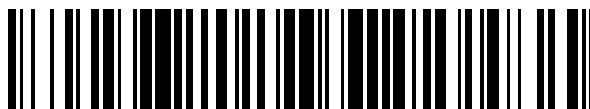


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 975**

51 Int. Cl.:

A61K 8/73	(2006.01) A61K 35/50	(2015.01)
A61Q 19/08	(2006.01) A61K 47/36	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01) A61K 31/726	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01) A61K 35/30	(2015.01)
A61K 9/06	(2006.01) A61K 35/32	(2015.01)
A61K 31/727	(2006.01) A61K 35/33	(2015.01)
A61K 31/728	(2006.01) A61K 35/34	(2015.01)
A61K 31/737	(2006.01) A61K 35/35	(2015.01)
A61K 35/12	(2015.01) A61K 35/36	(2015.01)
A61K 35/14	(2015.01) A61K 35/44	(2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2010 E 10713421 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 2552457**

54 Título: **Nuevo biomaterial procedente de gelatina de Wharton de cordón umbilical**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.11.2015

73 Titular/es:

**HISTOCELL, S.L. (100.0%)
ParqueTecnológico 800, 2º
48160 Derio (Bizkaia), ES**

72 Inventor/es:

**FONT PÉREZ, JULIO;
CASTRO FEO, MARÍA BEGOÑA y
DEL OLMO BASTERRECHEA, MAITE**

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 550 975 T3

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

Nuevo biomaterial procedente de gelatina de Wharton de cordón umbilical

DESCRIPCIÓN**Campo técnico de la invención**

5 La presente invención se refiere a un biomaterial, específicamente un hidrogel, formado a partir de la matriz extracelular del cordón umbilical para su aplicación en medicina regenerativa. La invención se refiere particularmente a un biomaterial compuesto esencialmente por los glicosaminoglicanos presentes exclusivamente en la gelatina de Wharton (GW) del cordón umbilical, y también a los métodos para la producción y el uso del mismo. Las
10 realizaciones del producto pueden usarse individualmente o en combinación con terapias basadas en células.

Antecedentes de la invención

15 Los biomateriales formados por polímeros desempeñan un papel fundamental en la medicina regenerativa puesto que proporcionan anclajes tridimensionales temporales para la adhesión, proliferación y la diferenciación de células trasplantadas. Esta estructura tridimensional proporciona una plataforma adecuada para la comunicación intercelular y la relación de las células con los componentes del biomaterial. La biointeracción que se produce entre la matriz y las células con el tiempo determina la capacidad proliferativa de las células, su organización para la formación de un nuevo tejido, su diferenciación y la secreción de moléculas de señalización que dirigen el proceso regenerativo
20 (Dawson *et al.*, 2008).

Con el fin de que se produzcan estos fenómenos, es necesario que el biomaterial permanezca en el sitio de aplicación durante un tiempo limitado hasta su reabsorción, conservando su estructura durante el tiempo suficiente para una acción celular adecuada con consecuencias regenerativas.

25 Los hidrogeles, un tipo específico de biomaterial, tienen varias propiedades que los hacen adecuados para su aplicación en la ingeniería de tejidos.

Los hidrogeles son estructuras formadas por polímeros hidrófilos interconectados de una naturaleza sintética o natural, con la capacidad para contener una gran cantidad de agua dentro de su estructura, desde el 10-20% hasta cientos de veces su propio peso. Estos geles muestran una morfología semisólida con una red tridimensional que es un candidato ideal para formar una matriz estructural que puede actuar como soporte. Esta estructura tridimensional puede formarse tanto mediante reticulación física como mediante reticulación química. La reticulación física conduce a hidrogeles reversibles cuya estructura puede invertirse según la aplicación final, mientras que la reticulación
30 química covalente conduce a hidrogeles permanentes, cuya estructura se mantendrá a través de toda la aplicación (Coburn *et al.*, 2007). Por tanto, los hidrogeles son materiales poliméricos (de una naturaleza sintética o natural) reticulados en forma de una red tridimensional que se hincha en contacto con agua, formando materiales elásticos blandos, y que retienen una fracción significativa de la misma en su estructura sin disolverse.

40 Los hidrogeles tienen una serie de características particulares, tales como:

1. Naturaleza hidrófila: debido a la presencia en su estructura de grupos solubles en agua (-OH, -COOH, -CONH₂, -CONH, SO₃H). Tienen un alto contenido acuoso similar al de los tejidos nativos (Elisseff *et al.*, 2005).

45 2. Insoluble en agua: debido a la existencia de una red polimérica tridimensional cohesiva en su estructura.

3. Tienen una consistencia gelatinosa que está determinada por el monómero de partida hidrófilo y la baja densidad de reticulación del polímero.

50 Tienen la capacidad para hincharse en presencia de agua o disoluciones acuosas, aumentando considerablemente su volumen hasta que alcanzan el equilibrio fisicoquímico, pero sin perder su forma. Esta capacidad para hincharse proporciona un microentorno acuoso comparable al que están sometidas las células en tejidos blandos. La presencia de agua y de una estructura porosa también permite el flujo de solutos de bajo peso molecular y de nutrientes que son cruciales y esenciales para la viabilidad celular, así como el transporte de desechos celulares fuera del hidrogel
55 (Torres *et al.*, 00).

Los glicosaminoglicanos (GAG), también denominados mucopolisacáridos, son heteropolisacáridos que se encuentran en organismos unidos a un núcleo de proteína formando macromoléculas denominadas proteoglicanos. Éstos pueden encontrarse en las superficies de células o en la matriz extracelular y llevar a cabo importantes funciones para interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Están en formas sulfatadas y no sulfatadas con un resto molecular característico común que implica una secuencia repetida de disacáridos formados por dos azúcares diferentes: uno de ellos es habitualmente un hexuronato mientras que el otro es una hexosamina. La variación configuracional en los enlaces de los disacáridos y la posición de sulfatación conduce a un aumento de la diversidad en las propiedades físicas y químicas de estas cadenas. El alto contenido en sulfato y la presencia de

ácido urónico confiere a los GAG una gran carga negativa, de modo que la gran cantidad de GAG en GW hace que este tejido sea extremadamente hidrófilo.

Existen varios tipos de GAG, que están directamente implicados en funciones celulares básicas, no sólo debido a su estructura, sino también porque son sitios de anclaje para varias moléculas de señalización celulares.

El ácido hialurónico es el GAG más abundante en GW. Es el único miembro no sulfatado de la familia de los GAG que funciona *in vivo* como un hidrato de carbono libre, consistiendo su estructura en repeticiones de un disacárido: ácido D-glucurónico y (1-β-3) N-acetil-D-glucosamina (Goa *et al.*, 1994; Laurent *et al.*, 1992). Se sintetiza por varios tipos celulares y se secreta en el espacio extracelular en el que interacciona con otros componentes de la matriz extracelular para crear la estructura de soporte y protección que rodea las células (Collins *et al.*, 2008). Es un polímero lineal polianiónico grande que presenta moléculas individuales que pueden tener un peso molecular de 100.000 a 5×10^6 Da (Toole *et al.*, 2004; Bertolami *et al.*, 1992). Tiene una estructura helicoidal que ocupa un gran volumen, lo que conduce a disoluciones de alta viscosidad. Las moléculas individuales de ácido hialurónico se asocian entre sí, formando redes o retículas. En tejidos en desarrollo, se considera que el ácido hialurónico es la principal macromolécula estructural implicada en la proliferación y migración celulares.

Se ha implicado el ácido hialurónico en varios procesos, tales como vascularización, morfogénesis, y en la integridad general y reparación de la matriz extracelular. Se sabe que una gran cantidad de ácido hialurónico contenido en el líquido amniótico favorece la reparación de heridas fetales (Longaker *et al.*, 1989). Además se han observado variaciones en sus propiedades moleculares entre piel sana y cicatrices, siendo el ácido hialurónico de la cicatrización típica diferente al de la cicatrización hipertrófica (Ueno *et al.*, 1992).

El sulfato de condroitina es un polímero lineal formado por un dímero de ácido D-glucurónico y repetición de N-acetilgalactosamina. Su utilidad se ha sometido a prueba en terapias dirigidas contra enfermedades articulares por medio de la inhibición de la actividad de las enzimas responsables de la degradación de la matriz de los componentes del cartílago. Puede actuar como antiinflamatorio por medio de la inhibición del complemento y es útil en el tratamiento de trastornos tromboembólicos, en cirugía y clínicas oftalmológicas.

El sulfato de dermatano, también conocido como sulfato de condroitina B, es un potente anticoagulante debido a su efecto inhibitor selectivo sobre la trombina a través del cofactor II de heparina, siendo muy eficaz *in vivo* debido a su menor riesgo hemorrágico (Trowbridge *et al.*, 2002).

Los glicosaminoglicanos en general y la heparina en particular, tienen la capacidad para modular la actividad de la cascada plasmática, potenciando la inhibición de la ruta de coagulación intrínseca e inhibiendo la ruta de activación del complemento clásica en diferentes puntos (Rabenstein, 2001). Otras funciones conocidas de la heparina son la inhibición de la angiogénesis, el crecimiento humoral y su actividad antiviral.

El sulfato de heparano tiene una estructura que está relacionada estrechamente con la heparina. Está distribuido ampliamente en tejidos animales y entre sus funciones, la adhesión celular y la regulación de la proliferación celular, son primordiales. Tiene un efecto protector frente a la degradación de proteínas, regulando su transporte a través de la membrana basal y también interviniendo en la internalización de las mismas (Rabenstein, 2001).

Existen varios documentos de patente relativos a mucopolisacáridos obtenidos a partir de un origen humano o animal. El documento US 3.887.703 se refiere a mezclas de mucopolisacáridos obtenidos de los tegumentos cutáneos y cordones umbilicales procedentes de una fuente bovina fetal u ovina fetal. El procedimiento para obtener los mucopolisacáridos en la patente mencionada anteriormente no describe la eliminación de la membrana, células y componentes vasculares de los cordones umbilicales. El producto de extracción se obtiene en forma de un polvo sin una comprensión de la composición o cuantitativa clara de los mucopolisacáridos individuales contenidos en el mismo. Los productos activos se identifican mediante la cantidad de hexosaminas que están presentes en la mezcla. Se preparan composiciones en formas tanto inyectables como para ingesta oral para el tratamiento de cuero cabelludo y cabello grasos, y para inflamaciones, con los extractos.

El documento de patente US 5.814.621 se refiere a una composición que consiste esencialmente en un fármaco que es más soluble en una mezcla de disolvente orgánico-agua que en agua, y un mucopolisacárido que forma parte de un fármaco, en el que se distribuyen cristales o partículas del fármaco en la superficie de las partículas del mucopolisacárido y en el que dicho fármaco se disuelve en agua más rápidamente que si estuviera solo. Dicha composición puede estar en forma de gránulos.

