuarto aspecto de la invención se refiere al uso 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.

El tejido artificial de la invención puede emplearse para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de cualquier tejido u órgano enfermo o dañado de un organismo vivo. El tejido o el órgano pueden ser internos como, por ejemplo, pero sin limitarse, la uretra o la vejiga, o externos como, por ejemplo, pero sin limitarse, la córnea o la piel. En una realización preferida, el tejido o el órgano dañado se seleccionan de la lista que comprende: piel, vejiga, uretra, córnea, mucosa oral, conjuntiva, pared abdominal, tímpano, faringe, laringe, intestino, peritoneo, ligamento, tendón, hueso, meninge o vagina. El tejido o el órgano pueden estar enfermos o dañados como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad, por ejemplo, pero sin limitarse, una enfermedad infecciosa, inflamatoria, genética o degenerativa; un daño físico como un traumatismo o una intervención quirúrgica, un daño químico o una interrupción del flujo sanguíneo.

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

Una realización preferida de este quinto 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 se 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 selec-

cionada 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 quinto 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 se 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 queratogloblo, un descematocele, un traumatismo, una causticación, una insuficiencia límbica, 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.

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento.

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 presente invención 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. En una realización preferida, el tejido o el órgano dañado se seleccionan de la lista que comprende: piel, vejiga, uretra, córnea, mucosa oral, conjuntiva, pared abdominal, tímpano, faringe, laringe, intestino, peritoneo, ligamento, tendón, hueso, meninge o vagina.

Una realización preferida de este quinto 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 quinto 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 quinto 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 quinto 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 o una litiasis vesical.

Una realización más preferida de este quinto 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 quinto 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 quinto 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 quinto 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 funcio-

nal 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 límica, 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.

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

Una realización preferida de este sexto 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 sexto 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.

Una realización preferida de este sexto 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 sexto 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 sexto 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 o una litiasis vesical.

Una realización más preferida de este sexto 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 sexto 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 límica, 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.

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.

Como se emplea aquí, el término “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” ó “ingrediente farmacéuticamente activo” significa 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.

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

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “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.

10 Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra un esquema del procedimiento empleado para la nanoestructuración del tejido artificial.

Figura 2. Muestra la evaluación del producto de piel humana artificial. A. Análisis microscópico *in vitro*. B. Análisis macro y microscópico de la piel humana artificial evaluada *in vivo*. C. Análisis inmunohistoquímico.

Figura 3. Muestra la evaluación del producto de piel humana artificial con células de la gelatina de Wharton. A. Determinación de la viabilidad de las células madre de la gelatina de Wharton. B. Análisis microscópico. C. Análisis inmunohistoquímico de las siguientes proteínas: pancitoqueratina (PANC), queratina 1 (KRT1), queratina 10 (KRT10), involucrina (INVOL) y filagrina (FILAG).

Figura 4. Muestra la evaluación de los productos corneales. A. Análisis microscópico e inmunohistoquímico: inmunofluorescencia de diferentes proteínas relacionadas con uniones intercelulares en el epitelio de las córneas humanas control (C) y de los productos corneales mantenidos *in vitro* en diferentes estadios de maduración y desarrollo (1: córnea con una única capa de epitelio, 2: córnea con 2-3 capas, 3: córnea con epitelio estratificado, 4: córnea con epitelio estratificado y sometido a técnica aire-líquido). B. Control de calidad reológico. C. Control de calidad óptica. D. Control genético: Principales funciones génicas expresadas por los constructos corneales artificiales generados mediante ingeniería tisular. E. Control genético: Organización espacial de las funciones génicas de los genes de los constructos corneales determinadas mediante los programas Cytoscape y BiNGO. Se observan en color gris oscuro las funciones más expresadas, de color gris claro las funciones algo menos expresadas y de blanco las menos expresadas. F. Evaluación *in vivo* del comportamiento clínico de los productos corneales artificiales en un modelo animal. A: tras eliminar la hemicórnea anterior, se sitúa el constructo corneal sobre la superficie del estroma; B: aspecto final una vez suturado; C: evolución a las 3 semanas; D: evolución a las 6 semanas.

Figura 5. Muestra la evaluación del producto de uretra humana artificial. A. Análisis microscópico. B. Análisis inmunohistoquímico (expresión de integrinas).

Figura 6. Muestra la evaluación del producto de vejiga urinaria artificial. A. Análisis microscópico: Vejiga humana artificial fabricada en laboratorio y mantenida en cultivo durante 1 y 3 semanas, respectivamente. B. Análisis inmunohistoquímico: Análisis mediante inmunofluorescencia de la vejiga artificial humana generada mediante ingeniería tisular y de la vejiga humana control normal para las citoqueratinas (CK) 7, 8, 4, 13 y pancitoqueratina.

Ejemplos

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.

50 Ejemplo 1

Protocolo de elaboración de un producto de piel humana artificial

A.- Obtención de muestras de piel humana

Se utilizan muestras de piel de espesor total obtenidas de donantes bajo anestesia local y locoregional. Una vez obtenida la muestra de forma estéril, con la ayuda de unas tijeras se eliminará el tejido graso subcutáneo hasta dejar expuesta la capa de dermis. A continuación, los tejidos extraídos serán introducidos inmediatamente en medio de transporte estéril constituido por medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con antibióticos (500 U/ml de penicilina G y 500 µg/ml de estreptomycin) y antimicóticos (1,25 µg/ml de anfotericina B) para evitar una eventual contaminación de la muestra.

B.- Generación de cultivos primarios de fibroblastos y queratinocitos

Transcurrido el periodo de transporte, todas las muestras deberán ser lavadas dos veces en una solución estéril de PBS con penicilina, estreptomycin y anfotericina B (500 U/ml, 500 µg/ml y 1,25 µg/ml, respectivamente) para eliminar todos los restos de sangre, fibrina, grasa o materiales extraños que pudieran encontrarse adheridos a las muestras.

En primer lugar, para separar la dermis de la epidermis, las muestras se incuban a 37°C en una solución estéril con dispasa II a 2 mg/ml en PBS. De este modo, se consigue disgregar la membrana basal sobre la cual se ancla el epitelio a la dermis, por lo que tras esto se conseguirá separar mecánicamente por un lado el epitelio y por otro la dermis.

Una vez separado, el epitelio correspondiente a la epidermis, se fragmenta éste con tijeras hasta obtener pequeños fragmentos para posteriormente incubarlos en una solución de tripsina-EDTA. Con la ayuda de una pipeta empapada en tripsina-EDTA se transfiere este epitelio a un frasco con agitador magnético previamente esterilizado. Agregar unos 2,5 ml de tripsina-EDTA al frasco con agitador e incubar a 37°C durante 10 minutos para separar enzimáticamente los queratinocitos de la epidermis. Transcurrido este tiempo, se recoge la tripsina que contenía los queratinocitos individualizados en un tubo cónico de 50 ml con ayuda de una pipeta, procurando no arrastrar con ella fragmentos de epitelio. Neutralizar con igual cantidad de medio de cultivo suplementado con un 10% de suero bovino fetal y se centrifuga durante 10 minutos a 1000 rpm. El pellet resultante que contiene gran cantidad de queratinocitos individualizados se resuspende en 2-3 ml de medio de cultivo de queratinocitos, el cual favorece preferentemente el crecimiento de las células epiteliales sobre los fibroblastos. Este medio está compuesto por 3 partes de medio DMEM rico en glucosa y una parte de medio Ham F-12, todo ello suplementado con un 10% de suero bovino fetal, antibióticos-antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycin y 0,25 µg/ml de anfotericina B), 24 µg/ml de adenina y distintos factores de crecimiento: 0,4 µg/ml de hidrocortisona, 5 µg/ml de insulina, 10 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF), 1,3 ng/ml de triyodotironina y 8 ng/ml de toxina colérica.

Para llevar a cabo la digestión de la matriz extracelular de la dermis de la piel y conseguir la separación de los fibroblastos estromales incluidos en dicha matriz, las muestras deben ser incubadas a 37°C en una solución estéril de colagenasa tipo I de *Clostridium histolyticum* a 2 mg/ml en medio de cultivo DMEM sin suero bovino fetal durante 6 horas. Esta solución es capaz de digerir el colágeno de la dermis y liberar los fibroblastos estromales. Para la obtención de cultivos primarios de fibroblastos, se debe centrifugar a 1.000 rpm durante 10 minutos la solución de digestión que contiene las células estromales disgregadas de la dermis y el pellet celular correspondiente a los fibroblastos se cultiva en frascos de cultivo de 15 cm² de superficie. Como medio de cultivo, se utiliza DMEM enriquecido en glucosa suplementado con antibióticos y antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycin y 0,25 µg/ml de anfotericina B) y suero bovino fetal (SBF) al 10%. A este medio básico de cultivo lo denominamos medio de fibroblastos.

En todos los casos, las células serán incubadas a 37°C con un 5% de dióxido de carbono, en condiciones estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada tres días.

C.- Subcultivo de las células procedentes de cultivos primarios de piel

Una vez alcanzada la confluencia celular, los distintos cultivos celulares de fibroblastos o queratinocitos se deben lavar con PBS estéril e incubarse en 1-3 ml de una solución de tripsina 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l a 37°C durante 10 minutos. Así se consigue disgregar los mecanismos de adhesión celular y obtener células individualizadas y no adheridas a la superficie del frasco de cultivo de queratinocitos y dermis.

Para el caso de la dermis, una vez que las células se desprenden de la superficie de los frascos de cultivo, se procede a inactivar la tripsina utilizada mediante adición de 10 ml de medio de cultivo de fibroblastos. La presencia de abundantes proteínas séricas es capaz de inactivar la acción proteolítica de la tripsina. En los queratinocitos, se utiliza el medio de cultivo de queratinocitos.

Posteriormente, las soluciones de queratinocitos y de fibroblastos en las cuales se localizan las células desprendidas, se centrifugan a 1000 rpm durante 10 minutos para obtener un pellet o botón celular con las células de interés, desechándose el sobrenadante con la tripsina. El pellet celular se resuspende cuidadosamente en 5 ml de medio de cultivo y estas células se cultivan en frascos de cultivo de 15, 25 o 75 cm² de superficie.

Habitualmente, los cultivos de queratinocitos se expanden hasta aproximadamente cinco veces en nuevos frascos de cultivo.

En todos los casos, y para asegurar una adecuada viabilidad celular, la elaboración de sustitutos de piel se llevó a cabo utilizando células correspondientes a los cuatro primeros subcultivos.

D.- Construcción de productos de piel humana artificial basados en fibrina y agarosa mediante ingeniería tisular

1- Generación de sustitutos de la dermis con fibroblastos inmersos en su espesor utilizando matrices extracelulares de fibrina y agarosa. Estos sustitutos dérmicos se generarán directamente sobre insertos porosos de 0,4 µm de diámetro para permitir el paso de nutrientes pero no de las propias células. Para preparar 10 ml de sustituto dérmico se procederá del siguiente modo:

- Obtención de 7,6 ml de plasma sanguíneo humano procedente de donación (posibilidad de origen autólogo).
- Adición de 150.000 fibroblastos de la piel humana previamente cultivados y resuspendidos en 750 µl de medio de cultivo DMEM.
- Adición de 150 µl de ácido tranexámico para evitar la fibrinólisis del gel de fibrina.

- Adición de 1 ml de ClCa_2 al 1% para inducir la reacción de coagulación y generar una red de fibras de fibrina.

- Adición rápida de 0,5 ml de agarosa tipo VII al 2% disuelta en PBS y calentada hasta alcanzar el punto de fusión y mezclado suave mediante agitación. La concentración final de agarosa en la mezcla será del 0,1%. El rango de concentraciones de agarosa que permite productos dérmicos viables oscila entre 0,025% y 0,3% y deberá establecerse en relación con el paciente objeto de su utilización.

- Alicuotar lo antes posible en los insertos porosos de cultivo celular.

- Dejar polimerizar en reposo durante al menos 30 min.

2- Desarrollo de una capa de epitelio (epidermis) en la superficie del sustituto dérmico mediante subcultivo de los queratinocitos sobre el sustituto dérmico. Cubrir con medio de cultivo específico para queratinocitos.

3- Mantener en incubador a 37°C con un 5% de CO_2 en ambiente húmedo siguiendo protocolos estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada 3 días hasta que las células epiteliales alcanzan la confluencia en la superficie del sustituto dérmico (alrededor de una semana).

4- Exponer la superficie epitelial al aire (técnica aire líquido) manteniendo el sustituto dérmico sumergido en medio de cultivo para promover la estratificación y la maduración de la epidermis (alrededor de una semana).

5- Extraer el producto de piel humana artificial de la superficie de cultivo y proceder a su deshidratación parcial depositando el mismo sobre un papel de filtro estéril de 3-5 mm de espesor colocado sobre una superficie plana de vidrio estéril. Colocar un fragmento de tul o tela porosa de nylon esterilizada con alcohol 70% sobre la superficie del sustituto de piel para evitar que la capa epitelial del sustituto de piel se adhiera al papel de filtro. Tras ello, colocar un segundo papel de filtro estéril de 3-5 mm de grosor sobre el sustituto de piel cubierto por tela. Depositar un fragmento plano de vidrio estéril en su superficie y colocar un objeto de aproximadamente 250 g de peso sobre éste (Figura 1). Todo el proceso se ha de llevar a cabo en campana de flujo laminar a temperatura ambiente durante 10 minutos. El objetivo de este proceso es reducir significativamente los niveles de hidratación del producto para alcanzar niveles óptimos de consistencia y elasticidad.