La solicitud de patente WO 2008/021391 A1 describe biomateriales que comprenden la membrana del cordón umbilical. Además, puede comprender adicionalmente uno o más vasos del cordón umbilical y/o gelatina de Wharton. El biomaterial está preferiblemente seco y puede ser plano, tubular o conformarse para adaptarse a una estructura particular. La invención también proporciona métodos de preparación del biomaterial que comprende al menos una capa de la membrana del cordón umbilical, así como los métodos para obtener dichos biomateriales y el

uso de los mismos para reparar tejidos u órganos.

La descripción caracteriza el biomaterial procedente del cordón umbilical. Describe que la composición de dicho material comprende colágeno (tipo I, III y IV, siendo éstos el 75-80% del porcentaje de la matriz del biomaterial), fibronectina y glicosaminoglicanos.

También se menciona que el biomaterial también puede comprender colágeno que no proviene de cordones umbilicales y tiene un origen comercial, o se ha aislado de otros tejidos y métodos conocidos en el estado de la técnica. Los autores también añaden que el biomaterial puede comprender compuestos no estructurales tales como factores de crecimiento, hormonas, antibióticos, factores inmunomoduladores, etc.

La patente española ES 8600613 describe un procedimiento para el tratamiento de tejidos corporales, para separar membranas celulares, ácidos nucleicos, lípidos y componentes citoplasmáticos y formar una matriz extracelular cuyo componente principal es colágeno, y para hacer que el tejido corporal sea adecuado para usarse como injerto corporal, que comprende extraer dicho tejido con al menos un detergente mientras que al mismo tiempo se mantiene con un tamaño y una forma adecuados para el injerto del mismo en el cuerpo.

El documento de patente ES2180653T3 describe métodos para transformar materiales biológicos en sustancias que han experimentado autólisis para eliminar al menos el 70% de las células y métodos para el tratamiento de dicho material para inhibir su mineralización tras la implantación en un ser humano o animal. Reivindica que el material biológico de partida puede ser, entre otros, el cordón umbilical; aunque se refiere específicamente a una válvula aórtica de un cerdo. No obstante, la descripción no contiene ningún detalle con respecto a llevarlo a cabo con cordón umbilical. El biomaterial resultante se usa para crear una válvula cardíaca bioprotésica.

El documento de patente US 4.240.794 se refiere a preparar cordones umbilicales humanos o de otros animales para su uso como sustituto vascular. El documento describe específicamente una técnica para deshidratar el cordón umbilical en alcohol seguido por un método para fijarlo en la configuración deseada. Se describe que una vez que se ha limpiado el cordón umbilical de posibles restos de otros tejidos, se monta en un mandril y se sumerge en una disolución de alcohol etílico específica durante el tiempo necesario para deshidratarlo. Tras la deshidratación, se sumerge el cordón en una disolución de aldehído al 1% para la fijación.

El documento de patente FR 2.563.727 describe un método para producir un injerto de piel a partir de tejido conjuntivo desprogramado impregnado con gelatina de Wharton y conservado a temperaturas de congelación. Los autores describen un dispositivo que se ancla al tejido umbilical y se expande por medio de una cánula que inyecta aire comprimido. Se describe que el cordón umbilical se corta después y se aísla, pero el producto que resulta de este procedimiento no está compuesto por GW exclusivamente.

Existen documentos de patente que usan cordón umbilical para obtener células de interés, fin para el que se llevan a cabo procedimientos para separar gelatina de Wharton y eliminarla, obteniendo por tanto dichas células. Por ejemplo, el documento PCT 98/17791 describe el aislamiento de pre-condrocitos del cordón umbilical, que se usan posteriormente de manera terapéutica para producir cartílago. De manera similar, en el documento WO 2004/072273 A1 se extraen células progenitoras de gelatina de Wharton que se encuentra dentro de la región perivascular del cordón umbilical y se usan para reparar tejidos humanos.

A diferencia de otros biomateriales similares, el biomaterial de la presente invención está compuesto por una combinación de diferentes GAG presentes en la GW del cordón umbilical. Está compuesto principalmente por ácido hialurónico, pero además, a diferencia de otros compuestos de GAG, contiene sulfato de dermatano, sulfato de heparano, heparina, sulfato de queratano, 4-sulfato de condroitina y 6-sulfato de condroitina. La combinación específica de los diferentes GAG tal como está presente en la GW del cordón umbilical mejora la bioactividad del biomaterial, puesto que cada uno de ellos lleva a cabo funciones reguladoras del comportamiento celular. Por ejemplo, se sabe que el sulfato de heparano y la heparina son los principales sitios de unión para FGF y EGF (Kanematsu *et al.*, 2003; Ishihara *et al.*, 2002), que los protegen frente a la proteólisis y permiten concentraciones locales de estos factores en el entorno celular, creando el microentorno molecular adecuado para una gran activación celular (Malkowski *et al.*, 2007).

Sin embargo, según nuestros conocimientos, no hay ningún documento que mencione un biomaterial formado por GAG derivado de gelatina de Wharton de cordón umbilical que esté: 1) libre de vasos sanguíneos y membrana del cordón umbilical, 2) que pueda formar un hidrogel con viscosidad ajustable, 3) que sea aplicable a una amplia gama de patologías humanas. Además, los ejemplos de patentes mencionados anteriormente contienen productos derivados de cordón umbilical que difieren significativamente de la presente realización presentada en este documento. El biomaterial de la presente invención se basa en los glicosaminoglicanos que forman exclusivamente la matriz extracelular del cordón umbilical denominada GW. Por tanto, aunque se encuentran numerosos intentos para sintetizar matriz extracelular en la bibliografía, no se ha logrado una composición exacta que simule las condiciones naturales de un tejido específico.

El biomaterial desarrollado en la presente invención puede ofrecer un armazón tridimensional que tiene posibles aplicaciones como matriz de base para la ingeniería de tejidos. Además, cuando se aplica directamente o se combina con células como constructo en una patología, interviene en el proceso regenerativo, ejerciendo un efecto quimiotáctico sobre las células del tejido circundante, proporcionando por tanto un entorno favorable para la activación de procesos celulares.

La combinación de GAG presentes en este biomaterial proporciona varios sitios de unión de moléculas de señalización específicos que permitirán en el sitio de aplicación, una alta activación de las células del propio tejido para la síntesis de altos niveles de matriz extracelular que regenerarán y repararán el defecto tratado.

Además, el origen del biomaterial de la invención proporciona un producto natural de origen humano o animal procedente de una zona no inmunogénica. Este material se elimina a través de procesos de biodegradación naturales en el cuerpo, previniendo por tanto las reacciones o efectos secundarios no deseados provocados por otros biomateriales. Por ejemplo, algunos biomateriales sintéticos pueden provocar inflamación, induración (endurecimiento de tejidos de órganos), aparición de granulomas, necrosis en mucosas y complicaciones tisulares debido a la toxicidad de las sustancias usadas en la producción de los mismos.

Una de las funciones más importantes de los GAG en el cordón umbilical es proporcionar fuerza, elasticidad y resistencia para proteger el sistema vascular ubicado en el mismo frente a alteraciones físicas externas (por ejemplo, el retorcimiento del cordón sería fatal para el feto). De hecho, la deficiencia en la síntesis de estas moléculas está implicada en importantes patologías durante el embarazo (Gogiel *et al.*, 2005). Por tanto, se cree que un biomaterial compuesto por los 7 tipos diferentes de GAG que forman parte del cordón umbilical presentaría un gran grado de versatilidad a través de la presentación de las siguientes capacidades: recapitulación de la bioactividad que se produce en el organismo, presentación de las mismas propiedades mecánicas de las que se beneficia el cordón umbilical, y presentación de la idoneidad para la modificación y el procesamiento adicional (tal como, reticulación).

Descripción de los dibujos

Figura 1: Caracterización y cuantificación de GAG presentes en el biomaterial de la invención. El diagrama de barras muestra los diferentes tipos de GAG presentes en el biomaterial de la invención, así como la contribución porcentual en la composición de cada uno. HA: ácido hialurónico, KS: sulfato de queratano, C6S: 6-sulfato de condroitina, HS: sulfato de heparano, C4S: 4-sulfato de condroitina, DS: sulfato de dermatano, H: heparina.

Figura 2: Verificación de la presencia de GAG en la muestra y de la aparente falta de células y ADN/ARN en la misma por medio de tinción histológica. Las imágenes en la parte izquierda muestran las muestras con células y las imágenes en la parte derecha muestran la tinción del biomaterial solo. A, B: tinción con hematoxilina-eosina; C, D: tinción con verde de metilo-pironina; E, F: tinción con azul alciano.

Figura 3: Imágenes de la estructura tridimensional interna del biomaterial de la invención mediante microscopía electrónica de barrido. La imagen muestra la estructura interna del biomaterial de la invención a dos aumentos diferentes (A: 10 μm y B: 5 μm), en la que pueden observarse las unidades de GAG interconectadas entre sí, ofreciendo una estructura porosa muy homogénea.

Figura 4: Resultados del estudio de toxicidad de las células en el biomaterial de la invención. Los gráficos muestran las curvas de citotoxicidad de las células CMMa (células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo) (figura A), fibroblastos de ratón (figura B9), L929 (figura C), osteoblastos (figura D), condrocitos (figura E) y queratinocitos (figura F). Se facilitan los resultados con respecto a un control (células sin biomaterial) y a un control positivo (células en un biomaterial tóxico tal como se determina según la norma ISO-10993, PVC). Tal como puede observarse en los gráficos, el biomaterial no provoca toxicidad en ninguno de los tipos celulares sometidos a prueba, puesto que la actividad mitocondrial de las células dispuestas en el biomaterial no muestra diferencias con respecto a las células de control (en condiciones de cultivo convencionales).

Figura 5: Imagen ampliada del biomaterial tridimensional. Se muestra la estructura tridimensional macroscópica del biomaterial sólido de la invención tras liofilización para lo que se usó como molde una placa de cultivo de 24 pocillos convencional.

Figura 6: Imagen de microscopía óptica invertida que muestra la viabilidad de células de cartílago articular (condrocitos) y CMM teñidas con MTT en cocultivo en el biomaterial de la presente invención. La tinción es tanto a los 3 días como a los 7. Las células teñidas de color negro son viables y metabólicamente activas.

Figura 7: Una comparación de la capacidad proliferativa de condrocitos humanos en el biomaterial de la presente invención y en ácido hialurónico. Los datos en el gráfico muestran un aumento significativo en la capacidad de

proliferación de condrocitos mantenidos en el biomaterial de la presente invención con respecto a los cultivados en ácido hialurónico.

Figura 8: Velocidad de proliferación de los fibroblastos L-929 en contacto con el biomaterial de la presente invención y ácido hialurónico. El gráfico muestra un aumento significativo en la proliferación de células dispuestas en el biomaterial de la presente invención en comparación con células cultivadas en ácido hialurónico.

Figura 9: Imagen de microscopía óptica invertida de células sembradas sobre plástico de cultivo celular, con el biomaterial de la presente invención, e hidrogeles de ácido hialurónico puestos en contacto con la superficie de cultivo celular. En estas imágenes, puede observarse que las células en contacto con el biomaterial de la presente invención se desprenden de la superficie de cultivo celular y forman agrupaciones dentro del biomaterial de la presente invención.

Figura 10: RT-PCR de la expresión de colágeno II y versicano. Resultados del barrido densitométrico de los geles de agarosa. Se expresan los datos como unidades arbitrarias de intensidad relativa al valor de control (C) y son la media $\pm$ e.e.m., $n = 3$. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). La imagen muestra el inicio de la expresión de colágeno de tipo II y la disminución del versicano en las CMMA dispuestas en el biomaterial de la presente invención. Estas características de expresión son indicativas de las células en el proceso de diferenciación hacia un fenotipo de condrocito y la síntesis de matriz extracelular correspondiente a cartílago articular maduro.

Figura 11: Resultados del módulo de almacenamiento para tres concentraciones diferentes del biomaterial de la presente invención derivado de fuentes porcinas y humanas. Se recogieron datos de una deformación/frecuencia de excitación individual derivada de las respectivas regiones viscoelásticas lineales de las muestras. Un barrido de temperatura a lo largo de temperaturas que incluyen los valores fisiológicos produjo una relación de temperatura viscoelástica para todas las muestras.

Figura 12: Resultados del módulo de pérdida para tres concentraciones diferentes de histogel derivado de fuentes porcinas y humanas. Se recogieron datos de una deformación/frecuencia de excitación individual derivada de las respectivas regiones viscoelásticas lineales de las muestras. Un barrido de temperatura a lo largo de temperaturas que incluyen los valores fisiológicos produjo una relación de temperatura viscoelástica para todas las muestras.

Figura 13: Resultados del módulo de pérdida para tres concentraciones diferentes del biomaterial de la presente invención derivado de fuentes porcinas y humanas. Se recogieron datos de una deformación/frecuencia de excitación individual derivada de las respectivas regiones viscoelásticas lineales de las muestras. Un barrido de temperatura a lo largo de temperaturas que incluyen los valores fisiológicos produjo una relación de temperatura viscoelástica para todas las muestras.

Figura 14: Imágenes de microscopía óptica que muestran el reclutamiento celular de tejidos circundantes (quimiotaxia) en los días 1 (a), 3 (b) y 4 (c); en las que (i) corresponde al control positivo, (ii) corresponde a la configuración experimental con ácido hialurónico, (iii) corresponde al control negativo y (iv) corresponde a la configuración experimental con biomaterial de la invención.

Figura 15: Imágenes de microscopía óptica que muestran tras la realización de un ensayo Live/Dead para determinar si eran viables o no las células que migran hasta la superficie de los fragmentos de cartílago. La imagen muestra que la amplia mayoría de células que emergen de los fragmentos de cartílago son viables.

Figura 16: Imágenes de microscopía óptica que muestran el reclutamiento celular de tejidos circundantes (quimiotaxia) en los días 5 (a) y 6 (b); en las que (i) corresponde al control positivo, (ii) corresponde a la configuración experimental con ácido hialurónico, (iii) corresponde al control negativo y (iv) corresponde a la configuración experimental con biomaterial de la invención.

Descripción detallada de la invención

El cordón umbilical contiene grandes cantidades de GAG (sulfatados y no sulfatados) que forman parte del tejido conjuntivo blando denominado GW. Entre estos GAG, el principal GAG no sulfatado es el ácido hialurónico (Hadidian *et al.*, 1948; Jeanloz *et al.*, 1950), aunque también se detectan menores proporciones de GAG sulfatados (Danishefsky *et al.*, 1966). Además, estudios histológicos del cordón umbilical han sugerido la presencia de heparina (Moore *et al.*, 1957). También es muy probable que el cordón umbilical tenga más GAG sulfatados minoritarios que no se han identificado aún.

La presente invención se refiere a un hidrogel inyectable compuesto por los GAG presentes exclusivamente en la GW del cordón umbilical. Este hidrogel está completamente libre de células y cualquier otro componente vascular presente en el cordón umbilical a partir del que puede obtenerse el biomaterial, de modo que tiene de poca a ninguna inmunogenicidad. El biomaterial de la invención, o bien en su forma combinada con células o bien solo, es útil para tratamientos terapéuticos y cosméticos.

En el contexto de la presente invención, se definen los siguientes términos en el presente documento:

“Hidrogel” se refiere a la formación de un coloide en el que la fase dispersa (coloide) se ha combinado con la fase continua (agua) para producir una sustancia similar a una gelatina viscosa. El coloide es normalmente una red interpenetrante de filamentos hidrófilos de producción natural o sintética.

“Inyección” se refiere a la inserción forzosa de una sustancia en una cavidad. Por ejemplo, una sustancia (habitualmente de valor terapéutico) se inyecta en una herida, o en la cavidad corporal, la circulación, u otra ubicación. Para el fin de la presente invención, la inyección puede consistir en diversos modos de penetración en la ubicación deseada. Por ejemplo, la inyección puede implicar agujas hipodérmicas de tamaños de calibre que oscilan entre 0,5 mm y 15 mm. En cirugía artroscópica o laparoscópica, se usa un orificio de cilindro, aguja, u otro objeto similar para tratar patologías internas. En esta forma de inyección, se hace pasar de manera forzosa un agente terapéutico tal como un armazón a través del orificio de acceso que puede tener un tamaño de calibre considerablemente mayor que una aguja hipodérmica (por ejemplo 0,5 cm -4 cm).

“Hidrogel inyectable” se refiere al acto de aplicar un hidrogel usando una técnica de inyección a una patología, que penetra la barrera de la piel. Por ejemplo, la patología podría ser una herida crónica, un órgano dañado, tejido dañado, o cualquier otra lesión bajo la barrera de la piel que necesite tratamiento. El método de aplicación puede variar ampliamente desde jeringa hipodérmica hasta técnicas artroscópicas/laparoscópicas para dispositivos *ad hoc* diseñados específicamente para aplicar materiales a zonas afectadas. Por ejemplo, podría utilizarse un análogo a una pistola selladora para suministrar una sustancia de alta viscosidad; podría aplicarse un dispositivo que bobina hilo a través de una aguja para suministrar una sustancia de hidrogel polimerizado filamentosos; podría utilizarse un orificio artroscópico/laparoscópico para suministrar un tapón de hidrogel a un defecto condilar cartilaginoso. Un experto en la técnica puede apreciar las multitudes de posibilidades para las técnicas de inyección.

“Hidrogel reticulado” se refiere a la estabilización iónica o covalente de un hidrogel que puede ser o no reversible. Los hidrogeles reticulados tienen mayores viscosidades que los hidrogeles no reticulados, son adecuados para la manipulación, presentan morfologías tridimensionales estables y pueden romperse con la aplicación de fuerza mecánica.

“Hidrogel tridimensional” se refiere a un hidrogel reticulado que mantiene una forma tridimensional que incluye estructuras tridimensionales más finas estables tales como poros. En cambio, un hidrogel no reticulado con flujo para llenar cualquier recipiente en el que se coloca. Esta resistencia al flujo en un hidrogel reticulado es característica de la capacidad de un hidrogel reticulado para mantener una estructura tridimensional estable.

El origen de los cordones umbilicales a partir de los que se extrae la GW para los fines de la presente invención procede de animales en los que se incluyen los mamíferos. Fuentes potenciales adicionales de GW son los cordones umbilicales de animales tales como: vacas, ovejas, cerdos, antílopes, camellos, ciervos, cabras, caballos, elefantes, rinocerontes, hipopótamos, jirafas, bisontes, búfalo, tigres, leones, leopardos, osos, etc. El biomaterial está formado por una mezcla de glicosaminoglicanos seleccionados del grupo que comprende: ácido hialurónico, sulfato de queratano, 6-sulfato de condroitina, sulfato de heparano, 4-sulfato de condroitina, sulfato de dermatano y heparina.

El biomaterial se encuentra preferiblemente formando la siguiente combinación y proporción de la mezcla de GAG: ácido hialurónico (40-80%), sulfato de queratano (2-25%), 6-sulfato de condroitina (3-10%), sulfato de heparano (1-9%), 4-sulfato de condroitina (0,5-7%), sulfato de dermatano (0,1-7%) y heparina (0,05-3%), más preferiblemente la combinación de GAG es: ácido hialurónico (70%), sulfato de queratano (10%), 6-sulfato de condroitina (7%), sulfato de heparano (5%), 4-sulfato de condroitina (4%), sulfato de dermatano (3%) y heparina (1%).

La presente invención también se refiere al biomaterial compuesto por el hidrogel descrito previamente, que se combina opcionalmente con células para un efecto terapéutico compuesto. La acción del hidrogel se potencia, por tanto, en el proceso regenerativo y de reparación de tejido en tejidos dañados gravemente o en tejidos sin la posibilidad de reclutamiento celular *in situ* por parte del paciente, como resultado del hecho de que el biomaterial contiene ahora células sanas que pueden contribuir a la eficacia del producto. Las células añadidas al armazón del biomaterial para formar el constructo pueden ser, entre otras: células madre mesenquimatosas no diferenciadas o células madre mesenquimatosas diferenciadas en otra estirpe celular, células madre hematopoyéticas no diferenciadas o células madre hematopoyéticas diferenciadas en otra estirpe celular, condrocitos y condroblastos, osteoblastos y osteocitos, queratinocitos, fibroblastos, miocitos, adipocitos, neuronas u otras células del sistema nervioso, células del sistema de glóbulos blancos, células corneales, células endoteliales o células epiteliales.

Los siguientes aspectos relacionados con la presente invención se presentan tal como sigue: (i) obtener un extracto de GAG a partir de gelatina de Wharton del cordón umbilical (ii) producir el hidrogel de GAG aislado de la gelatina de

Wharton del cordón umbilical (iii) caracterizar el hidrogel obtenido y (iv) usar el biomaterial de hidrogel. Además, siguen estudios/ejemplos que demuestran la capacidad del hidrogel inyectable para afectar al comportamiento e interacciones celulares positivos en comparación con ácido hialurónico (HA).

5 Obtención de un extracto de GAG a partir de la GW del cordón umbilical.

El procedimiento para obtener el biomaterial comprende las siguientes etapas:

- 10 a. obtener un cordón umbilical de origen animal o humano;
- b. tratar el cordón umbilical con una disolución salina y antibióticos;
- c. eliminar toda la sangre de la superficie del cordón;
- 15 d. fragmentar el cordón en secciones de 1-2 cm;
- e. limpiar toda la sangre retenida en el interior;
- 20 f. eliminar los vasos sanguíneos y la membrana del cordón umbilical;
- g. separar la sustancia gelatinosa que comprende la gelatina de Wharton;
- h. digerir enzimáticamente la sustancia gelatinosa obtenida; e
- 25 i. precipitar y aislar los GAG;

Específicamente, se realiza lo siguiente para aislar los glicosaminoglicanos de la GW del cordón umbilical:

30 Obtención de la gelatina de Wharton.

Se recoge el cordón umbilical inmediatamente después del parto y se procesa o se mantiene a 4°C hasta su procesamiento. No deben transcurrir más de 24 horas en estas condiciones.