Evaluación del producto de piel humana artificial (Figura 2)

1) Análisis microscópico del producto de piel artificial humana (control de calidad histológico)

La evaluación de los productos de piel artificial reveló que la estructura de éstos presentaba numerosas similitudes con la piel humana nativa normal, aunque el tiempo de desarrollo en cultivo influía directamente sobre la estructura de estos productos artificiales. En concreto, el análisis de muestras mantenidas en cultivo durante cuatro semanas reveló lo siguiente:

Evaluación in vitro (Figura 2A)

• Los productos de piel evaluados a la semana de su elaboración presentaron una gruesa capa estromal en la que existe una abundante población de fibroblastos en proliferación. Sobre la superficie de este sustituto estromal, se apreció una única capa de células epiteliales.

• En la segunda semana de desarrollo en cultivo, se observó un mayor número de células en el estroma, así como una estratificación inicial del epitelio, formándose una o dos hileras de queratinocitos en su superficie.

• A partir de este momento continúa la proliferación de queratinocitos, observándose en la tercera semana una nueva hilera de células en el epitelio.

• En la cuarta semana existía un total de 3 a 4 hileras de células, pero no fue posible distinguir los distintos estratos del epitelio. No se apreciaron papilas, anejos cutáneos o estrato córneo.

Evaluación in vivo (Figura 2B)

Al contrario de lo que se observó en los productos de piel artificial mantenidos en cultivo, la piel artificial implantada en un modelo animal presentó muy adecuados niveles de estructuración y diferenciación tisular, tal como se describe a continuación.

• En el día diez tras haber realizado la implantación del producto en el ratón se pudo observar la presencia de una dermis muy rica en células y con algunas fibras y material extracelular desorganizado. Destaca la presencia de infiltrados leucocitarios en la dermis, así como la neoformación de un tejido vascular importante comprendiendo arteriolas, vénulas y capilares. A nivel epitelial, se observan entre tres y cinco capas celulares, no apreciándose de forma clara los estratos espinoso y granuloso, aunque sí el basal y un estrato córneo incipiente. De igual modo, se evidencia una línea dermoepidérmica homogénea, aunque sin la presencia de papilas ni anejos cutáneos.

• Tras veinte días del implante en los animales atímicos, se apreció una disminución en la concentración de fibroblastos y leucocitos de la dermis, así como un aumento significativo del contenido fibrilar en la dermis. De igual modo, se observó la existencia de entre cuatro y seis capas de queratinocitos epidérmicos, distinguiéndose en este momento cuatro estratos diferenciados: basal, espinoso, granuloso y córneo, siendo el estrato espinoso el menos evidente de los cuatro. Al igual que a los diez días de evolución, se aprecia una línea dermoepidérmica homogénea, aunque sin la presencia de papilas ni anejos cutáneos.

• En la muestra del día treinta se observó un mayor contenido fibrilar en la dermis que días anteriores, apreciándose ya gran cantidad de estratos en el epitelio, existiendo entre seis y nueve capas de queratinocitos, con una clara diferenciación de estratos epiteliales (basal, espinoso, granuloso y córneo). Tampoco se apreciaron papilas ni anejos cutáneos.

• El día cuarenta de evolución *in vivo*, se observó un mayor contenido en fibras en el estrato dérmico, estabilizándose el número de capas de queratinocitos del epitelio (entre seis y nueve). No se evidenciaron papilas en unión dermoepidérmica ni anejos cutáneos.

2) Análisis inmunohistoquímico del producto de piel artificial humana (Figura 2C)

El análisis de la expresión de citoqueratinas (pancitoqueratina, citoqueratina 1 y citoqueratina 10), filagrina e involucrina de los controles de piel humana normal y los productos de piel obtenidos en el laboratorio, nos permitió determinar un patrón específico de expresión de estas proteínas para cada tipo de muestra, demostrándose que la piel humana artificial es capaz de expresar las mismas proteínas de superficie que la piel humana normal.

Ejemplo 2

Elaboración de un producto de piel humana artificial utilizando células madre de la gelatina de Wharton

A.- Obtención de muestras de piel y de cordón umbilical humano

Se utilizan muestras de piel de espesor total obtenidas de donantes bajo anestesia local y locoregional. Una vez obtenida la muestra de forma estéril, con la ayuda de unas tijeras se eliminará el tejido graso subcutáneo hasta dejar expuesta la capa de dermis. A continuación, los tejidos extraídos serán introducidos inmediatamente en medio de transporte estéril constituido por medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con antibióticos (500 U/ml de penicilina G y 500 µg/ml de estreptomycin) y antimicóticos (1,25 µg/ml de anfotericina B) para evitar una eventual contaminación de la muestra.

Los cordones umbilicales utilizados se obtienen de partos por cesárea de mujeres gestantes a término. Después de cada nacimiento, se obtiene un fragmento de 10-15 cm del cordón umbilical, el cual es inmediatamente conducido al laboratorio en medio de transporte similar al que se usa para la piel.

B.- Generación de cultivos primarios de fibroblastos y de células madre de la gelatina de Wharton

Transcurrido el periodo de transporte, todas las muestras deberán ser lavadas dos veces en una solución estéril de PBS con penicilina, estreptomycin y anfotericina B (500 U/ml, 500 µg/ml y 1,25 µg/ml, respectivamente) para eliminar todos los restos de sangre, fibrina, grasa o materiales extraños que pudieran encontrarse adheridos a las muestras. Posteriormente, se procesa cada tipo de muestra de forma independiente:

- En el caso de la piel, en primer lugar se procede a separar la dermis de la epidermis mediante incubación de las muestras a 37°C en una solución estéril con dispasa II a 2 mg/ml en PBS. De este modo, se consigue disgregar la membrana basal sobre la cual se ancla el epitelio a la dermis, por lo que tras esto se conseguirá separar mecánicamente por un lado el epitelio y por otro la dermis.

Para llevar a cabo la digestión de la matriz extracelular de la dermis de la piel y conseguir la separación de los fibroblastos estromales incluidos en dicha matriz, las muestras deben ser incubadas a 37°C en una solución estéril de collagenasa tipo I de *Clostridium histolyticum* a 2 mg/ml en medio de cultivo DMEM sin suero bovino fetal durante 6 horas. Esta solución es capaz de digerir el colágeno de la dermis y liberar los fibroblastos estromales. Para la obtención de cultivos primarios de fibroblastos, se debe centrifugar a 1.000 rpm durante 10 minutos la solución de digestión que contiene las células estromales disgregadas de la dermis y el pellet celular correspondiente a los fibroblastos se cultiva en frascos de cultivo de 15 cm² de superficie. Como medio de cultivo, se utiliza DMEM enriquecido en glucosa suplementado con antibióticos y antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycin y 0,25 µg/ml de anfotericina B) y suero bovino fetal (SBF) al 10%. A este medio básico de cultivo lo denominamos medio de fibroblastos.

- En el caso del cordón umbilical, las muestras se seccionan longitudinalmente a través de la vena umbilical. Se retirarán cuidadosamente las arterias y la vena umbilical para separar la gelatina de Wharton. Posteriormente, se fragmenta la gelatina hasta convertirla en fragmentos de tejido muy pequeño. Estos fragmentos de gelatina de Wharton se incuban en 30 ml de collagenasa tipo I (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) a 37°C en agitación

durante aproximadamente 4-6 horas, para posteriormente recoger las células disociadas mediante centrifugación durante 7 min a 1050 revoluciones por minuto (rpm). A continuación, se elimina cuidadosamente el sobrenadante y se resuspende el pellet celular en 5-10 ml de tripsina prediluida (Sigma-Aldrich). De nuevo, se incuba a 37°C en un baño de agitación durante 30 minutos. Después, se neutralizaron los efectos de la tripsina añadiendo 10-20 ml de medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal al 10%, centrifugándose de nuevo a 1000 rpm durante 10 minutos para obtener las células aisladas. Finalmente, se resuspenden estas células en medio de cultivo Amniomax en un frasco de cultivo de 25 cm².

En todos los casos, las células serán incubadas a 37°C con un 5% de dióxido de carbono, en condiciones estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada tres días.

C.- Subcultivo de las células procedentes de cultivos primarios de piel y de células madre de la gelatina de Wharton

Una vez alcanzada la confluencia celular, los distintos cultivos celulares de fibroblastos o células madre de la gelatina de Wharton se deben lavar con PBS estéril e incubarse en 1-3 ml de una solución de tripsina 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l a 37°C durante 10 minutos.

Así se consigue disgregar los mecanismos de adhesión celular y obtener células individualizadas y no adheridas a la superficie del frasco de cultivo.

Una vez que las células se desprenden de la superficie de los frascos de cultivo, se procede a inactivar la tripsina utilizada mediante adición de 10 ml de medio de cultivo de fibroblastos. La presencia de abundantes proteínas séricas es capaz de inactivar la acción proteolítica de la tripsina.

Posteriormente, las soluciones en las cuales se localizan las células desprendidas, se centrifugan a 1000 rpm durante 10 minutos para obtener un pellet o botón celular con las células de interés, desechándose el sobrenadante con la tripsina. El pellet celular se resuspende cuidadosamente en 5 ml de medio de cultivo y estas células se cultivan en frascos de cultivo de 15, 25 o 75 cm² de superficie.

Habitualmente, los cultivos de queratinocitos se expanden hasta aproximadamente cinco veces en nuevos frascos de cultivo.

D.- Construcción de productos de piel humana artificial basados en fibrina y agarosa mediante ingeniería tisular

1- Generación de sustitutos de la dermis con fibroblastos inmersos en su espesor utilizando matrices extracelulares de fibrina y agarosa. Estos sustitutos dérmicos se generarán directamente sobre insertos porosos de 0,4 µm de diámetro para permitir el paso de nutrientes pero no de las propias células. Para preparar 10 ml de sustituto dérmico se procederá del siguiente modo:

- Obtención de 7,6 ml de plasma sanguíneo humano procedente de donación (posibilidad de origen autólogo).

- Adición de 150.000 fibroblastos de la piel humana previamente cultivados y resuspendidos en 750 µl de medio de cultivo DMEM.

- Adición de 150 µl de ácido tranexámico para evitar la fibrinólisis del gel de fibrina.

- Adición de 1 ml de ClCa₂ al 1% para inducir la reacción de coagulación y generar una red de fibras de fibrina.

- Adición rápida de 0,5 ml de agarosa tipo VII al 2% disuelta en PBS y calentada hasta alcanzar el punto de fusión y mezclado suave mediante agitación. La concentración final de agarosa en la mezcla será del 0,1%. El rango de concentraciones de agarosa que permite productos dérmicos viables oscila entre y 0,025% y 0,3% y deberá establecerse en relación con el paciente objeto de su utilización.

- Alicuotar lo antes posible en los insertos porosos de cultivo celular.

- Dejar polimerizar en reposo durante al menos 30 min.

2- Desarrollo de una capa de epitelio en la superficie del sustituto dérmico mediante subcultivo de las células madre de la gelatina de Wharton sobre el sustituto dérmico. Cubrir con medio de cultivo específico para queratinocitos. Este medio está compuesto por 3 partes de medio DMEM rico en glucosa y una parte de medio Ham F-12, todo ello suplementado con un 10% de suero bovino fetal, antibióticos-antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycin y 0,25 µg/ml de anfotericina B), 24 µg/ml de adenina y distintos factores de crecimiento: 0,4 µg/ml de hidrocortisona, 5 µg/ml de insulina, 10 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF), 1,3 ng/ml de triyodotironina y 8 ng/ml de toxina colérica.

3- Mantener en incubador a 37°C con un 5% de CO₂ en ambiente húmedo siguiendo protocolos estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada 3 días hasta que las células epiteliales alcanzan la confluencia en la superficie del sustituto dérmico (alrededor de una semana).

4- Exponer la superficie epitelial al aire (técnica aire líquido) manteniendo el sustituto dérmico sumergido en medio de cultivo para promover la estratificación y la maduración del epitelio de la capa superficial (alrededor de una semana).

5- Extraer el producto de piel humana artificial de la superficie de cultivo y proceder a su deshidratación parcial depositando el mismo sobre un papel de filtro estéril de 3-5 mm de espesor colocado sobre una superficie plana de vidrio estéril. Colocar un fragmento de tul o tela porosa de nylon esterilizada con alcohol 70% sobre la superficie del sustituto de piel para evitar que la capa epitelial del sustituto de piel se adhiera al papel de filtro. Tras ello, colocar un segundo papel de filtro estéril de 3-5 mm de grosor sobre el sustituto de piel cubierto por tela. Depositar un fragmento plano de vidrio estéril en su superficie y colocar un objeto de aproximadamente 250 g de peso sobre éste (Figura 1). Todo el proceso se ha de llevar a cabo en campana de flujo laminar a temperatura ambiente durante 10 minutos. El objetivo de este proceso es reducir significativamente los niveles de hidratación del producto para alcanzar niveles óptimos de consistencia y elasticidad.