35 Para el procesamiento, el cordón umbilical se mantiene preferiblemente en condiciones estériles en una campana extractora de flujo laminar de nivel de bioseguridad II. Se somete a al menos tres lavados sucesivos con una disolución de DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) o con tampón fosfato 1X (PBS 1X) con una mezcla de antibióticos (penicilina, estreptomina, anfotericina B) y/o una disolución de tampón de lisis de eritrocitos, para eliminar por completo los residuos sanguíneos.

40 Una vez que la superficie del cordón umbilical se limpia de sangre, se transfiere a una placa Petri y se fragmenta en secciones de 1-2 cm. Cuando se corta el cordón en fragmentos, es posible que se libere sangre retenida en el interior de los vasos sanguíneos del cordón umbilical, de modo que será necesario en este caso lavar meticulosamente los fragmentos de cordón.

45 El cordón umbilical tiene a nivel estructural dos arterias umbilicales y una vena umbilical, sostenidas por una matriz consistente que es GW y cubierta por una membrana delgada. Con el fin de obtener exclusivamente la GW, se eliminan mecánicamente la membrana y los vasos sanguíneos. Para ello, los fragmentos de cordón umbilical se seccionan longitudinalmente y con la ayuda de un bisturí y pinzas, se eliminan cuidadosamente tanto los vasos sanguíneos como la membrana del cordón umbilical. La sustancia gelatinosa que se obtiene como consecuencia de esta separación mecánica es la GW. Generalmente, se obtienen entre 20 y 160 g de gelatina de Wharton a partir de 50 25 a 200 g de cordón umbilical.

Extracción de GAG a partir de gelatina de Wharton.

55 Se usó el protocolo descrito en la bibliografía (Rogers *et al.*, 2006) para obtener GAG a partir de cartílago por medio de digestión enzimática con la enzima papaína procedente de látex de papaya (SIGMA, ref.: P4762), con algunas modificaciones, para obtener GAG a partir de la GW del cordón umbilical. Se sumergió la GW obtenida en el punto anterior en 20 ml de la disolución de tampón de extracción (L-cisteína 5 mM, disolución de tampón de Na₂HPO₄ 100 mM, EDTA 5 mM, 10 mg (14 U/mg) de papaína, pH 7,5) durante 24-48 horas a 60°C para la digestión completa.

60 Una vez que se ha digerido por completo la GW, se centrifuga para eliminar el residuo de la digestión inservible. En este punto, se observa que el volumen de digestión es mayor que el volumen inicial. Este aumento se debe a la disolución de los GAG presentes en la GW y por tanto a la liberación del agua que acumulan.

Una vez que se centrifuga la muestra, se transfiere el sobrenadante a otro recipiente y entonces se precipitan los GAG presentes en la muestra.

Precipitación y aislamiento de GAG a partir de la GW del cordón umbilical.

5 Se precipitan los GAG de la GW con 5 volúmenes de etanol al 100%. Por medio de esta etapa, se precipitan los GAG de la muestra así como las sales presentes en la misma. La precipitación se produce debido al hecho de que las moléculas de agua presentes en la muestra interactúan con las moléculas de etanol, de manera que las moléculas de agua no pueden interactuar con los GAG de la muestra, volviéndose estos últimos insolubles en
10 agua, y por tanto precipitando. Por tanto, justo tras la adición del etanol y la agitación del tubo, se observa un precipitado blanquecino. Se deja que los GAG precipiten durante 12 horas a -20°C. Una vez que han precipitado, se centrifugan para eliminar el etanol al 100% y se lava el precipitado con 5 volúmenes de etanol al 75% para eliminar las posibles sales residuales que hayan precipitado en la muestra. Se centrifuga la muestra una vez más para eliminar por completo el sobrenadante.

15 Una vez que ha precipitado la muestra de GAG, se deja que se seque el residuo durante al menos 30 minutos a la temperatura ambiental hasta que se haya evaporado todo el etanol. Una vez que se ha evaporado el etanol, se resuspende la muestra de GAG en H₂O Milli-Q y se almacena a 4°C hasta su uso. El hidrogel así obtenido puede mezclarse con un suero inyectable y/o aplicarse directamente a la zona que va a tratarse. A pesar de lo anterior, la resistencia mecánica de este tipo de material es baja; no se considera para soportar cargas a menos que se combine con un material de refuerzo para formar un material compuesto. Por ejemplo, un soporte de fosfato de calcio podría servir como una matriz de refuerzo dentro de un material compuesto. Además; existe una afinidad muy alta entre las moléculas de polisacárido que componen este hidrogel inyectable. Esta afinidad es aparente en la alta cohesión del biomaterial de hidrogel. Sin embargo, existe también un carácter adhesivo sustancial con respecto al
20 hidrogel que es beneficioso para el aislamiento local del hidrogel cuando se inyecta. En último lugar, la versatilidad del hidrogel dicta que puede administrarse solo o en combinación con células.

Existen otras aplicaciones terapéuticas que requieren un biomaterial de hidrogel inyectable más resistente, estable y permanente con una estructura interna que facilite mejor su colonización por células procedentes o bien de los tejidos adyacentes al sitio de aplicación o bien por células específicas dispuestas en el biomaterial antes de su implantación. En este caso, el biomaterial de la presente invención actuaría como una matriz tridimensional bioactiva para inducir la cicatrización y reparación de una herida de tejido.

30 El ácido hialurónico, el 6- y 4-sulfato de condroitina, el sulfato de queratano, el sulfato de dermatano, el sulfato de heparano y la heparina regulan la actividad celular y activan la síntesis de una nueva matriz extracelular. La diversidad y composición de GAG presentes en el biomaterial permite la existencia de varios sitios de unión específicos para factores de crecimiento que regulan los procesos de proliferación y diferenciación celular, así como la capacidad de las células para la síntesis de una nueva matriz extracelular y factores de crecimiento. Este efecto conduce a una mayor capacidad para la respuesta celular en los tejidos afectados y acelera la regeneración e incluso permite la cicatrización en el caso de zonas extremadamente degradadas, como es el caso de úlceras crónicas.

Se requiere una estrategia de estabilización (reticulación) con el fin de facilitar aplicaciones en las que el biomaterial va a funcionar como un armazón tridimensional estable. Con el fin de lograr este objetivo, los GAG pueden modificarse químicamente o reticularse para formar el hidrogel inyectable de la presente invención. Estas modificaciones químicas (reticulación, polimerización) implican normalmente grupos alcohol o carboxílicos, y pueden producirse *in situ* después de la inyección, o antes de la inyección. Además, este procedimiento implica que las cadenas de un polímero soluble en agua se vuelvan insolubles (Elisseeff *et al.*, 2005).

50 Los hidrogeles inyectables obtenidos por medio de reticulación tienen propiedades únicas que los hacen potencialmente útiles para la ingeniería de tejidos: alto contenido acuoso para portar nutrientes o sustancias de desecho, elasticidad y la capacidad de encapsular o inmovilizar células *in situ* en un microentorno tridimensional. La densidad de reticulación afecta directamente al tamaño del poro del hidrogel inyectable y por tanto a las propiedades físicas del mismo, tales como el contenido acuoso o la resistencia mecánica, por ejemplo. Un hidrogel inyectable con una densidad de reticulación grande y por tanto un tamaño de poro muy pequeño absorberá por tanto menos agua y tendrá mayor resistencia mecánica que un hidrogel inyectable con un menor grado de reticulación y un tamaño de poro grande.

60 La formación de hidrogel reticulado para inyección puede llevarse a cabo por medio de varios métodos incluyendo, pero sin limitarse a: cambios de temperatura, reacciones químicas y fotopolimerización. La reticulación puede llevarse a cabo *in situ* después de la inyección mediante metodologías de jeringa hipodérmica convencionales o *ex vivo* antes de la inyección y utilizando por tanto técnicas más cercanas a la laparoscopia/artroscopia tal como se definió anteriormente en este documento.

En una realización de la presente invención, la reacción de reticulación se lleva a cabo tal como sigue: se obtiene una disolución acuosa del polímero que va a reticularse (en este caso, una disolución acuosa de GAG) y se añade el reactivo químico que provocará la reticulación. En este caso, para obtener el hidrogel estabilizado, se usa EDC (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil-carbodiimida) porque EDC activa grupos carboxilo en disoluciones acuosas. Estos grupos carboxilo activados pueden reaccionar con aminas primarias o grupos hidroxilo, dando como resultado enlaces amida o éster. Una vez que se forma el hidrogel, se lava varias veces con PBS para eliminar los residuos de EDC que puedan quedar. (Pieper *et al.*, 1999; Wissink *et al.*, 2001).

Opcionalmente, el hidrogel inyectable puede solidificar en un molde destinado para tal procedimiento durante la reacción de reticulación, de manera que adopte la forma y el tamaño deseados dependiendo del molde que se use. Estos hidrogeles pueden secarse por medio del procedimiento denominado liofilización para obtener así una estructura porosa debido a la eliminación de las moléculas de agua intercaladas entre las moléculas de GAG presentes en el hidrogel (figura 5). Además, una vez que se liofiliza el biomaterial, la estructura tridimensional del hidrogel puede caracterizarse por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB) (figura 3). Una vez que se obtiene el hidrogel en su forma final, se esteriliza por medio de exposición a radiación ultravioleta durante un periodo de 40 minutos. Las pruebas de esterilidad realizadas sobre el hidrogel demostraron que el biomaterial se esterilizaba de forma óptima. Técnicas adicionales para la esterilización podrían ser tratamiento con gas de óxido de etileno o irradiación con radiación gamma tal como se dará cuenta un experto en la técnica.

Una vez esterilizado, el hidrogel inyectable está listo para usarse directamente o en asociación con células. Los ensayos de asociación de células con el hidrogel de la invención demostraron que el biomaterial no es citotóxico basándose en los resultados de los experimentos de la capacidad de proliferación (figura 4).

Usos del biogel.

El biomaterial de la invención, o bien en su forma combinada con células o bien solo, puede aplicarse en su forma inyectable en enfermedades del sistema articular y en tratamientos estéticos. Las células que pueden usarse son, entre otras: células madre mesenquimatosas no diferenciadas o células madre mesenquimatosas diferenciadas en otra estirpe celular, células madre hematopoyéticas no diferenciadas o células madre hematopoyéticas diferenciadas en otra estirpe celular, condrocitos y condroblastos, osteoblastos y osteocitos, queratinocitos, fibroblastos, miocitos, adipocitos, neuronas u otras células del sistema nervioso, células del sistema de glóbulos blancos, células corneales, células endoteliales o células epiteliales.

Dependiendo de la aplicación terapéutica o cosmética a la que se destinará el hidrogel, la técnica de inyección será diferente y la viscosidad del hidrogel se adaptará al calibre del sistema de inyección.

La viscosidad del hidrogel de la presente invención puede oscilar entre 10 y 150.000 cS; en el caso de hidrogel no reticulado es de desde 10 hasta 15.000 cS, preferiblemente entre 10 y 2.000 cS. El hidrogel reticulado puede tener una viscosidad que oscila entre 15.000 y 150.000 cS. La viscosidad del hidrogel puede modificarse mediante reticulación según las necesidades.

Tabla 1. Valores de viscosidad de diversos hidrogeles no reticulados y reticulados derivados de gelatina de Wharton tal como se describe en el biomaterial de la presente invención.

Hidrogel	Viscosidad (cS)
5%-10% derivado de ser humano/porcino (RETICULADO)	70.000
50% de derivado de ser humano/porcino	15.000
40% de derivado de ser humano/porcino	9.100
30% de derivado de ser humano/porcino	4.900
20% de derivado de ser humano/ porcino	2.000
10% de derivado de ser humano/ porcino	150-580
5% de derivado de ser humano/ porcino	19-58
1% de derivado de ser humano/ porcino	4-6

El biomaterial desarrollado en la presente invención es útil en los siguientes tratamientos terapéuticos y cosméticos: remodelación, relleno o reconstrucción de tejidos blandos, tratamiento de arrugas, pliegues y cicatrices, quemaduras, úlceras, aumento de tejidos blandos, lipatrofia facial, enfermedades de los discos intervertebrales, reparación de cartílago, lesiones musculoesqueléticas, osteoartritis y periartritis; tratamiento de tumores, enfermedades vaginales, lesiones cerebrales, reparación de médula, trastornos degenerativos, enfermedades cardiovasculares y procesos de lubricación, como analgésico y antiinflamatorio.

El hidrogel inyectable reticulado de la invención puede tener una estructura sustancialmente porosa. En una realización, el diámetro de poro es de 0,5-1.000 μm , preferiblemente de 0,5-500 μm , con una viscosidad mayor de 15.000 cS. Dicho biomaterial puede aplicarse preferiblemente como un almacén en las siguientes patologías: tratamiento de quemaduras, úlceras y defectos dermoepidérmicos, tratamiento de enfermedades oftalmológicas,

tales como lesiones corneales, lesiones retinianas o cataratas; reparación de cartílago, tratamiento del sistema osteoarticular, como en el caso de defectos osteocondrales, osteoartritis o defectos óseos, y como adyuvante en la resolución de enfermedades vaginales, tratamiento de gingivitis y periodontitis; uso en el desarrollo de sistemas de cultivo celular.

5 Las enfermedades condrales son un importante problema socioeconómico en todo el mundo. En este sentido, a pesar de la dificultad para registrar su incidencia, se estima que las lesiones articulares afectan a 500 millones de personas.

10 Las patologías condrales se producen como resultado de lesiones o enfermedades que, si no se tratan, pueden dar como resultado enfermedades degenerativas tales como la osteoartritis (OA).

La OA es uno de los tipos más comunes de artritis que afecta a 35-40 millones de personas en los Estados Unidos y en Europa. Es una enfermedad degenerativa que provoca la desintegración del cartílago acompañada por una
15 reacción en los huesos. Afecta generalmente a las manos, rodillas, caderas, pies y cuello, y en adultos, se considera una de las causas más comunes de incapacitación física.

El cartílago articular es un tejido avascular altamente especializado que protege al hueso de la articulación diartrodial frente a fuerzas asociadas con el peso y con impactos que conducen a fricciones entre las superficies articulares.
20 Este tejido está formado por un solo tipo celular, los condrocitos, y por una importante y rica matriz extracelular. Dicha matriz consiste en una red densa de fibras de colágeno de tipo II (molécula predominante) y, dentro de esta red, macroagregados de proteoglicanos, que contienen GAG tales como sulfato de condroitina, sulfato de queratano, ácido hialurónico y agregano.

25 La arquitectura especializada del cartílago y su capacidad de reparación limitada hace que el tratamiento de este tipo de lesiones sea muy complicado. La ausencia de vascularización hace que su capacidad regenerativa sea muy limitada, puesto que las células madre no pueden acceder a la zona dañada para contribuir en el proceso regenerativo.

30 En los últimos años, se han usado biomateriales biodegradables para el tratamiento de lesiones condrales. En este sentido, los polímeros sintéticos macroscópicos (de ácido láctico, ácido glicólico, caprolactona...) se han convertido en los grupos más importantes y numerosos de biomateriales. Sin embargo, estos materiales macroscópicos sólido requieren el uso de intervenciones quirúrgicas agresivas, tales como cirugía convencional. Para el fin de superar estas limitaciones, están desarrollándose actualmente nuevas biomatrices que pueden implantarse mediante
35 técnicas mínimamente invasivas, tales como mediante inyección o artroscopia.

Por tanto, una de las aplicaciones del biomaterial inyectable de la presente invención es la regeneración del cartílago articular dañado en los procesos degenerativos de la osteoartritis. El biomaterial de la presente invención puede administrarse fácilmente en la zona que va a regenerarse por medio de técnicas de inyección percutánea tales como
40 artroscopia, o por medio de cualquier dispositivo de inyección. Además de la fácil administración, el hidrogel inyectable tiene la propiedad de formar un implante estable que se ajusta al tamaño y la geometría del tejido deteriorado.

Otra aplicación del biomaterial de la presente invención es en el tratamiento de heridas. Las úlceras venosas, de decúbito y diabéticas crónicas son un importante problema que afecta a entre 3 y 6 millones de personas en los Estados Unidos. Esta patología afecta al 1-3% de la población de los países desarrollados y el 15% de los pacientes ingresados en hospitales padecen este estado. El gran número de pacientes que padecen estas lesiones produce considerables repercusiones socioeconómicas y sanitarias, estableciéndose por tanto un alto coste de tratamiento, y alterándose considerablemente la calidad de vida del paciente.

50 Las úlceras son traumatismos que tienen un efecto profundo sobre el organismo con una fisiopatología considerablemente compleja. Se produce una interacción sinérgica compleja entre los fibroblastos (células de la dermis), los queratinocitos (células de la epidermis), la matriz extracelular y proteínas derivadas del plasma en el lecho de la herida. La evolución a través de las diferentes fases de cicatrización de heridas: hemostasia, inflamación,
55 reparación y remodelación, es típica, pero la naturaleza crónica y la reaparición de estas heridas es de importancia clínica. A pesar de la gran variedad de tratamientos y armazones disponibles hoy en día, la eficacia de cicatrización y la tasa de cicatrización continúan siendo extremadamente bajas, necesitándose por tanto tratamientos más eficaces que puedan lograr una rápida cicatrización de heridas. El conocimiento progresivo adquirido sobre la fisiopatología de las úlceras crónicas en los últimos años ha facilitado la generación y el desarrollo de nuevos
60 armazones que son avances significativos en el tratamiento de esta enfermedad. Aunque, hasta ahora, no hay ningún armazón ideal para cubrir la piel; dicho armazón debe cumplir con una serie de características básicas tales como: 1) rápida adhesión a la herida, 2) proporcionar una función de barrera eficaz frente a la pérdida de fluidos, 3) elasticidad mecánica y estabilidad a largo plazo, 4) fácil de esterilizar, 5) fácil de manipular y transportar y 6) deben ser inocuos.

En resumen, el biomaterial de la presente invención tiene la mayoría de las características necesarias para que un armazón o diluyente sea eficaz en el tratamiento de las enfermedades mencionadas. En este sentido, para el fin de evaluar el efecto terapéutico de los presentes biomateriales, se han llevado a cabo estudios experimentales *in vivo*, tal como se describe en los ejemplos 9 y 10.

Ejemplos

Ejemplo 1. Obtención de la gelatina de Wharton.

Se realizó el siguiente ejemplo con cordones umbilicales de fuentes tanto humanas (no reivindicadas) como porcinas. Para aislar los GAG a partir de la GW de los cordones umbilicales respectivos, se siguió el procedimiento indicado a continuación.

En cada caso, se recogieron 50 g de cordón umbilical inmediatamente después del parto en un frasco estéril en el que se habían depositado previamente 300 ml de PBS a una concentración 1X (para 1 litro de H₂O: 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄, 0,24 g de KH₂PO₄, pH = 7,4 en 1 l de H₂O) y 3 ml de una mezcla de antibióticos de penicilina (30.000 unidades), estreptomicina (30.000 µg) y anfotericina B (5 µg) (LONZA, ref.: 17-745E) a una concentración 1X. Los cordones umbilicales pueden conservarse a 4°C durante no más de 24 horas hasta su procesamiento, pero en este ejemplo los cordones umbilicales se procesaron inmediatamente después de recibirse.

Para el procesamiento, los cordones umbilicales se mantuvieron en condiciones estériles en una campana extractora de flujo laminar de nivel de bioseguridad II y se sometieron a lavados sucesivos para eliminar por completo los residuos de sangre que contenían. Para ello, se colocaron en dos recipientes, en los que se añadieron 300 ml de PBS 1X (para 1 litro de H₂O: 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄, 0,24 g de KH₂PO₄, pH = 7,4 en 1 l de H₂O) que contenía 3 ml de una mezcla de antibióticos de penicilina (30.000 unidades), estreptomicina (30.000 µg) y anfotericina B (75 µg) (LONZA, ref.: 17-745 E); se agitaron manualmente inclinando verticalmente el frasco 5 veces durante 10 segundos, y se desechó el líquido, repitiéndose esta operación al menos 3 veces hasta que se retiró la mayor parte de la sangre. Después, se lavaron los cordones umbilicales con 500 ml de una disolución de lisis de eritrocitos a una concentración 1X (para 1 litro de H₂O: 8,99 g de NH₄Cl, 1 g de KHCO₃, 37 mg de EDTA, pH 7,3) hasta la eliminación completa de los residuos de sangre.

Una vez que se limpió de sangre la superficie de los cordones umbilicales, se transfirieron a una placa Petri de 10 cm y se cortaron con tijeras estériles en fragmentos de 1-2 cm. Puesto que se liberó sangre retenida en los vasos sanguíneos mientras que se cortaban los cordones umbilicales en fragmentos, se añadieron 10 ml de PBS 1X que contenía 1 ml de una mezcla de los antibióticos (10.000 unidades), estreptomicina (10.000 µg) y anfotericina B (25 µg) para limpiar meticulosamente dichos fragmentos, y se presionó la superficie del fragmento contra su superficie de soporte, realizando movimientos de desplazamiento horizontal a lo largo del fragmento con un bisturí estéril. Este proceso se repitió hasta que se eliminaron todos los residuos de sangre del interior. Se transfirieron los fragmentos de cordón umbilical completamente limpios a un tubo estéril y se procesaron inmediatamente, aunque si es necesario, pueden criopreservarse indefinidamente a -80°C.