Evaluación del producto de piel humana artificial con células de la gelatina de Wharton (Figura 3)

1) *Determinación de la viabilidad de las células madre de la gelatina de Wharton (control de calidad microanalítico) (Figura 3A)*

La determinación de la viabilidad celular mediante las técnicas microanálisis de energía dispersiva de rayos X nos permite determinar el perfil de concentración iónica intracelular Na, Mg, P, Cl, K, S y Ca), y por tanto conocer el subcultivo más adecuado para su utilización posterior en la construcción de tejidos artificiales. Para ello es necesario realizar la siguiente metodología.

a) Cultivo de las células sobre rejillas de oro previamente recubiertas con una capa de resina (pioloform). Alcanzada la subconfluencia de las células, las rejillas se lavan con agua destilada a 4°C durante 10 segundos para eliminar el medio de cultivo.

b) Criofijación de las células en nitrógeno líquido.

c) Desección de las muestras criofijadas mediante la técnica de freeze-drying en vacío a baja temperatura (-100°C) durante 20 horas. La criofijación se realizara en un aparato de congelación-desección Polaron E5300.

d) Montaje de las muestras criofijadas y desecadas en portamuestras específicos.

e) Recubrimiento de las células con carbón en un Sputtering Polaron E-5000.

f) Observación en un Microscopio Electrónico de Barrido Philips XL-30 equipado con un Detector de Energía Dispersiva de rayos X (EDAX), y un detector de electrones retrodispersados.

g) Análisis Microanalítico Cualitativo utilizando las siguientes constantes: voltaje 10 Kv, aumentos 10.000 x, ángulo de superficie 0°, ángulo de percepción 35°, 500 cps, tiempo de acumulación de cuentas: 200 segundos. De este modo, se obtienen los espectros cualitativos para cada célula estudiada. En dichos espectros se seleccionan los niveles de Na, Mg, P, Cl, K, Ca en sus orbitales K contabilizándose las cuentas por segundo (CPS), el background (BKGD), fondo o radiaciones no características y el índice pico/fondo (P/B).

h) Análisis Microanalítico Cuantitativo. En primer lugar, se cuantifican las concentraciones de los elementos Na, Mg, P, Cl, S, K, y Ca en mmol/Kg de peso seco mediante una modificación del método de Hall (Hall *et al.*, 1973; Staham y Pawley, 1978). Para ello, se utilizan sales estándares de Na, Mg, P, Cl, K, S y Ca disueltas en dextrano al 20% (300.000 Dalton), obteniéndose una curva o recta patrón. Estas sales se tratan del mismo modo que los especímenes a analizar. Finalmente, se calculan las concentraciones de cada uno de los elementos analizados utilizando el método de la regresión lineal a partir de las curvas patrón.

Los resultados obtenidos tras la cuantificación de los niveles iónicos en las células madre de la gelatina de Wharton ponen de manifiesto que los niveles más elevados del índice K/Na corresponden a los subcultivos cuarto y quinto y por tanto, éstos se consideran los más idóneos para su utilización en la fabricación de piel humana mediante ingeniería tisular.

2) *Análisis microscópico de los productos de piel artificial humana (control de calidad histológico) (Figura 3B)*

La evaluación de los productos de piel artificial humana con células de la gelatina de Wharton reveló que la estructura de éstos presentaba numerosas similitudes con la piel humana nativa normal, aunque el tiempo de desarrollo en cultivo influía directamente sobre la estructura de estos tejidos artificiales. En concreto, el análisis de muestras mantenidas en cultivo durante cuatro semanas reveló la formación progresiva de hasta 5 capas de epitelio en la superficie del constructo, aunque las uniones intercelulares no se formaron hasta las últimas fases. Posteriormente, la evaluación *in vivo* de los productos de piel humana generada con células madre de la gelatina de Wharton mostró el desarrollo de una gruesa capa de epitelio sobre el estroma artificial, formándose numerosas uniones intercelulares tipo desmosoma y una membrana basal bien constituida. Todo ello resultó en un producto de piel artificial indistinguible de la piel humana nativa normal, demostrando la utilidad del producto generado.

3) Análisis inmunohistoquímico del producto de piel artificial humana (Figura 3C)

El análisis de la expresión de citoqueratinas (pancitoqueratina, citoqueratina 1 y citoqueratina 10), filagrina e involucrina de los controles de piel humana normal y los productos de piel obtenidos en el laboratorio a partir de células madre de la gelatina de Wharton, nos permitió determinar un patrón específico de expresión de estas proteínas para cada tipo de muestra, demostrándose que los productos de piel humana artificial son capaces de expresar las mismas proteínas de superficie que la piel humana normal.

Ejemplo 3

Elaboración de córneas artificiales

Protocolo de elaboración de córneas artificiales

El protocolo que a continuación se expone es semejante en el producto corneal humano y animal, a excepción de la incorporación del estrato endotelial en el producto corneal animal.

A. Generación de cultivos primarios de células de la córnea

Para establecer cultivos primarios de epitelio corneal, queratocitos estromales y endotelio corneal, si procede, se utilizaron los siguientes métodos y protocolos:

- Obtención de una biopsia del limbo esclero-corneal bajo anestesia local o general y transporte al laboratorio en suero fisiológico estéril.

- Tallado quirúrgico de la córnea para eliminar restos de iris, conjuntiva y coágulos sanguíneos.

- En el producto corneal animal, disección quirúrgica de la membrana de Descemet para aislamiento de las células epiteliales, las cuales se cultivan en medio para células endoteliales. La composición de este medio es la siguiente: 3 partes de medio DMEM y una parte de medio Ham F-12, todo ello suplementado con un 10% de suero bovino fetal, antibióticos-antimicóticos, 24 $\mu\text{g/ml}$ de adenina y distintos factores de crecimiento: 0,4 $\mu\text{g/ml}$ de hidrocortisona, 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina, 1,3 ng/ml de triyodotironina y 8 ng/ml de toxina colérica.

- Disección de 2 mm de córnea central e incubación en colagenasa I al 2% durante 6 h a 37°C. Centrifugación a 1000 rpm durante 10 min para recoger las células madre adultas del estroma corneal (queratocitos), las cuales se cultivarán en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's médium*) con un 10% de suero bovino fetal y antibióticos.

- Fragmentación del limbo esclero-corneal en pequeños explantes de alrededor de 1 mm y cultivo de estos explantes directamente sobre la superficie de frascos de cultivo para la obtención de cultivos primarios de células epiteliales corneales. El medio de cultivo a utilizar (medio de células epiteliales) está compuesto por 3 partes de medio DMEM y una parte de medio Ham F-12, todo ello suplementado con un 10% de suero bovino fetal, antibióticos-antimicóticos, 24 $\mu\text{g/ml}$ de adenina y distintos factores de crecimiento: 0,4 $\mu\text{g/ml}$ de hidrocortisona, 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina, 1,3 ng/ml de triyodotironina, 8 ng/ml de toxina colérica y 10 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF).

Todos los cultivos se mantienen en un incubador a 37°C con un 5% de CO₂ en ambiente húmedo siguiendo protocolos estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada 3 días hasta que las células alcanzan la confluencia en cultivo.

B. Construcción en laboratorio de los productos corneales mediante ingeniería tisular

1- Subcultivo de las células endoteliales previamente aisladas utilizando para ello insertos porosos de 0,4 μm de diámetro para permitir el paso de nutrientes pero no de las propias células. Las células seleccionadas deben pertenecer al cuarto subcultivo (máxima viabilidad de las células endoteliales). Este primer paso sólo se realizará para la generación del producto corneal animal trilaminar.

2- Generación de sustitutos del estroma corneal con queratocitos inmersos en su espesor utilizando matrices extracelulares de fibrina y agarosa sobre los insertos porosos de 0,4 μm de diámetro (este será el primer paso en el caso del producto corneal humano bilaminar). Para preparar 10 ml de sustituto estromal:

- Obtención de 7,6 ml de plasma sanguíneo humano procedente de donación (posibilidad de origen autólogo).

- Adición de 150.000 queratocitos humanos previamente cultivados y resuspendidos en 750 μl de medio de cultivo DMEM.

- Adición de 150 μl de ácido tranexámico para evitar la fibrinólisis del gel de fibrina.

- Adición de 10 μ l de fibronectina a una concentración de 500 mg/ml. El objeto es favorecer la adhesión de las células del epitelio de superficie al sustituto estromal, eliminando el riesgo de desprendimiento existente en los productos corneales actualmente desarrollados.

5 - Adición de 1 ml de CaCl_2 al 1% para inducir la reacción de coagulación y generar una red de fibras de fibrina.

- Adición rápida de 0,5 ml de agarosa tipo VII al 2% disuelta en PBS y calentada hasta alcanzar el punto de fusión y mezclado suave mediante agitación. La concentración final de agarosa en la mezcla será del 0,1%. El rango de concentraciones de agarosa que permite productos corneales viables oscila entre y 0,025% y 0,3% y deberá establecerse en relación con el paciente objeto de su utilización.

- Alicuotar lo antes posible en los insertos porosos de cultivo celular.

- Dejar polimerizar en reposo durante al menos 30 min.

3- Desarrollo de una capa de epitelio corneal en la superficie del sustituto del estroma corneal mediante subcultivo de las células epiteliales corneales sobre el sustituto estromal. Cubrir con medio de cultivo específico para células epiteliales.

4- Mantener en incubador a 37°C con un 5% de CO_2 en ambiente húmedo siguiendo protocolos estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada 3 días hasta que las células epiteliales alcanzan la confluencia en la superficie del sustituto estromal (alrededor de una semana).

5- Exponer la superficie epitelial al aire (técnica aire líquido) manteniendo el sustituto estromal sumergido en medio de cultivo para promover la estratificación y la maduración del epitelio corneal (alrededor de una semana).

6- Extraer el producto de córnea humana artificial de la superficie de cultivo y proceder a su deshidratación parcial depositando el mismo sobre un papel de filtro estéril de 3-5 mm de espesor colocado sobre una superficie plana de vidrio estéril. Colocar un fragmento de tul o tela porosa de nylon esterilizada con alcohol 70% sobre la superficie del sustituto corneal para evitar que la capa epitelial del sustituto corneal se adhiera al papel de filtro. Tras ello, colocar un segundo papel de filtro estéril de 3-5 mm de grosor sobre el sustituto corneal cubierto por tela. Depositar un fragmento plano de vidrio estéril en su superficie y colocar un objeto de aproximadamente 250 g de peso sobre éste (Figura 1). Todo el proceso se ha de llevar a cabo en campana de flujo laminar a temperatura ambiente durante 10 minutos. El objetivo de este proceso es reducir significativamente los niveles de hidratación del producto para alcanzar niveles óptimos de consistencia y elasticidad.

Evaluación de los productos corneales (Figura 4)

1) Análisis microscópico e inmunohistoquímico de los productos corneales (control de calidad histológico) (Figura 4A)

El análisis microscópico reveló que los productos corneales generados mediante ingeniería tisular eran estructuralmente análogos a las córneas nativas utilizadas como control. En concreto, se pudo apreciar un epitelio corneal bien formado, con abundantes uniones intercelulares y un estroma compuesto por numerosas fibras de fibrina entre las que se disponían los queratocitos. Todo ello sugiere que los productos corneales artificiales bi o trilaminares construidos en base al protocolo arriba expuesto, son compatibles con córneas humanas y animales ortotípicas.

En lo que respecta a la estructura del epitelio de los productos corneales, es de destacar el hecho de que todas las células del epitelio expresaron elevados niveles de citoqueratinas típicas y exclusivas del epitelio corneal (CK3 y CK12), lo cual sugiere que estas células podrían ser funcionales *in vitro*. Del mismo modo, el análisis de proteínas relacionadas con uniones intercelulares reveló la expresión secuencial de diversos componentes de los desmosomas (placoglobina, desmogleína 3 y desmoplaquina), las uniones estrechas (ZO-1 y ZO-2) y las uniones comunicantes gap (conexina 37) a nivel epitelial, siendo todo ello similar a la córnea nativa normal.

2) Control de calidad reológico (Figura 4B)

El análisis de las propiedades mecánicas de los productos corneales artificiales bi o trilaminares construidos en base al protocolo arriba expuesto mostró un comportamiento viscoelástico de dichos tejidos, con un módulo de elasticidad creciente en las córneas con mayor contenido en agarosa y un punto de fractura significativamente menor cuando la agarosa se utilizó a menores concentraciones. Los análisis de viscosimetría y punto de fractura revelaron que las características físicas de los productos de fibrina y agarosa eran superiores a aquéllos que sólo contenían fibrina o colágeno. Todo ello sugiere que las propiedades físicas de las córneas de fibrina y agarosa son óptimas y, en parte, similares a las de las córneas humanas normales utilizadas como control.

3) Control de calidad óptico (Figura 4C)

Las propiedades ópticas de los productos corneales artificiales fueron adecuadas para un tejido que ha de cumplir las funciones de la córnea humana o animal. En concreto, los análisis de transmitancia espectral mostraron que los

productos corneales tendían a mostrar niveles muy adecuados de transparencia, comparables a los de la córnea humana normal, con niveles de scattering muy similares. Además, los coeficientes de absorción, dispersión y extinción de los productos de fibrina y agarosa fueron superiores que aquéllos obtenidos con los tejidos de fibrina. Sin embargo, la absorbancia para longitudes de onda pequeñas (rango de los ultravioletas) fue menor en los productos corneales artificiales bi o trilaminares que en los controles, lo cual sugiere la necesidad de utilizar filtros para la luz ultravioleta en este tipo de productos. En suma, la translucidez de los productos corneales fue aceptable, especialmente en aquellos productos cuyo espesor no superaba los 0,7 mm.