Después, se retiraron mecánicamente, la membrana que rodeaba los cordones umbilicales y los vasos sanguíneos ubicados en los mismos. Para ello, se abrieron longitudinalmente los trozos de cordón umbilical y con la ayuda de un bisturí y pinzas se retiraron cuidadosamente tanto los vasos sanguíneos como la membrana del cordón umbilical. La sustancia gelatinosa que se obtuvo como consecuencia de esta separación mecánica es la GW. Se obtuvieron 25 g de GW.

Ejemplo 2. Extracción de GAG a partir de gelatina de Wharton.

Se realizó el siguiente ejemplo con cordones umbilicales de fuentes tanto humanas como porcinas. Se utilizó un protocolo descrito para obtener GAG a partir de cartílago humano, con algunas modificaciones, para obtener GAG a partir de la GW del cordón umbilical (Rogers *et al.*, 2006).

Se sumergieron ambas GW obtenidas en el ejemplo 1 en 20 ml de la disolución de tampón de extracción (242 µl de L-cisteína 200 mM, 1,42 ml de tampón de Na₂HPO₄ 704 mM, 100 µl de EDTA 0,5 M, 10 mg (14 U/mg), pH 7,5) papaína (SIGMA, ref.: P4762) y se mantuvieron a 60°C durante 12 horas para digerir completamente la GW, y una vez que se digirieron, se centrifugaron las muestras a 1.500 g durante 5 minutos para eliminar el residuo de la digestión. Se observó que los volúmenes de digestión eran de aproximadamente 30 ml, aproximadamente 10 ml más que el volumen inicial de 20 ml, debido a la disolución de los GAG presentes en la GW y por tanto debido a la liberación del agua que éstos habían acumulado.

Una vez que se centrifugaron las muestras, se transfirió el sobrenadante a otro tubo y después se precipitaron los GAG presentes en las muestras.

Ejemplo 3. Precipitación y aislamiento de GAG a partir de la GW del cordón umbilical.

Se precipitaron los GAG de la GW presentes en el sobrenadante del ejemplo 2 con 5 volúmenes de etanol al 100%.
 5 Por medio de esta etapa, se precipitaron los GAG de las muestras así como las sales presentes en las mismas. Esto se debe al hecho de que las moléculas de agua presentes en las muestras interaccionan con las moléculas de etanol, de manera que las moléculas de agua no pueden interaccionar con los GAG de las muestras. Se dejaron precipitar los GAG durante 12 horas a -20°C. Una vez que precipitaron, se centrifugaron a 1.500 g durante 5 minutos, eliminándose por tanto todo el etanol al 100%. Se lavó el precipitado con 5 volúmenes de etanol al 75%
 10 para eliminar las posibles sales residuales que pudiesen haber precipitado en la muestra. Después, se centrifugó durante aproximadamente 5 minutos a 1.500 g y se eliminó completamente el sobrenadante.

Una vez que hubieron precipitado las muestras, se dejó secar el residuo sólido durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiental hasta que se hubo evaporado todo el etanol. La cantidad de GAG que precipitan
 15 partiendo de una muestra de aproximadamente 25 g de GW puede oscilar entre 50 y 300 mg, dependiendo del material de partida. En estos casos específicos, se obtuvieron aproximadamente 250 mg de precipitado de GAG. Para obtener el hidrogel de la presente invención, se resuspendieron los precipitados de GAG en 1 ml de H₂O Milli-Q y se conservaron a 4°C.

Ejemplo 4. Producción de un hidrogel inyectable que contiene GAG de la GW del cordón umbilical.

El contenido acuoso del hidrogel puede ser de desde el 10% hasta 100 veces su propio peso, dependiendo de la viscosidad requerida para su aplicación.

El hidrogel obtenido tras la resuspensión de los GAG precipitados en 1 ml de H₂O se resuspendió en una disolución
 25 de suero fisiológico inyectable y se dejó agitar moderadamente en un vórtex hasta que se produjeron la disolución y homogeneización completas. Una vez que se disolvió el hidrogel, se conservó a 4°C.

Ejemplo 5. Producción de un hidrogel reticulado que contiene GAG a partir de la GW del cordón umbilical.

Para producir un hidrogel más consistente y estable, se siguió el procedimiento descrito en la bibliografía (Cui *et al.*,
 30 2006). Se preparó una disolución acuosa a partir de los extractos de GAG obtenidos a partir de la GW según el ejemplo 3. Específicamente, se preparó una disolución de GAG en H₂O al 1%. Para ello, se añadieron 10 ml de H₂O a los 200 mg de GAG obtenidos tras su precipitación y aislamiento (ejemplo 3). Se añadieron 1,2 g de dihidrazida adipica (ADH) a la disolución y se ajustó el pH de la disolución a pH = 3,5 con HCl 0,1 N. Una vez que se ajustó este
 35 pH, se añadieron 0,6 g del fijador, EDC (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil-carbodiimida) (SIGMA, ref.: E6383), a la disolución. Se mantuvo la mezcla entre 30 minutos y 1 hora con agitación constante a la temperatura ambiental hasta que se obtuvo el hidrogel estable.

Una vez que se formó el hidrogel estable, se lavó 3 veces con PBS 1X (para 1 litro de H₂O: 8 g de NaCl, 0,2 g de
 40 KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄, 0,24 g de KH₂PO₄, pH = 7,4 en 1 l de H₂O) 5 minutos cada vez para eliminar el exceso de EDC. Con respecto a la forma física del hidrogel, tendrá la forma del molde en que solidifica, de manera que pueden usarse placas de cultivo de 96, 48, 24, 12 y 6 pocillos, placas Petri o cualquier otro recipiente convencional con la forma deseada.

Adicionalmente, el hidrogel puede solidificarse en un recipiente grande tal como un vaso de precipitados, y una vez
 45 que se solidifica, el hidrogel puede cortarse con forma y grosor característicos. Específicamente, en este ejemplo el hidrogel solidificó en los pocillos de placas de 24 pocillos y una vez que solidificó se lavó 3 veces durante 5 minutos con 500 µl de PBS 1X.

En este caso el hidrogel reticulado en placas de 24 pocillos, se liofilizó según técnicas convencionales.

En este ejemplo, se analizó la estructura tridimensional del hidrogel por medio de microscopía electrónica de barrido
 (MEB). Una vez que se liofilizó el hidrogel, se realizó lo siguiente: se cortó una sección del hidrogel liofilizado y se secó esta sección hasta el punto crítico con CO₂ en un secador AUTOSAMDRI-814 y se metalizó con oro en un
 55 pulverizador. Se observaron las preparaciones a una tensión de 20 KV en el microscopio electrónico de barrido JEUL (JSM35).

El análisis por MEB (figura 3) del hidrogel deshidratado indicó que tiene una estructura porosa uniforme. La
 60 micrografía muestra la existencia de una estructura tridimensional altamente porosa, con un diámetro de poro que oscila entre 0,5 y 500 µm. Este intervalo de poros implica la existencia de micro y macroporosidad. Los macroporos (300-500 µm) son necesarios para que se lleve a cabo una colonización celular adecuada, de modo que se concentra un alto número de células y de modo que coexisten diferentes tipos celulares, favoreciendo la formación de tejidos estructurados, por ejemplo, de modo que puede formarse una red vascular. Los poros intermedios permiten la integración celular. Los microporos (0,5-50 µm) son necesarios para la supervivencia celular, puesto que

son responsables de llevar a cabo la correcta difusión de gases, nutrientes y la eliminación de los productos de desecho que resultan del metabolismo celular. Se mide el tamaño de poro basándose en la escala métrica obtenida por medio del microscopio electrónico de barrido.

- 5 Este biomaterial muestra una mayor sensibilidad estructural, que está indicada para aplicaciones en las que no sólo se busca una naturaleza bioactiva y una acción trófica, sino también una estructura que pueda alojar temporalmente células hasta que se realice la reparación del tejido, tal como el tratamiento de úlceras y otras enfermedades dermoepidérmicas, la reparación de cartilago y tratamientos oftalmológicos, entre otros. Las células contenidas en el biomaterial pueden ser las de los tejidos adyacentes al sitio de implantación que han conseguido colonizar, o también células dispuestas *ex vivo* en el biomaterial antes de su aplicación clínica, de manera que se potencia su acción regenerativa.

- 15 Este biomaterial tiene una distribución homogénea de poros con un tamaño en un intervalo de 0,5-1000 micrómetros, determinado por medio de técnicas de microscopía electrónica de barrido. Este intervalo de porosidad es adecuado tanto para la difusión de gases y nutrientes a través de toda su estructura como para permitir que las células lo colonicen.

Ejemplo 6. Caracterización y cuantificación de GAG presentes en el biomaterial de la invención

- 20 Se analizaron y cuantificaron los diferentes GAG presentes en el biomaterial de la invención por medio de la técnica de espectrometría de masas (ESI/EM). Dado que por medio de esta técnica sólo pueden determinarse moléculas con un peso molecular de entre 200 y 2.000 Dalton y que las moléculas de GAG superan este intervalo en su mayor parte, en primer lugar se digirió enzimáticamente la muestra con el fin de obtener, por tanto, cadenas de GAG con un peso molecular de entre 200 y 2.000 Da.

- 25 Como patrón para la identificación y cuantificación de los GAG, se usaron compuestos comerciales patrón que representan cada GAG con una concentración conocida. Específicamente, los patrones usados para realizar la cuantificación de GAG fueron los siguientes: para el ácido hialurónico: la sal de potasio de ácido hialurónico (SIGMA, ref.: 53750); para el sulfato de condroitina: la sal de sodio de sulfato de condroitina (SIGMA, ref.: C4384); para el sulfato de dermatano: la sal de sodio de sulfato de dermatano (SIGMA, ref.: C3788); para el sulfato de queratano: sulfato de queratano (CHEMOS, ref.: 7295); para la heparina: la sal de sodio de heparina (SIGMA, ref.: H8537); y para el sulfato de heparano: la sal de sodio de sulfato de heparano (SIGMA, ref. 51541).

- 35 Basándose en los resultados obtenidos para cada patrón de GAG usado, se obtuvieron los valores de la cuantificación de GAG presentes en la muestra.

Con el fin de realizar la digestión enzimática de los GAG, se siguió el procedimiento descrito en la bibliografía (Mahoney *et al.*, 2001). Para ello, se usaron las enzimas específicas para la digestión de cada GAG.