4) Control de calidad genético (Figura 4C y 4D)

Para el análisis de expresión génica se extrajo el ARN total de los cultivos corneales primarios de células epiteliales y queratocitos estromales humanos y de los productos corneales artificiales bilaminares humanos, analizándose éste mediante microarray (Affymetrix Human Genome U133 plus 2.0®). Este análisis demostró que los genes que se expresaban en los productos corneales artificiales humanos eran compatibles con una función corneal normal, aunque numerosos genes relacionados con el desarrollo tisular estaban sobreexpresados en relación con la córnea normal. En concreto, los productos corneales artificiales expresaron un gran número de genes cuya función se centraba en el establecimiento de uniones intercelulares (conexinas, integrinas, desmoplaquina, placoglobina, etc.), desarrollo epitelial (Sema3A, RUNX2, TBX1), diferenciación celular (PLXNA4A, FLG, DKK4, DCN), membrana basal (lamininas, colágeno IV), matriz extracelular (colágenos, decorina, biglicán, MMP, fibronectina), etc. Estos resultados sugieren que los productos corneales construidos podrían estar experimentando un proceso de desarrollo similar al que ocurre en la córnea normal y que las funciones génicas expresadas por estos productos son compatibles con la normalidad.

5) Evaluación *in vivo* (Figura 4E)

Para evaluar el comportamiento clínico de los productos corneales artificiales, se procedió al implante de 6 córneas humanas bilaminares de espesor parcial en conejos de laboratorio y a su seguimiento evolutivo durante 6 meses. Los resultados de este ensayo muestran adecuados niveles de biocompatibilidad, con total ausencia de inflamación o infección, manteniendo buenos niveles de transparencia. Todo esto sugiere que los productos corneales generados mediante ingeniería tisular podrían presentar utilidad potencial desde un punto de vista clínico y farmacológico experimental.

Ejemplo 4

Elaboración de un producto de uretra humana artificial

Protocolo de elaboración de un producto de uretra humana artificial

A.- Obtención de muestras de uretra humana

Para la generación de uretras artificiales, se utilizan pequeñas biopsias de uretra humana normal obtenidas mediante endoscopia de pacientes o donantes normales. Una vez obtenida la muestra de forma estéril, los tejidos extraídos serán introducidos inmediatamente en medio de transporte estéril constituido por medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con antibióticos (500 U/ml de penicilina G y 500 µg/ml de estreptomicina) y antimicóticos (1,25 µg/ml de anfotericina B) para evitar una eventual contaminación de la muestra.

Alternativamente, en los casos en los que no es factible la toma de muestras de uretra humana, se pueden utilizar muestras de mucosa oral o de piel para la generación de sustitutos de la uretra.

B.- Generación de cultivos primarios de células estromales y epiteliales

Transcurrido el periodo de transporte, todas las muestras deberán ser lavadas dos veces en una solución estéril de PBS con penicilina, estreptomicina y anfotericina B (500 U/ml, 500 µg/ml y 1,25 µg/ml, respectivamente) para eliminar todos los restos de sangre, fibrina, grasa o materiales extraños que pudieran encontrarse adheridos a las muestras.

En primer lugar, para separar el estroma del epitelio, las muestras se incuban a 37°C en una solución estéril con tripsina 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l en PBS, recogiendo el sobrenadante con las células tras 30 minutos mediante centrifugación. Este proceso se repite hasta 5 veces añadiendo nueva solución de tripsina-EDTA cada vez. De este modo, se consigue una cantidad apreciable de células epiteliales de la uretra, las cuales se cultivan en medio de cultivo de células epiteliales, el cual favorece preferentemente el crecimiento de las células epiteliales sobre los fibroblastos. Este medio está compuesto por 3 partes de medio DMEM rico en glucosa y una parte de medio Ham F-12, todo ello suplementado con un 10% de suero bovino fetal, antibióticos-antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B), 24 µg/ml de adenina y distintos factores de crecimiento: 0,4 µg/ml de hidrocortisona, 5 µg/ml de insulina, 10 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF), 1,3 ng/ml de triyodotironina y 8 ng/ml de toxina colérica.

Para llevar a cabo la digestión de la matriz extracelular del estroma uretral y conseguir la separación de los fibroblastos estromales incluidos en dicha matriz, las muestras deben ser incubadas a 37°C en una solución estéril de

colagenasa tipo I de *Clostridium histolyticum* a 2 mg/ml en medio de cultivo DMEM sin suero bovino fetal durante 6 horas. Esta solución es capaz de digerir el colágeno de la dermis y liberar los fibroblastos estromales. Para la obtención de cultivos primarios de fibroblastos, se debe centrifugar a 1.000 rpm durante 10 minutos la solución de digestión que contiene las células estromales disgregadas de la dermis y el pellet celular correspondiente a los fibroblastos se cultiva en frascos de cultivo de 15 cm² de superficie. Como medio de cultivo, se utiliza DMEM enriquecido en glucosa suplementado con antibióticos y antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B) y suero bovino fetal (SBF) al 10%. A este medio básico de cultivo lo denominamos medio de fibroblastos.

En todos los casos, las células serán incubadas a 37°C con un 5% de dióxido de carbono, en condiciones estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada tres días.

C.- Construcción de productos de uretra humana artificial basados en fibrina y agarosa mediante ingeniería tisular

1- Generación de sustitutos estromales con fibroblastos inmersos en su espesor utilizando matrices extracelulares de fibrina y agarosa. Estos sustitutos estromales se generarán directamente sobre placas de Petri para cultivo celular. Para preparar 10 ml de sustituto estromal se procederá del siguiente modo:

- Obtención de 7,6 ml de plasma sanguíneo humano procedente de donación (posibilidad de origen autólogo).

- Adición de 150.000 fibroblastos de la uretra humana previamente cultivados y resuspendidos en 750 µl de medio de cultivo DMEM.

- Adición de 150 µl de ácido tranexámico para evitar la fibrinólisis del gel de fibrina.

- Adición de 1 ml de ClCa₂ al 1% para inducir la reacción de coagulación y generar una red de fibras de fibrina.

- Adición rápida de 0,5 ml de agarosa tipo VII al 2% disuelta en PBS y calentada hasta alcanzar el punto de fusión y mezclado suave mediante agitación. La concentración final de agarosa en la mezcla será del 0,1%. El rango de concentraciones de agarosa que permite productos dérmicos viables oscila entre y 0,025% y 0,3% y deberá establecerse en relación con el paciente objeto de su utilización.

- Alicuotar lo antes posible en las placas de Petri de cultivo celular.

- Dejar polimerizar en reposo durante al menos 30 min.

2- Desarrollo de una capa de epitelio (epidermis) en la superficie del sustituto dérmico mediante subcultivo de las células epiteliales sobre el sustituto estromal. Cubrir con medio de cultivo específico para células epiteliales.

3- Mantener en incubador a 37°C con un 5% de CO₂ en ambiente húmedo siguiendo protocolos estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada 3 días hasta que las células epiteliales alcanzan la confluencia en la superficie del sustituto dérmico (alrededor de una semana).

4- Extraer el producto de uretra humana artificial de la superficie de cultivo y proceder a su deshidratación parcial depositando el mismo sobre un papel de filtro estéril de 3-5 mm de espesor colocado sobre una superficie plana de vidrio estéril. Colocar un fragmento de tul o tela porosa de nylon esterilizada con alcohol 70% sobre la superficie del sustituto estromal para evitar que la capa epitelial del sustituto uretral se adhiera al papel de filtro. Tras ello, colocar un segundo papel de filtro estéril de 3-5 mm de grosor sobre el sustituto estromal cubierto por tela. Depositar un fragmento plano de vidrio estéril en su superficie y colocar un objeto de aproximadamente 250 g de peso sobre éste (Figura 1). Todo el proceso se ha de llevar a cabo en campana de flujo laminar a temperatura ambiente durante 10 minutos. El objetivo de este proceso es reducir significativamente los niveles de hidratación del producto para alcanzar niveles óptimos de consistencia y elasticidad.

5- Una vez deshidratado el tejido, cortar a medida el sustituto uretral y enrollarlo sobre sí mismo, procediendo a suturarlo con hilo de sutura quirúrgica monofilamento. De este modo, se consigue un sustituto de la uretra con forma tubular muy similar a la uretra humana nativa. Hemos de destacar que el deshidratado del tejido resulta en adecuados niveles de consistencia y elasticidad, permitiendo llevar a cabo el enrollamiento y la sutura sin ninguna dificultad.

Evaluación del producto de uretra humana artificial (Figura 5)

1) Análisis microscópico del producto de uretra artificial humana (control de calidad histológico) (Figura 5A)

La evaluación de los productos de uretra artificial reveló que la estructura de éstos presentaba numerosas similitudes con la uretra humana nativa normal. En concreto, el análisis de muestras mantenidas en cultivo durante cuatro semanas reveló la formación de un epitelio pavimentoso estratificado en la superficie del estroma artificial y la generación de un estroma denso, rico en fibras, en el que las células estromales proliferaban activamente. Todo ello sugiere que la estructura de la uretra artificial era análoga a la de la uretra nativa normal.

En aquellos casos en los que se utilizaron células de la mucosa oral, se obtuvieron sustitutos estromales muy similares a los obtenidos a partir de células uretrales.

2) Análisis inmunohistoquímico del producto de uretra artificial humana (Figura 5B)

El análisis de la expresión de citoqueratinas de los controles de uretra normal y los productos de uretra artificial obtenidos en el laboratorio, demostró la expresión de integrinas por parte del epitelio uretral artificial, lo cual sugiere que este epitelio es plenamente funcional y podría ser utilizado para la sustitución de la uretra humana.

Ejemplo 5

Elaboración de un producto de vejiga urinaria artificial

Protocolo de fabricación de un producto de vejiga urinaria humana artificial

A.- Obtención de muestras de vejiga urinaria humana

Para la generación de sustitutos artificiales de la vejiga urinaria, se utilizan pequeñas biopsias de la vejiga humana normal obtenidas mediante endoscopia de pacientes o donantes normales. Una vez obtenida la muestra de forma estéril, los tejidos extraídos serán introducidos inmediatamente en medio de transporte estéril constituido por medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con antibióticos (500 U/ml de penicilina G y 500 µg/ml de estreptomycin) y antimicóticos (1,25 µg/ml de anfotericina B) para evitar una eventual contaminación de la muestra.

Alternativamente, en los casos en los que no es factible la toma de muestras de vejiga humana, se pueden utilizar muestras de mucosa oral o de piel para la generación de sustitutos vesicales.

B.- Generación de cultivos primarios de células estromales y epiteliales

Transcurrido el periodo de transporte, todas las muestras deberán ser lavadas dos veces en una solución estéril de PBS con penicilina, estreptomycin y anfotericina B (500 U/ml, 500 µg/ml y 1,25 µg/ml, respectivamente) para eliminar todos los restos de sangre, fibrina, grasa o materiales extraños que pudieran encontrarse adheridos a las muestras.

En primer lugar, para separar el estroma del epitelio, las muestras se incuban a 37°C en una solución estéril con tripsina 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l en PBS, recogiendo el sobrenadante con las células tras 30 minutos mediante centrifugación. Este proceso se repite hasta 5 veces añadiendo nueva solución de tripsina-EDTA cada vez. De este modo, se consigue una cantidad apreciable de células epiteliales de la vejiga, las cuales se cultivan en medio de cultivo de células epiteliales, el cual favorece preferentemente el crecimiento de las células epiteliales sobre los fibroblastos. Este medio está compuesto por 3 partes de medio DMEM rico en glucosa y una parte de medio Ham F-12, todo ello suplementado con un 10% de suero bovino fetal, antibióticos-antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycin y 0,25 µg/ml de anfotericina B), 24 µg/ml de adenina y distintos factores de crecimiento: 0,4 µg/ml de hidrocortisona, 5 µg/ml de insulina, 10 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF), 1,3 ng/ml de triyodotironina y 8 ng/ml de toxina colérica.

Para llevar a cabo la digestión de la matriz extracelular del estroma vesical y conseguir la separación de los fibroblastos estromales incluidos en dicha matriz, las muestras deben ser incubadas a 37°C en una solución estéril de colagenasa tipo I de *Clostridium histolyticum* a 2 mg/ml en medio de cultivo DMEM sin suero bovino fetal durante 6 horas. Esta solución es capaz de digerir el colágeno del estroma y liberar los fibroblastos inmersos en éste. Para la obtención de cultivos primarios de fibroblastos, se debe centrifugar a 1.000 rpm durante 10 minutos la solución de digestión que contiene las células estromales disgregadas y el pellet celular correspondiente a los fibroblastos se cultiva en frascos de cultivo de 15 cm² de superficie. Como medio de cultivo, se utiliza DMEM enriquecido en glucosa suplementado con antibióticos y antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycin y 0,25 µg/ml de anfotericina B) y suero bovino fetal (SBF) al 10%. A este medio básico de cultivo lo denominamos medio de fibroblastos.

En todos los casos, las células serán incubadas a 37°C con un 5% de dióxido de carbono, en condiciones estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada tres días.

C.- Construcción de productos de vejiga urinaria humana artificial basados en fibrina y agarosa mediante ingeniería tisular

1- Generación de sustitutos estromales con fibroblastos inmersos en su espesor utilizando matrices extracelulares de fibrina y agarosa. Estos sustitutos estromales se generarán directamente sobre placas de Petri para cultivo celular. Para preparar 10 ml de sustituto estromal se procederá del siguiente modo:

- Obtención de 7,6 ml de plasma sanguíneo humano procedente de donación (posibilidad de origen autólogo).

- Adición de 150.000 fibroblastos de la vejiga humana previamente cultivados y resuspendidos en 750 μ l de medio de cultivo DMEM.

- Adición de 150 μ l de ácido tranexámico para evitar la fibrinólisis del gel de fibrina.

- Adición de 1 ml de ClCa_2 al 1% para inducir la reacción de coagulación y generar una red de fibras de fibrina.

- Adición rápida de 0,5 ml de agarosa tipo VII al 2% disuelta en PBS y calentada hasta alcanzar el punto de fusión y mezclado suave mediante agitación. La concentración final de agarosa en la mezcla será del 0,1%. El rango de concentraciones de agarosa que permite productos dérmicos viables oscila entre y 0,025% y 0,3% y deberá establecerse en relación con el paciente objeto de su utilización.

- Alicuotar lo antes posible en las placas de Petri de cultivo celular.

- Dejar polimerizar en reposo durante al menos 30 min.

2- Desarrollo de una capa de epitelio (urotelio) en la superficie del sustituto estromal mediante subcultivo de las células epiteliales sobre este sustituto. Cubrir con medio de cultivo específico para células epiteliales.

3- Mantener en incubador a 37°C con un 5% de CO_2 en ambiente húmedo siguiendo protocolos estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renuevan cada 3 días hasta que las células epiteliales alcanzan la confluencia en la superficie del sustituto dérmico (alrededor de una semana).

4- Extraer el producto de vejiga humana artificial de la superficie de cultivo y proceder a su deshidratación parcial depositando el mismo sobre un papel de filtro estéril de 3-5 mm de espesor colocado sobre una superficie plana de vidrio estéril. Colocar un fragmento de tul o tela porosa de nylon esterilizada con alcohol 70% sobre la superficie del sustituto estromal para evitar que la capa epitelial del sustituto vesical se adhiera al papel de filtro. Tras ello, colocar un segundo papel de filtro estéril de 3-5 mm de grosor sobre el sustituto estromal cubierto por tela. Depositar un fragmento plano de vidrio estéril en su superficie y colocar un objeto de aproximadamente 250 g de peso sobre éste (Figura 1). Todo el proceso se ha de llevar a cabo en campana de flujo laminar a temperatura ambiente durante 10 minutos. El objetivo de este proceso es reducir significativamente los niveles de hidratación del producto para alcanzar niveles óptimos de consistencia y elasticidad.

5- Una vez deshidratado el tejido, cortar a medida el sustituto vesical y suturarlo sobre sí mismo dándole la forma deseada, utilizando hilo de sutura quirúrgica monofilamento. Hemos de destacar que el deshidratado del tejido resulta en adecuados niveles de consistencia y elasticidad, permitiendo llevar a cabo la sutura sin ninguna dificultad.

Evaluación del producto de vejiga urinaria humana artificial (Figura 6)

1) *Análisis microscópico e inmunohistoquímico del producto de vejiga artificial humana (control de calidad histológico) (Figuras 6A y 6B)*

La evaluación de los productos de vejiga artificial reveló que la estructura de éstos presentaba numerosas similitudes con la vejiga humana nativa normal. En concreto, el análisis de muestras mantenidas en cultivo durante cuatro semanas reveló la formación de un epitelio simple cúbico o pavimentoso en la superficie del estroma artificial y la generación de un estroma denso, rico en fibras, en el que las células estromales proliferaban activamente (Figura 6A).

El análisis inmunohistoquímico reveló que estos tejidos expresaban citoqueratina 13 y pancitoqueratina, al igual que los tejidos de vejiga humana control normal, así como citoqueratinas 7 y 8, típicas de tejidos embrionarios o en proceso de maduración (Figura 6B). Todo ello sugiere que la estructura de la vejiga artificial era análoga a la de la vejiga nativa normal.

En aquellos casos en los que se utilizaron células de la mucosa oral, se obtuvieron sustitutos estromales muy similares a los obtenidos a partir de células vesicales.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* de preparación de un tejido artificial que comprende:

- a) añadir una composición que comprende fibrinógeno a una muestra de células aisladas,
- b) añadir un agente antifibrinolítico 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 de un polisacárido al producto resultante del paso (c)
- e) cultivar células aisladas en o sobre el producto resultante del paso (d), y
- f) inducir la nanoestructuración del producto resultante del paso (e).

2. Método según la reivindicación 1 donde la inducción de la nanoestructuración del paso (f) comprende la deshidratación y/o la compresión mecánica del producto resultante del paso (e).

3. Método según la reivindicación 2 donde la deshidratación del producto resultante del paso (e) comprende un procedimiento seleccionado de la lista que comprende: drenaje, evaporación, succión, presión capilar, ósmosis o electro-ósmosis.

4. Método según la reivindicación 3 donde la deshidratación del producto resultante del paso (e) comprende la aplicación de un material absorbente sobre el producto resultante del paso (e).

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 donde la compresión mecánica del paso (f) comprende un procedimiento seleccionado de la lista que comprende: aplicación de una carga estática, aplicación de un hidráulico, aplicación de una leva, aplicación de uno o más rodillos, aplicación de un globo, extrusión o centrifugación.

6. Método según la reivindicación 5 donde la aplicación de una carga estática del paso (f) comprende la colocación de un peso sobre el producto resultante del paso (e).

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que además comprende un paso entre el paso (b) y el paso (c) en el que se añade una proteína.

8. Método según la reivindicación 7 donde la proteína es fibronectina.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde entre el paso (e) y el paso (f) hay un paso adicional en el que el producto resultante del paso (e) se expone al aire.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde la composición que contiene fibrinógeno del paso (a) es plasma sanguíneo.

11. Método según la reivindicación 10 donde el plasma sanguíneo es de origen autólogo.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde el agente antifibrinolítico del paso (b) es ácido tranexámico.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 donde la fuente de calcio del paso (c) es una sal de calcio.

14. Método según la reivindicación 13 donde la sal de calcio del paso (c) es cloruro cálcico.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 donde el polisacárido del paso (d) es agarosa.

16. Método según la reivindicación 15 donde la agarosa es de tipo VII.

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 donde las células del paso (a) son fibroblastos o queratocitos.

18. Método según la reivindicación 17 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.

19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 donde las células del paso (e) comprenden células madre del cordón umbilical.

20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 donde las células del paso (e) comprenden células epiteliales.

21. Método según la reivindicación 20 donde las células epiteliales del paso (e) se seleccionan de la lista que comprende: queratinocitos, células del urotelio, células del epitelio de la uretra, células del epitelio corneal o células del epitelio de la mucosa oral.

22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 donde las células del paso (a) y/o las células del paso (e) son de origen autólogo.

23. Tejido artificial obtenible por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22.

24. Uso del tejido artificial según la reivindicación 23 para la evaluación de un producto farmacológico y/o químico.

25. Uso del tejido artificial según la reivindicación 23 para la elaboración de un medicamento.

26. Uso del tejido artificial según la reivindicación 25 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.

27. Uso del tejido artificial según la reivindicación 26 donde el tejido o el órgano dañado se selecciona de la lista que comprende: piel, vejiga, uretra, córnea, mucosa oral, conjuntiva, pared abdominal, tímpano, faringe, laringe, intestino, peritoneo, ligamento, tendón, hueso, meninge o vagina.

28. Uso del producto de tejido artificial según la reivindicación 27 donde la piel está 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.

29. Uso del producto de tejido artificial según la reivindicación 27 donde la vejiga está 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, una vejiga neurógena, una incontinencia urinaria, una disfunción vesical o una litiasis vesical.

30. Uso del producto de tejido artificial según la reivindicación 27 donde la uretra está 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 o una estenosis.

31. Uso del producto de tejido artificial según la reivindicación 27 donde la córnea está 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 queratoglobos, un descematocele, un traumatismo, una causticación, una insuficiencia límica, 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.

32. Composición farmacéutica que comprende el tejido artificial según la reivindicación 23.

33. Composición farmacéutica según la reivindicación 32 que comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

34. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 32 ó 33 que comprende, además, otro principio activo.

FIG.1

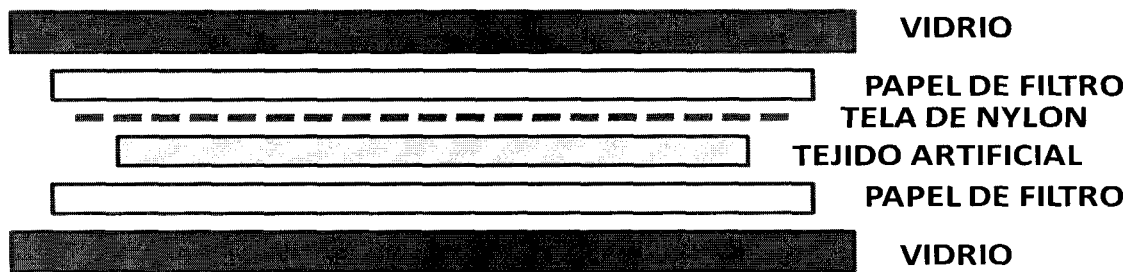
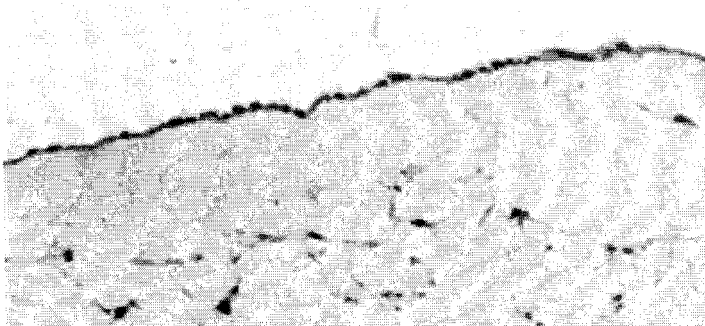
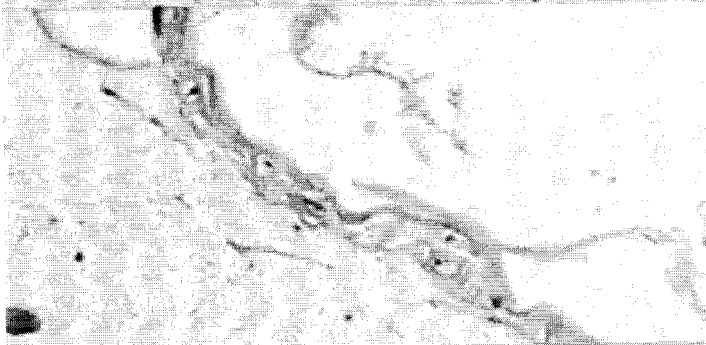