- 40 Para el ácido hialurónico, se usó hialuronidasa (SIGMA, ref.: H3506); para el sulfato de condroitina, se usó condroitinasa (SIGMA, ref.: C2780); para el sulfato de dermatano, se usó condroitinasa B (SIGMA, ref.: C8058); para la heparina, se usó heparinasa I (SIGMA, ref.: H2519); para el sulfato de heparano, se usó heparinasa I (SIGMA, ref.: H2519); para el sulfato de queratano, se usó queratanasa (K2876).

- 45 Estas enzimas se prepararon resuspendiendo 440 U de la enzima correspondiente en 10 ml del siguiente tampón: 2 ml de tampón fosfato 100 mM pH = 7,77, 770 µl de NaCl 1 M, 1 mg de BSA y 7,23 ml de H₂O.

- 50 El tampón de digestión enzimática se preparó con una concentración de enzima de 160 U/ml tal como sigue: se añadieron 4,5 ml de enzima (2000 U) a 7,5 ml de tampón de digestión, 1,5 ml de NaCl 1 M, 0,333 ml de acetato de sodio 3 M, pH = 5,2 y 5,67 ml de H₂O. Las muestras y los patrones que iban a someterse a digestión enzimática se prepararon tal como sigue: se añadieron 500 µl de tampón de digestión (80 U de enzima) a 500 µl de patrón para cada GAG a una concentración de 2 mg/ml, de manera que la disolución final del patrón estaba a una concentración de 1 mg/ml. Se realizó lo mismo con la muestra de GAG: se añadieron 500 µl de tampón de digestión (80 U de enzima) a 500 µl de la muestra de GAG.

- 55 Las muestras se digirieron a 37°C durante 1 hora, después de cual, se inactivó la enzima por medio de desnaturalización térmica a 60°C durante 5 minutos.

- 60 Una vez que se realizaron las digestiones, las muestras y los patrones se analizaron por medio de espectrometría de masas. La espectrometría de masas es una metodología experimental usada para determinar la razón de masa con respecto a carga de determinados iones presentes en la muestra que va a analizarse. El espectrómetro de masas consiste en 3 componentes básicos: fuente de iones, analizador de masa y detector. La muestra que va a analizarse se ioniza por medio de las fuentes de iones, se separan en el analizador de masa y se detectan para producir un espectro de masas, en el que se muestran los valores de masa con respecto a carga en comparación con la

abundancia relativa de una especie iónica específica.

Específicamente, en este ejemplo se llevó a cabo la inyección de muestras en el espectrómetro de masas tal como sigue: se inyectaron 20 µl de las muestras a un caudal de 0,2 ml/minuto directamente en el detector de masas/masas (modelo LCQ de Thermo). Se usó el método de ionización por electropulverización negativa (ESI/EM) y se fijó el tiempo del cromatograma en 10 minutos. Se seleccionaron los iones moleculares con un intervalo de ± 6 Da, correspondientes, según la bibliografía (Mahoney *et al.*, 2001), al peso molecular de cadenas reconocidas para cada tipo de GAG. Dichos iones seguían estando presentes tanto en la muestra de GAG patrón como en la muestra que iba a analizarse, de modo que se demostró por tanto cualitativamente la presencia de cada GAG en la muestra. Para garantizar la reproducibilidad de los resultados, se inyectaron las muestras y los patrones por duplicado.

Para la cuantificación de los diferentes GAG, se obtuvo una recta patrón para el patrón para cada GAG a 1 mg/ml. La recta patrón obtenida consistía en las siguientes concentraciones de cada uno de los GAG patrón (ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, heparina, sulfato de heparano y sulfato de queratano) usados para obtener las rectas patrón: 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 100 µg/ml y 0 µg/ml. Se llevaron a cabo las diluciones de la recta patrón con H₂O y se usó una mezcla que contenía proporciones iguales de tampón de digestión enzimática y H₂O como blanco de la recta.

Los resultados de la cualificación y las proporciones de cada GAG en el biomaterial de la invención son los siguientes, teniendo en cuenta que el origen del biomaterial es natural, lo que implica la existencia de variaciones en su composición (figura 1):

70% de ácido hialurónico

10% de sulfato de queratano

7% de 6-sulfato de condroitina

5% de sulfato de heparano

4% de 4-sulfato de condroitina

3% de sulfato de dermatano

1% de heparina

Ejemplo 7. Estudio histológico para determinar la presencia de restos celulares en el biomaterial

El biomaterial de la invención contiene una combinación de GAG de un origen natural. Este origen natural potencia su efecto regenerativo y su efecto sobre la actividad celular, puesto que las estructuras de los GAG y las interacciones entre ellos son similares a como se encuentran en la matriz extracelular en condiciones fisiológicas.

El cordón umbilical es un tipo de tejido que presenta de poca a ninguna inmunogenicidad, de hecho, se considera el uso heterólogo de las células madre contenidas en la GW para tratamientos en varios trabajos. También existen trabajos en los que se desarrollan sistemas arteriales o venosos a partir de la vasculatura del cordón umbilical, también para uso heterólogo. Sin embargo, para garantizar que el biomaterial de la invención está libre de células y de restos celulares, que pueden provocar reacciones inflamatorias o reacciones de rechazo de implantes, se han realizado tinciones histológicas con hematoxilina-eosina, azul alciano y verde de metilo-pironina (figura 2).

Hematoxilina-eosina: ésta es la tinción histoquímica más ampliamente usada a nivel histopatológico. Permite observar células y componentes celulares. La hematoxilina presenta afinidad por los componentes ácidos de la célula, especialmente ácidos nucleicos, y la eosina presenta afinidad por las zonas básicas, permitiendo una buena observación del citoplasma celular. Se tiñeron preparaciones de la muestra de GAG (figura 2B) y se usaron extensiones de células como control positivo (figura 2A).

El procedimiento que se llevó a cabo para realizar la tinción con hematoxilina-eosina fue el siguiente: se extendió una muestra de GAG sobre un portaobjetos con la ayuda de bastoncillo estéril, y se dejó secar la extensión durante al menos 24 horas. Una vez que se secaron los portaobjetos, las extensiones se fijaron con metanol al 70% durante 5 minutos. Después de este tiempo, se eliminó el fijador mediante lavado con H₂O. Se tiñeron los portaobjetos con hematoxilina durante 3 minutos (PANREAC, disolución de hematoxilina de Harris DC). Después de este tiempo, se eliminó el colorante en exceso mediante lavado con H₂O. Se hicieron pasar todos los portaobjetos a través de H₂O con HCl al 0,5% para eliminar los enlaces inespecíficos del colorante. Se lavaron los portaobjetos con H₂O. Se tiñeron los portaobjetos con eosina (al 0,5% en H₂O) durante 30 segundos. Se lavaron los portaobjetos con H₂O para eliminar el exceso de eosina. A la preparación se añadieron varias gotas del medio de montaje Fluoromount-G

(SOUTHERN BIOTECH, ref.: 0100-01), se cubrió con un cubreobjetos y se observó con un microscopio.

Los resultados de la tinción con hematoxilina-eosina (figura 2, imágenes A y B) indican la ausencia de células en la muestra de GAG analizados.

5 Azul alciano: el azul alciano es uno de los principales colorantes catiónicos (contiene cargas positivas en su molécula), que se unen a sitios con cargas negativas de los polisacáridos con radicales sulfato, fosfato o carbonato que forman parte de proteoglicanos. Estos enlaces electrostáticos dependen del pH del medio; a un pH neutro, el colorante se une a proteoglicanos con radicales neutros; a pH ácido, se une a proteoglicanos sulfatados; y a pH

10 básico, se une a proteoglicanos de fosfato. A pH = 1, el azul alciano se une a proteoglicanos débil y fuertemente sulfatados, que contienen sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de heparano y sulfato de queratano que forman parte de GAG de gelatina de Wharton. Se tiñeron preparaciones de la muestra de GAG (figura 2F) y se usaron extensiones de células como control (figura 2E).

15 El procedimiento que se llevó a cabo para realizar la tinción con azul alciano en este ejemplo en particular fue el siguiente:

Una muestra de GAG se extendió sobre un portaobjetos con la ayuda de bastoncillo estéril, y se dejó secar la extensión durante al menos 24 horas. Una vez que se secaron los portaobjetos, se fijaron las extensiones con metanol al 70% durante 5 minutos. Después de este tiempo, se eliminó el fijador mediante lavado con PBS 1X. Se

20 sumergieron los portaobjetos en HCl 0,1 N, pH = 1 durante 5 minutos. Después de este tiempo, se tiñeron con azul alciano al 1% en HCl 0,1 N, pH = 1 durante 2 horas. Se sumergieron los portaobjetos en HCl 0,1 N, pH = 1 durante 5 minutos y se lavaron inmediatamente con H₂O para eliminar el colorante en exceso. A las preparaciones se añadieron varias gotas del medio de montaje Fluoromount-G (SOUTHERN BIOTECH, ref.: 0100-01), se cubrieron

25 con un cubreobjetos y se observaron con un microscopio. Los resultados de la tinción con azul alciano (figura 2, imágenes E y F) indican la presencia de GAG en la muestra analizada de biomaterial.

Verde de metilo-pironina: esta tinción se usa para la investigación histológica del ácido nucleico contenido en tejidos, así como para demostrar la presencia de células linfáticas y células plasmáticas. También es útil en la identificación

30 de células plasmáticas y ARN en secciones de tejido y preparaciones citológicas. La pironina tiñe el citoplasma de las células plasmáticas y la mayoría de los nucleolos de color rojo. El verde de metilo tiñe el ADN con un color verde azulado (purpúreo). Se tiñeron preparaciones de la muestra de GAG (figura 2D) y se usaron extensiones de células como control (figura 2C).

35 El procedimiento que se llevó a cabo para realizar la tinción con verde de metilo-pironina en este ejemplo en particular fue el siguiente:

Una muestra de GAG se extendió sobre un portaobjetos con la ayuda de un bastoncillo estéril, y se dejó secar la extensión durante al menos 24 horas. Una vez que se secaron los portaobjetos, se fijaron las extensiones con metanol al 70% durante 5 minutos. Después de este tiempo, se eliminó el fijador mediante lavado con H₂O. Se

40 sumergieron los portaobjetos en HCl 0,1 N, pH = 1 durante 5 minutos. Después de este tiempo, se tiñeron con verde de metilo-pironina durante 5 minutos (verde de metilo al 0,012% en H₂O, pironina al 0,01% en H₂O, metanol al 0,75%) y se lavaron inmediatamente con H₂O para eliminar el colorante en exceso. A las preparaciones se añadieron varias gotas del medio de montaje Fluoromount-G (SOUTHERN BIOTECH, ref.: 0100-01), se cubrieron

45 con un cubreobjetos y se observaron con un microscopio. Los resultados de la tinción con verde de metilo-pironina (figura 2, imágenes C y D) indican la ausencia de ácidos nucleicos en la muestra analizada de GAG.