FIG.2A

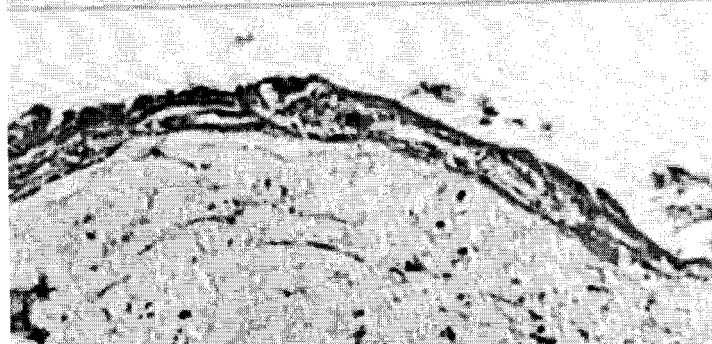
1ª semana



2ª semana



3ª semana



4ª semana

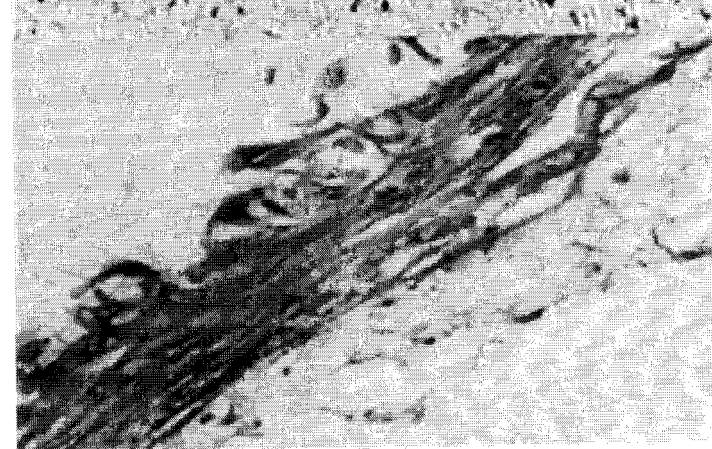


FIG.2B

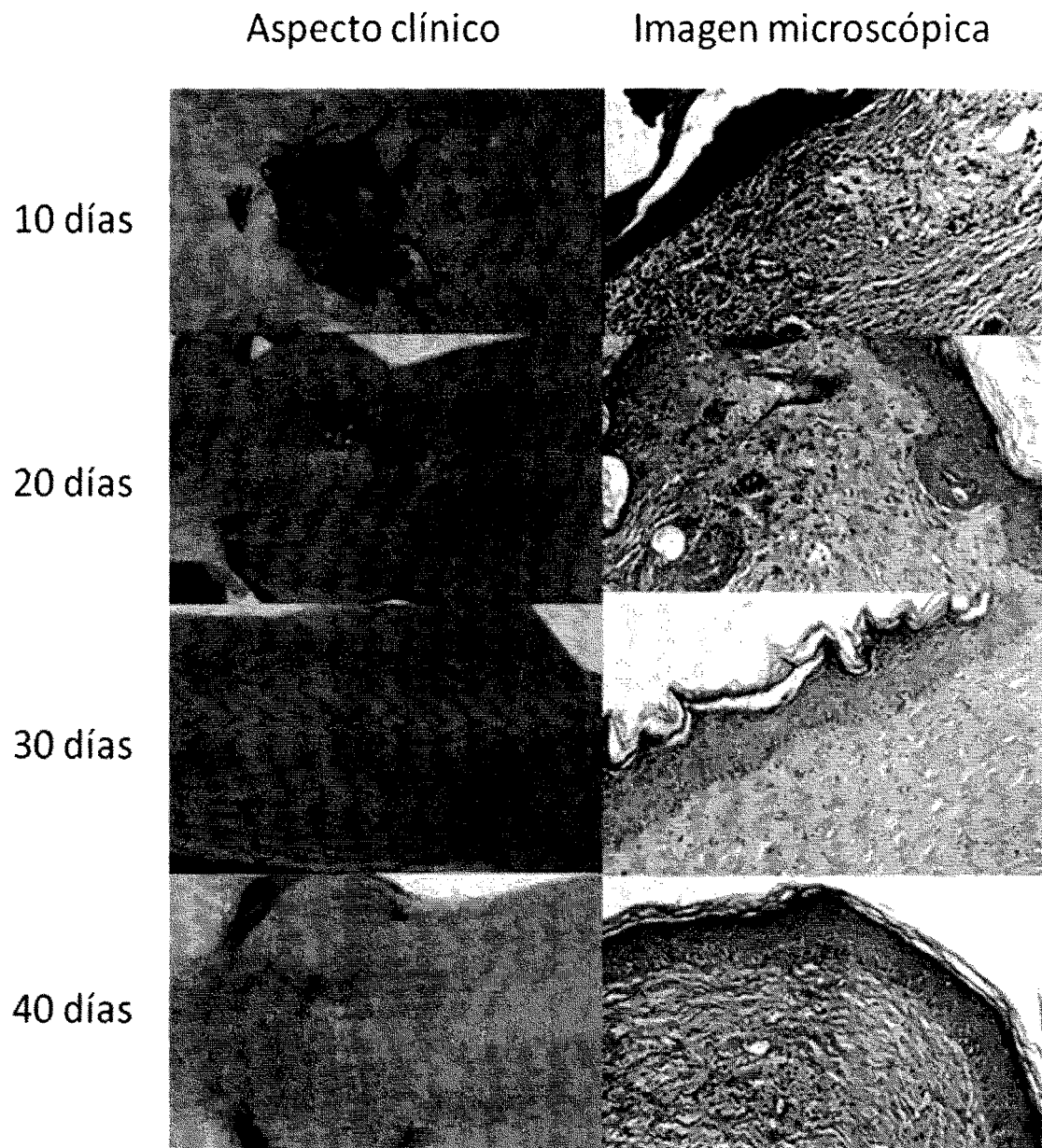


FIG.2C

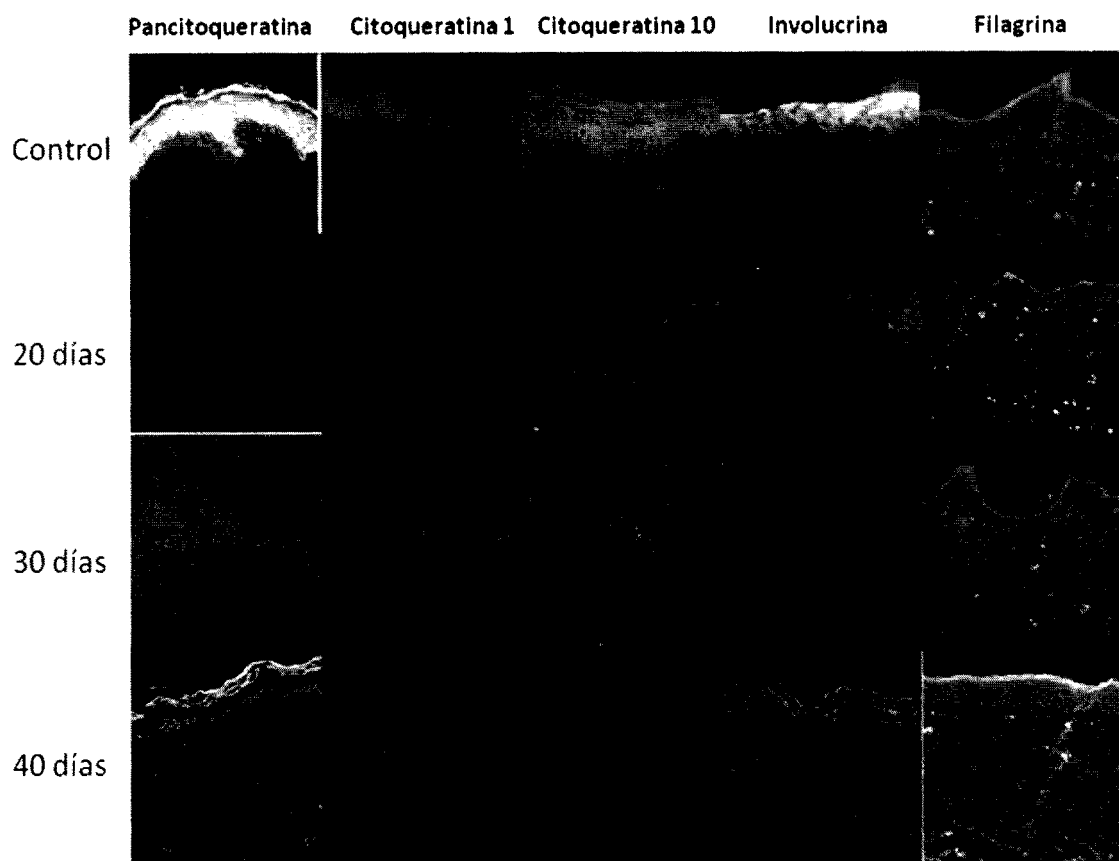


FIG.3A

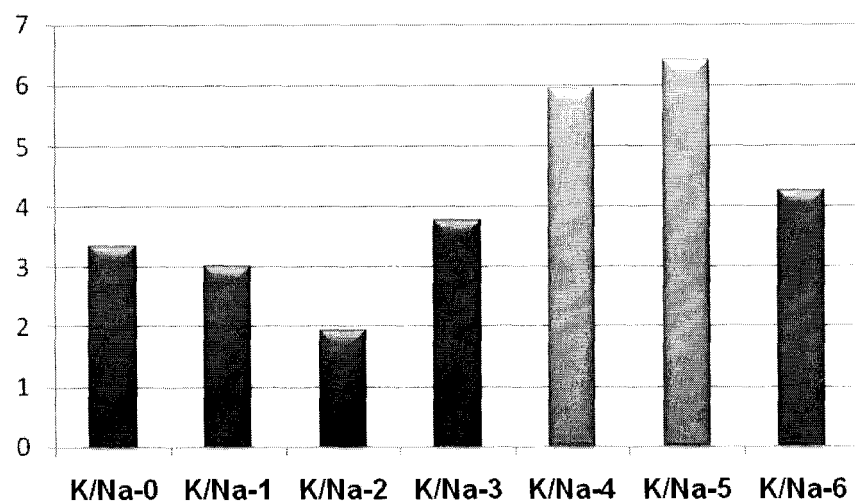


FIG.3B

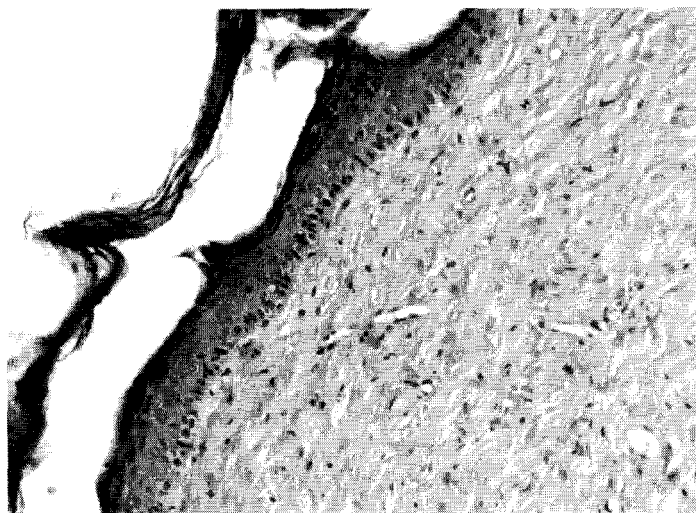


FIG.3C

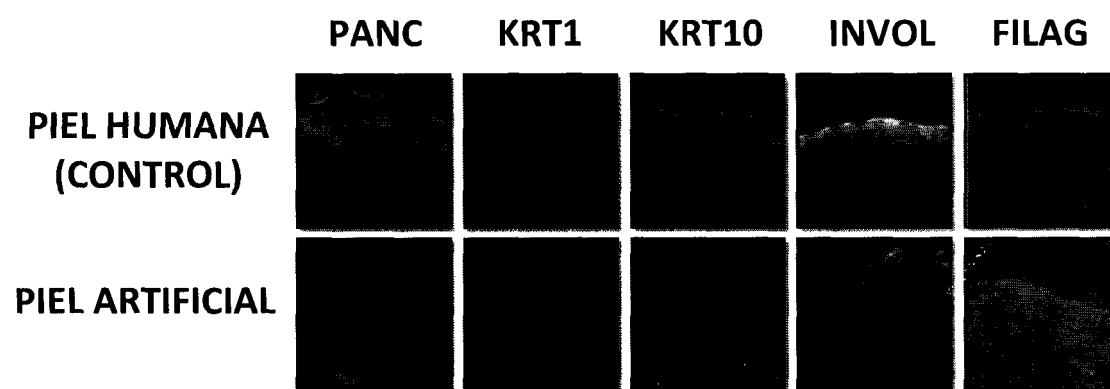


FIG.4A

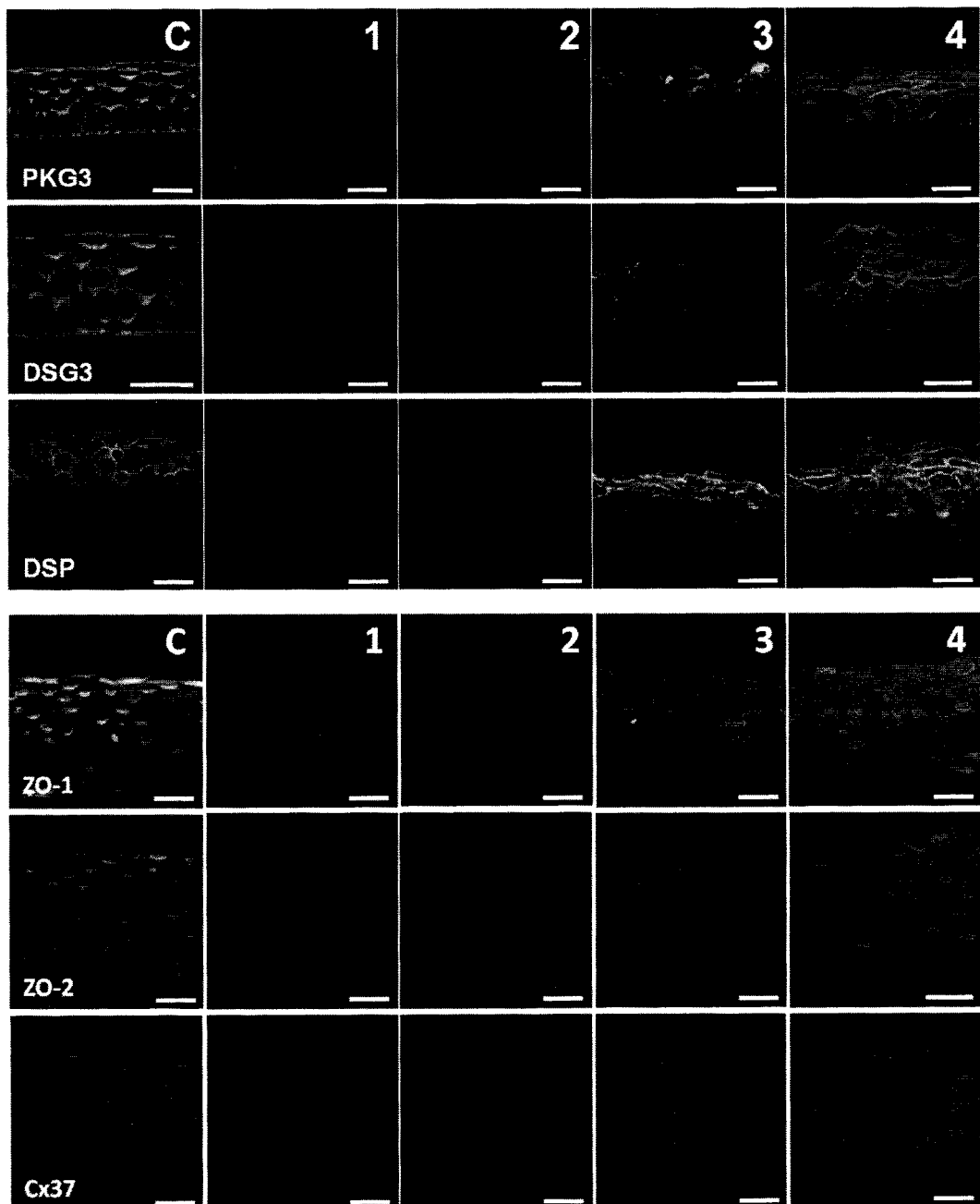
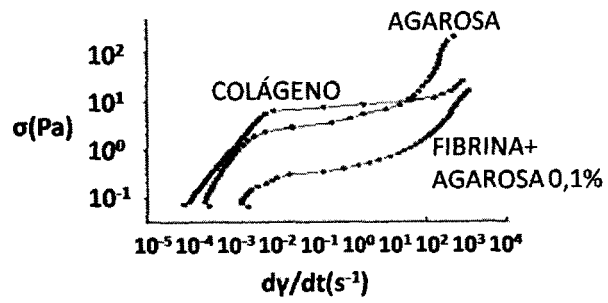


FIG.4B

PUNTO DE FRACTURA



VISCOSIDAD

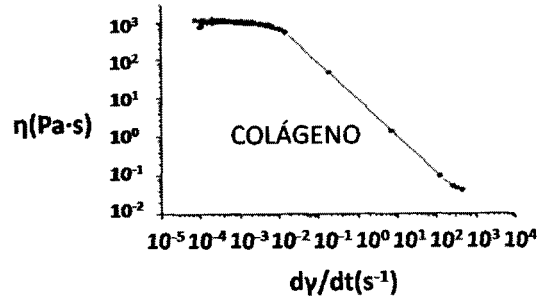
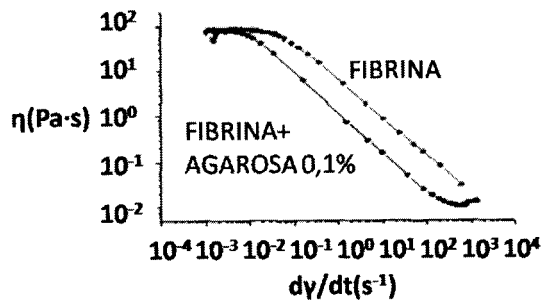


FIG.4C

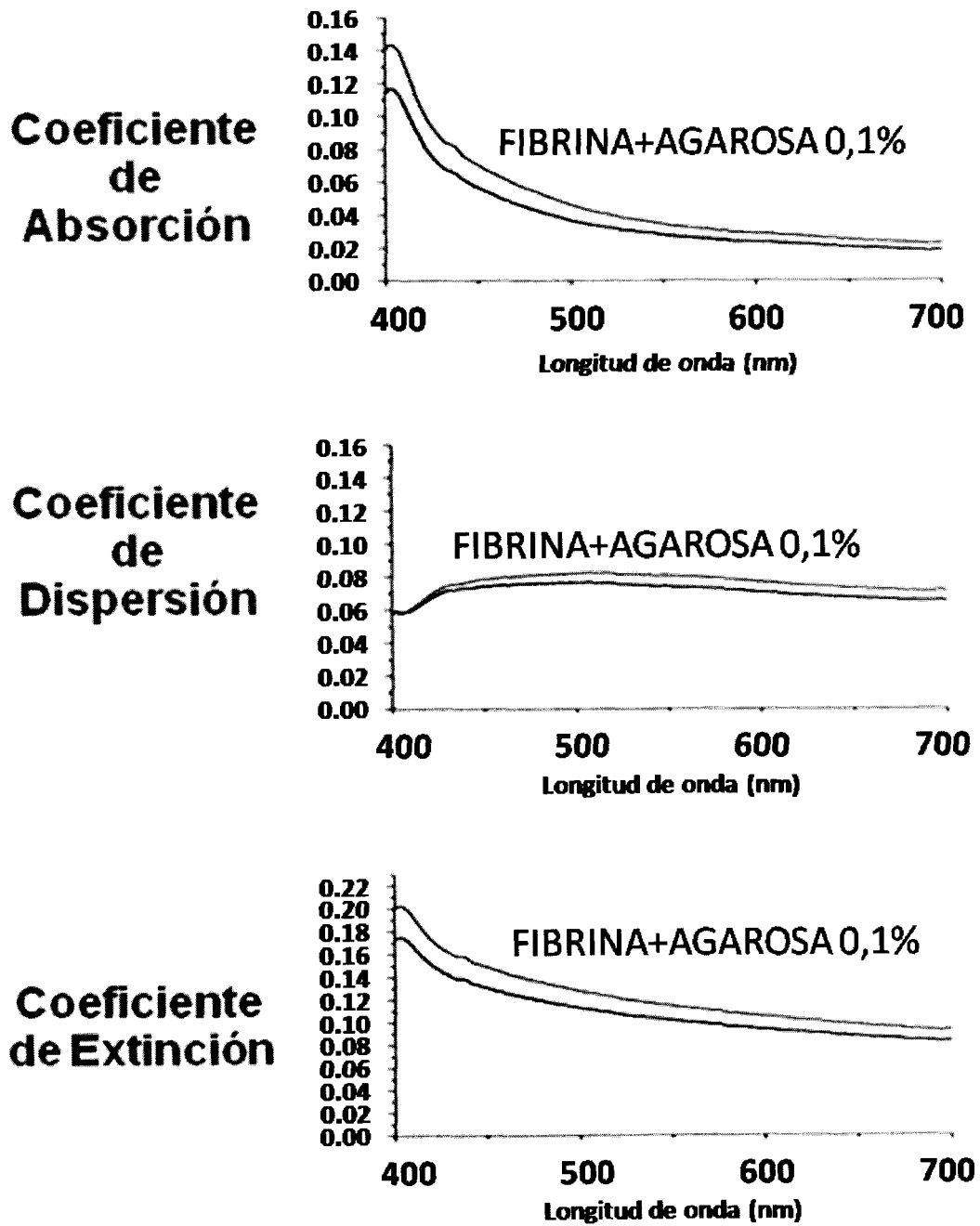


FIG.4D

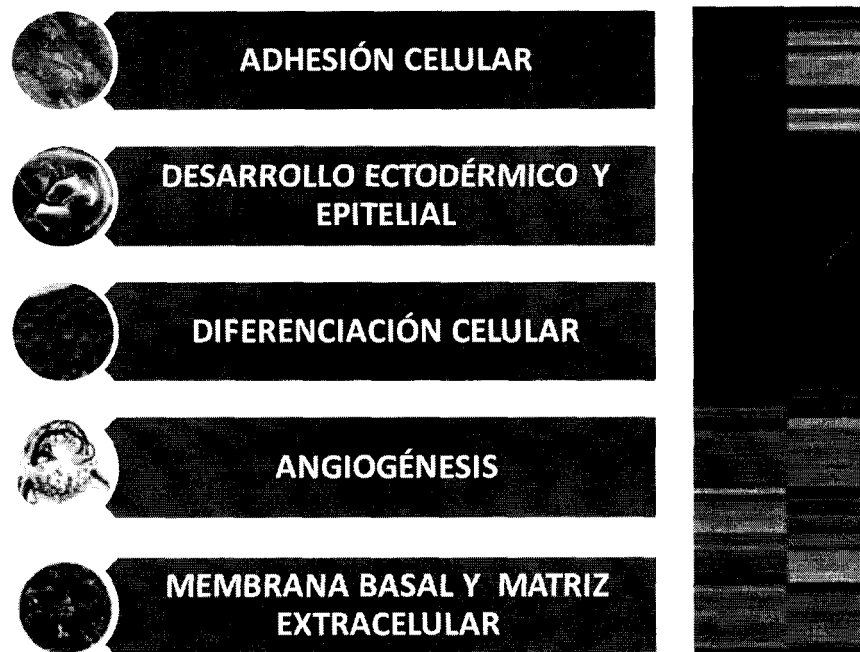


FIG.4E

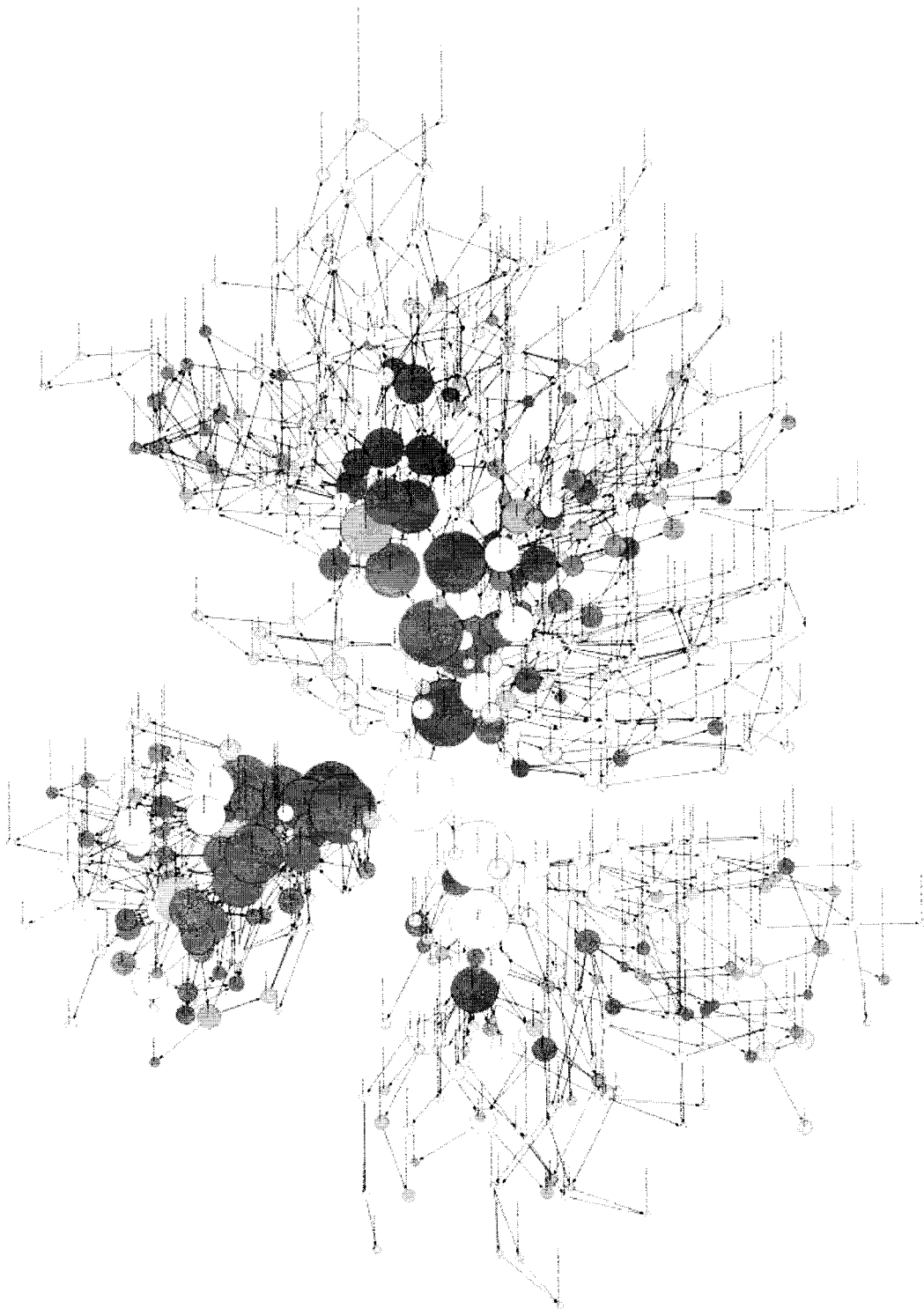


FIG.4F

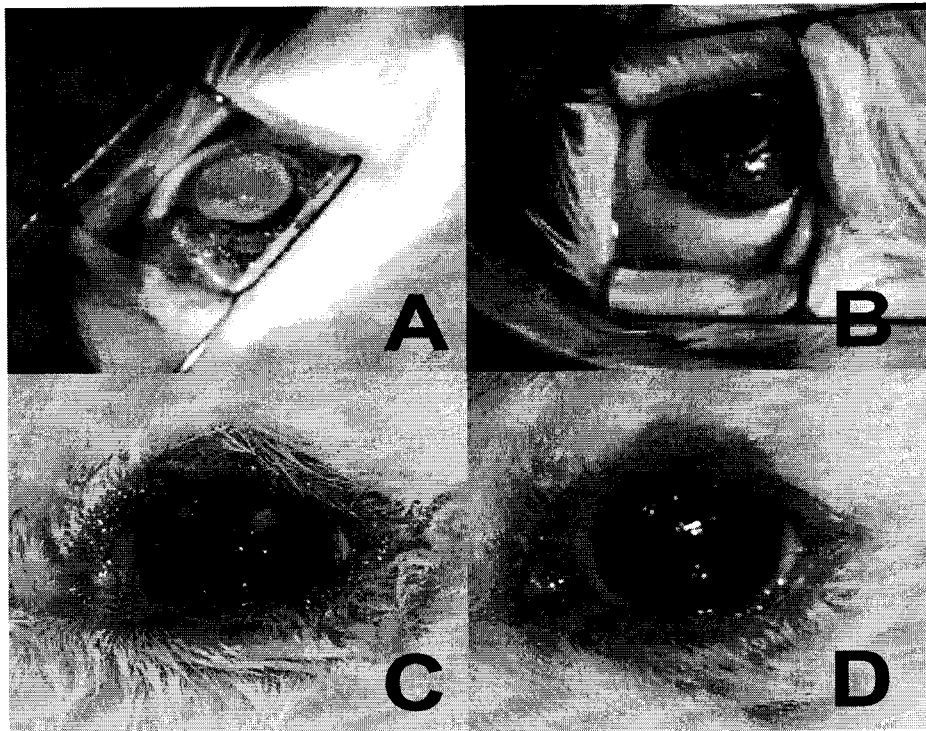


FIG.5A



FIG.5B



FIG.6A

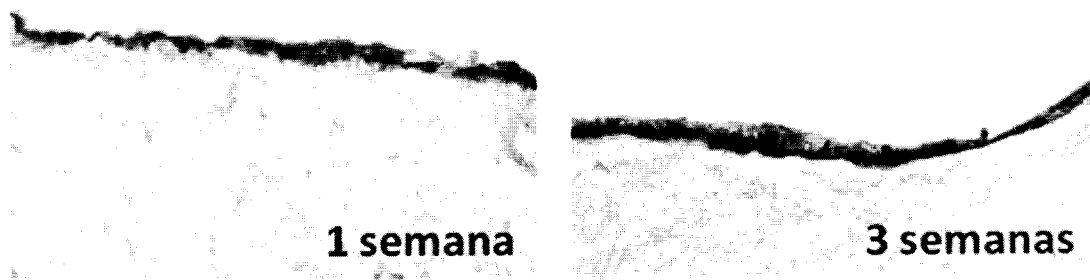
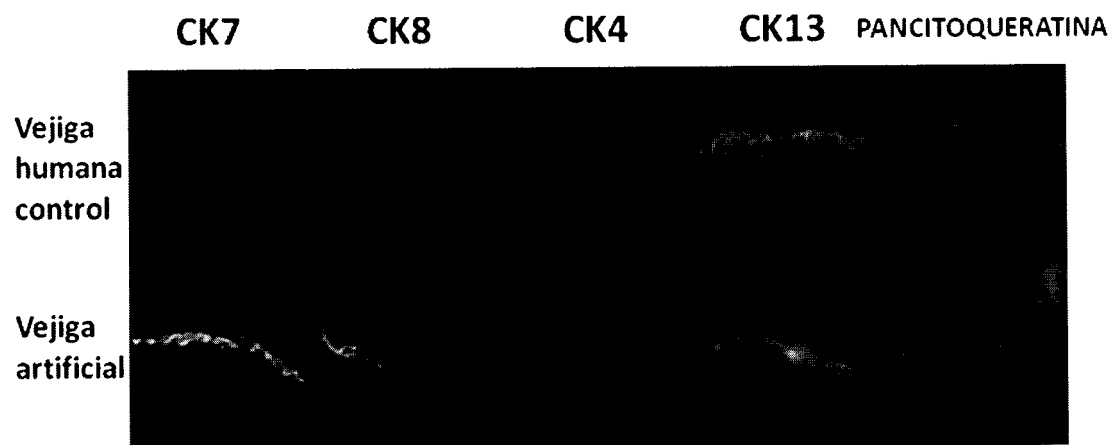


FIG.6B





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930625

②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.08.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	ALAMINOS, M., <i>et al.</i> Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. Investigative ophthalmology & visual science. Agosto 2006 . Vol 47, nº 8, páginas 3311-3317. ISSN 0146-0404. Ver todo el documento, especialmente el apartado 4 de Materiales y Métodos.	1
Y	FRISMAN, I., <i>et al.</i> Nanostructuring of PEG-fibrinogen polymeric scaffolds. Acta biomaterialia. 15.07.2009 (en línea). Vol. 6, nº 7, páginas 2518-2524. ISSN 1878-7568 (Electrónico). Ver todo el documento.	1
Y	SANCHEZ-QUEVEDO, M. C., <i>et al.</i> Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. Histology and histopathology. Junio 2007. Vol. 22, nº 6, páginas 631-640. ISSN 1699-5848 (Electrónico). Ver todo el documento, especialmente los apartados 4 y 5 de Materiales y Métodos.	1
Y	OSATHANON, T., <i>et al.</i> Microporous nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. Octubre 2008. Vol. 29, nº 30, páginas 4091-4099. ISSN 0142-9612. Ver todo el documento, especialmente Resumen y Discusión.	1
Y	GONZÁLEZ-ANDRADES, M., <i>et al.</i> Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. Journal of tissue engineering and regenerative medicine. 05.05.2009 (en línea). Vol. 3, nº 6, páginas 442-449. ISSN 1932-7005 (Electrónico). Ver todo el documento, especialmente Resumen, apartado 1 de Materiales y Métodos, y Discusión.	1
Y	HASHI, C. K., <i>et al.</i> Antithrombogenic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 17.07.2007. Vol. 104, nº 29, páginas 11915-11920. ISSN 0027-8424. Ver todo el documento, especialmente Resumen y Discusión.	1
A	SHIH YU-RU, V., <i>et al.</i> Growth of mesenchymal stem cells on electrospun type I collagen nanofibers. Stem cells (Dayton, Ohio). Noviembre 2006. Vol. 24, nº 11, páginas 2391-2397. ISSN 1066-5099.	
A	AU 2006202156 A8 (DFB PHARMACEUTICALS, INC.). 15.06.2006	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
09.12.2010

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud:200930625

②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.08.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PERKA, C., <i>et al.</i> Joint cartilage repair with transplantation of embryonic chondrocytes embedded in collagen-fibrin matrices. Clinical and experimental rheumatology. Enero 2000. Vol. 18, nº 1, páginas 13-22. ISSN 0392-856X.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
09.12.2010

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
2/6

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N5/071(01.01.2010)**A61L27/38**(01.01.2006)**A61K35/12**(01.01.2006)

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

C12N, A61L, A61K

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.12.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-34	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 2-34	SI
	Reivindicaciones 1	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Alaminos, M., <i>et al.</i> Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. Investigative ophthalmology & visual science. Agosto 2006 . Vol 47, nº 8, páginas 3311-3317. ISSN 0146-0404.	Agosto-2006
D02	Frisman, I., <i>et al.</i> Nanostructuring of PEG-fibrinogen polymeric scaffolds. Acta biomaterialia. 15-07-2009 (en línea). Vol. 6, nº 7, páginas 2518-2524. ISSN 1878-7568 (Electrónico).	15-07-2009
D03	Sanchez-Quevedo, M. C., <i>et al.</i> Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. Histology and histopathology. Junio 2007. Vol. 22, nº 6, páginas 631-640. ISSN 1699-5848 (Electrónico).	Junio-2007
D04	Osathanon, T., <i>et al.</i> Microporous nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. Octubre 2008. Vol. 29, nº 30, páginas 4091-4099. ISSN 0142-9612.	Octubre-2008
D05	González-Andrades, M., <i>et al.</i> Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. Journal of tissue engineering and regenerative medicine. 05-05-2009 (en línea). Vol. 3, nº 6, páginas 442-449. ISSN 1932-7005 (Electrónico).	05-05-2009
D06	Hashi, C. K., <i>et al.</i> Antithrombogenic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 17-07-2007. Vol. 104, nº 29, páginas 11915-11920. ISSN 0027-8424.	17-07-2007
D07	Shih Yu-Ru, V., <i>et al.</i> Growth of mesenchymal stem cells on electrospun type I collagen nanofibers. Stem cells (Dayton, Ohio). Noviembre 2006. Vol. 24, nº 11, páginas 2391-2397. ISSN 1066-5099.	Noviembre-2006
D08	AU 2006202156 A8 (DFB PHARMACEUTICALS, INC.)	15-06-2006
D09	Perka, C., <i>et al.</i> Joint cartilage repair with transplantation of embryonic chondrocytes embedded in collagen-fibrin matrices. Clinical and experimental rheumatology. Enero 2000. Vol. 18, nº 1, páginas 13-22. ISSN 0392-856X.	Enero-2000

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe un método in vitro para preparar un tejido artificial, que consiste en mezclar una muestra de células aisladas (fibroblastos o queratinocitos) con una composición que contiene fibrinógeno (concretamente plasma sanguíneo) con un agente antifibrinolítico (ácido tranexámico), un factor de coagulación, una fuente de calcio, trombina, un polisacárido (agarosa). Sobre esta preparación se crecen células aisladas (células madre de cordón umbilical, o células epiteliales) y se induce la nanoestructuración del producto obtenido. El método contempla también un paso intermedio que de adición de fibronectina tras el agente fibrinolítico. La solicitud reivindica, además del método, el tejido artificial obtenible por dicho método, el uso del mismo para la elaboración de un medicamento, y la composición farmacéutica que contiene el mencionado tejido.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue el método reivindicado, ni el tejido obtenido, ni su uso, por lo que la invención es nueva según el artículo 6 de la Ley de Patentes.

Sin embargo, como se explica a continuación, se han encontrado algunos documentos cuya combinación, obvia para el experto en la materia, afectaría la actividad inventiva de la reivindicación 1 de la solicitud, por lo que esta reivindicación no cumpliría el requisito de actividad inventiva del artículo 8 de la Ley de Patentes.

En el documento D01 se describe la construcción de un sustituto corneal en conejo utilizando un esqueleto de fibrina y agarosa preparado con el método de la reivindicación 1 de la presente solicitud, con ligeras variaciones. En el procedimiento empleado en D01 se cultivan queratinocitos en un gel de fibrina y agarosa obtenido al mezclar muestras de plasma (que contiene el fibrinógeno y los factores de coagulación) con ácido tranexámico y cloruro cálcico (para conseguir la polimerización de la fibrina), y la posterior adición de agarosa. Sobre la matriz resultante se cultivan células epiteliales, y el producto resultante se expone al aire durante 2 semanas más para favorecer la estratificación del epitelio corneal obtenido.

Se considera que el método de la reivindicación 1 de la solicitud y el empleado en D01 difieren básicamente en el paso final de nanoestructuración del tejido artificial contemplado en el método de la solicitud. El proceso de nanoestructuración se ha encontrado en una gran mayoría de los procesos de fabricación de tejidos artificiales encontrados en los documentos del estado de la técnica. Por ejemplo, en el documento D02 se divulga un método de nanoestructuración de biomateriales de PEG y fibrinógeno, para mejorar las propiedades mecánicas del hidrogel, empleado en ingeniería de tejidos, y favorecer la migración celular a través de la matriz.

Tras la combinación de los documento D01 y D02, el método de la reivindicación 1 de la solicitud resultaría evidente para el experto en la materia, a pesar de tratarse de dos biomateriales distintos. Por tanto, las reivindicación 1 no cumpliría el requisito de actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

El documento D03 describe el mismo método de ingeniería tisular encontrado en D01, pero en este caso se emplea para construir tejidos de mucosa oral humana. En el documento D04 encontramos biomateriales de fibrina nanoestructurados, que son utilizados en ingeniería de tejidos para promover la formación del tejido óseo. Como en el caso comentado anteriormente, el experto en la materia combinaría de forma evidente la información de los documentos D03 y D04, y desarrollaría de este modo el método de la solicitud. Por tanto, a la luz de lo divulgado en estos dos documentos, las reivindicación 1 de la presente solicitud no tendría actividad inventiva.

El mismo razonamiento puede aplicarse a la combinación de los documentos D05 y D06. En el primero de ellos se divulga la generación de córneas humanas por ingeniería de tejidos, empleándose también en este caso el método descrito en D01. El documento D06, por su parte, divulga el potencial de biomateriales nanoestructurados en el campo de la ingeniería de tejidos, al desarrollar este tipo de estructuras y emplearlas para regeneración de tejidos, cultivando en ellas células madre mesenquimales de médula ósea. También en este caso el experto en la materia podría, a partir de la información de D05 y D06, deducir de forma evidente el método de la solicitud, por lo que estos dos documentos anticiparían la reivindicación 1 de la solicitud que, por tanto, no tendría actividad inventiva.

Los documentos D07, D08 y D09 se citan como información general del estado de la técnica, puesto que no afectan la novedad ni la actividad inventiva de la presente solicitud.

Así, el documento D07 divulga una técnica de nanoestructuración de biomateriales de colágeno tipo I y la utilización de estos materiales para favorecer la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea.

En el documento de patente D08 se describe el uso de ingeniería de tejidos para tratamiento de lesiones dérmicas mediante la producción de tejido epidérmico por cultivo de células precursoras de queratinocitos sobre biomateriales de fibrina, entre otros.

Finalmente, en el documento D09 se emplean matrices de fibrina y colágeno para el cultivo de condrocitos embrionarios, y se emplea el tejido así obtenido en la reparación de articulaciones.