Ejemplo 8. Pruebas de citotoxicidad con varios tipos celulares sobre el biomaterial de la invención.

50 El requisito principal para que un biomaterial pueda usarse para implantación o como matriz para ingeniería de tejidos es la ausencia de citotoxicidad.

Con el fin de verificar que el biomaterial de la invención no provoca efectos tóxicos, se determinó la citotoxicidad por medio del método de MTT (Roche Diagnostics, EE.UU.), validado por el ECVAM (Centro Europeo para la Validación

55 de Métodos Alternativos) sobre las células dispuestas en el biomaterial de la invención. Los tipos celulares usados están asociados con las patologías a las que se dirige el biomaterial, tales como, queratinocitos y fibroblastos cutáneos, osteoblastos óseos, condrocitos de cartílago y células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo, así como la línea celular indicada en la norma ISO 10993 para ensayos de toxicidad de L929.

60 El ensayo MTT se basa en la capacidad que tienen las enzimas mitocondriales de las células vivas para transformar determinados sustratos en otros metabolitos secundarios. La cantidad de compuesto formado depende de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial, que es un claro indicador del número de células viables que existen en el cultivo.

Específicamente, esta prueba mitocondrial, usando el kit de proliferación celular I (MTT) n.º de cat. 1 465 007 Roche, determina la transformación llevada a cabo por la deshidrogenasa mitocondrial celular de succinatos de sal de tetrazolio (de color amarillo) en cristales de formazano insolubles (de color azul). Posteriormente, se permeabilizan las células y se solubilizan los cristales formados, lo que conduce a una disolución coloreada que puede cuantificarse midiendo su absorbancia en un lector de microplacas de ELISA a una longitud de onda de 550 nm. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.

El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

1. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con 50 µl de biomaterial en cada pocillo a una densidad de 2.000-5.000 células/pocillo dependiendo del tipo celular. Se ha determinado previamente la concentración de células adecuada para cada tipo celular. Los fibroblastos, osteoblastos, condrocitos y células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo, todos procedentes de un cultivo primario de origen humano, se sembraron a una concentración de 4.000 células por pocillo, la línea de fibroblastos de ratón L929 se sembró a una concentración de 200 células por pocillo y los queratinocitos obtenidos a partir de piel humana en cultivo primario se sembraron a una concentración de 5.000 células por pocillo.
2. Se dejó que el cultivo se estabilizase a 37°C y con 5% de CO₂ durante 24 horas, antes de iniciar los ensayos de citotoxicidad. Este ensayo incluyó controles positivos (células + medio + material conocido que induce citotoxicidad, en este caso se usó poli(cloruro de vinilo) o PVC), control (células + medio de cultivo convencional), y células en contacto con el biomaterial de la invención.
3. Se permitió que se incubasen las células a 37°C en el incubador durante el periodo de tiempo indicado en el protocolo hasta que se llevaron a cabo las determinaciones, que en este caso eran a las 24, 48 y 72 horas de contacto.
4. Tras finalizar el periodo de incubación, se añadieron 10 µl de la disolución de MTT (0,5 mg/ml) al cultivo en cada pocillo por cada 100 µl de medio, y se incubó durante 4 horas a 37°C en el incubador.
5. Tras finalizar la incubación, pudieron observarse los cristales de formazano en el interior de las células. Se añaden 100 µl de la disolución de solubilización a cada cultivo o pocillo y se incubó a 37°C en el incubador durante la noche. Por tanto, se permeabilizaron las células y, por tanto, se solubilizaron los cristales con los 100 µg de solubilizador tal como se indica, lo que conduce a una disolución coloreada fácilmente cuantificable.
6. Una vez que se solubilizaron los cristales, se leyó la placa de cultivo directamente con un lector de ELISA a 550 nm. Antes de la lectura, es aconsejable limpiar la superficie inferior de la placa con etanol. Tal como puede observarse en la figura 4, el biomaterial de la invención no provocó efectos tóxicos sobre ninguna de las líneas celulares sometidas a prueba, no habiendo diferencias significativas con respecto al control.

Ejemplo 9. Uso del biomaterial de la invención en su forma inyectable para el tratamiento de osteoartritis

- Para la evaluación *in vivo* del efecto terapéutico del biomaterial de la invención en osteoartritis (OA), se usó el hidrogel obtenido en el ejemplo 3 y se resuspendió en una disolución de suero fisiológico inyectable que contenía condrocitos alogénicos, derivados de cartílago. Como modelo experimental se usaron conejos que se sometieron a resección del ligamento cruzado anterior en una de sus rodillas. Esta resección del ligamento se realizó por medio de artrotomía lateral. A continuación, con el fin de desestabilizar la rodilla, se esperó un periodo que osciló de meses a semanas, tiempo durante el cual en el cartílago se produjeron erosiones similares a las producidas por la osteoartritis. Además, como grupo de control, se usaron animales sin artrotomía en la rodilla.
- La superficie articular con herida se preparó por medio de lavado y desbridamiento mediante cirugía artroscópica y las lesiones se cubrieron con la mezcla de célula/biomaterial de la invención inyectable. Cuatro semanas después de depositar el biomaterial, los animales se sacrificaron y se extrajo el cartílago. El cartílago obtenido se fijó en paraformaldehído al 4% para su posterior procesamiento histológico. Para obtener las secciones histológicas, la muestra se incluyó en parafina, fin para el que se mantuvo durante 5 minutos en alcoholes al 50, 70, 90 y 100%. Posteriormente, las muestras se pusieron en citrosol durante 5 minutos y se incluyeron en parafina hasta obtener un bloque sólido. Usando un microtomo se obtuvieron secciones histológicas de 5 µm y usando estas secciones se realizó la tinción histológica y el inmunomarcaje.
- Se analizaron diferentes marcadores de la matriz extracelular del cartílago en las secciones histológicas por medio de técnicas inmunohistoquímicas. Las moléculas específicas de la matriz extracelular del cartílago y los marcadores moleculares estudiados fueron colágeno de tipo I y de tipo II, agregano y versicano. El inmunomarcaje se realizó usando anticuerpos monoclonales. La técnica usada para el marcaje de la sección de tejido era inmunomarcaje directo, usando anticuerpos monoclonales marcados con un fluorocromo. El marcaje se observó usando microscopía confocal.

Los resultados obtenidos demostraron que la combinación de biomaterial/célula inducía la regeneración del cartílago con herida puesto que:

- 5 - El biomaterial inyectable y su componente celular no provocaron toxicidad una vez que se implantaron, es decir, no se observaron fenómenos de inflamación a nivel macroscópico o microscópico en las secciones histológicas.
- El biomaterial se ajusta a la geometría y al tamaño de la herida que va a repararse y permanece en la zona de la implantación.
- 10 - No se observaron alteraciones en el fenotipo de las células del tejido sano junto a la zona del implante.
- La presencia de moléculas de la matriz extracelular específicas para cartílago, tales como colágeno de tipo II, en la zona del implante, indicó el inicio del proceso regenerativo con la formación de nueva matriz extracelular de la misma calidad que la del tejido nativo.
- 15

Estos hechos demuestran que el biomaterial de la invención, combinado con una terapia celular, promueve la regeneración del defecto condral, a diferencia de lo que ocurre en los animales de control, que no presentaron ningún signo de reparación de cartílago.

20

Ejemplo 10. Uso del biomaterial tridimensional

El biomaterial sólido de la invención obtenido en el ejemplo 5 tiene la mayoría de las características necesarias para que un apósito sea eficaz en la curación de una úlcera crónica. En este sentido, con el fin de evaluar el efecto terapéutico en úlceras crónicas, se ha llevado a cabo el estudio experimental *in vivo* usando ratones Swiss albinos que se sometieron a una abrasión térmica de aproximadamente 3 cm² en la zona dorsal. El grupo de control consistió en animales sometidos a este mismo tipo de herida pero tratados con un gel de ácido hialurónico comercial.

30 Para la aplicación del biomaterial de la invención, la superficie de la herida inducida se preparó por medio de lavado, desinfección y desbridamiento quirúrgico. Después se aplicó el biomaterial a la herida mediante inyección, donde cubrió y rellenó tanto en profundidad como superficialmente la zona afectada. Quince días después de colocar el biomaterial, los animales se sacrificaron y se extirpó la zona de la herida y se fijó en paraformaldehído al 4% para su posterior examen histológico. Para el procesamiento, la muestra se incluyó en parafina, fin para el que se mantuvo durante 5 minutos en alcoholes al 50, 70, 90 y 100%. Posteriormente las muestras se pusieron en citrosol durante 5 minutos y se incluyeron en parafina hasta obtener un bloque sólido. Usando un microtomo se obtuvieron secciones histológicas de 5 µm y usando estas secciones se realizó la tinción histológica y el inmunomarcaje.

40 En las secciones histológicas se analizaron diferentes marcadores de fenotipo epidérmicos, tales como queratina 5 y 10, marcadores de diferenciación, tales como involucrina y loricrina, el marcador dérmico vimentina y componentes de la matriz tales como laminina, por medio de técnicas inmunohistoquímicas. La técnica usada para el marcaje de la sección de tejido era inmunomarcaje directo, usando anticuerpos monoclonales marcados con un fluorocromo. El marcaje Se observó usando microscopía confocal.

45 Los resultados obtenidos demostraron que el biomaterial era eficaz en la regeneración de la úlcera puesto que:

- El biomaterial aplicado en la herida era inmunológicamente inerte y no se presentaron signos de toxicidad.
- El biomaterial se ajusta a la geometría y el tamaño de la herida que va a repararse, cubriendo completamente la zona afectada tanto en profundidad como superficialmente.
- 50 - A medida que avanza el proceso de cicatrización, se degradó el biomaterial y se sustituyó por componentes dermoepidérmicos.
- 55 - Las secciones histológicas mostraron que el biomaterial indujo la migración y proliferación de fibroblastos y queratinocitos, que siguieron siendo viables en el mismo.
- El biomaterial de la invención indujo una cicatrización de la herida que era el doble de eficaz con respecto a los animales control, y además la calidad del nuevo tejido cicatricial era significativamente mayor que la de los animales sin la aplicación del biomaterial de la invención.
- 60

Ejemplo 11: Viabilidad y actividad metabólica de células de cartílago articular y células madre mesenquimatosas (CMM) en cocultivo en la forma inyectable del biomaterial de la presente invención.

Para determinar la viabilidad y actividad metabólica, en placas de 24 pocillos se cultivaron 2×10^6 células en 800 μ l de 10 mg/ml del biomaterial de la presente invención. Los condrocitos y las CMM se conservaron en cultivo durante 7 días. A los 3 y 7 días, se realizó la tinción con colorante vital MTT, que tiñe las células que son metabólicamente activas, por tanto se obtiene una medida de la viabilidad celular.

Figura 6. Imagen de microscopía óptica invertida que muestra la viabilidad de células de cartílago articular (condrocitos) y CMM teñidas con MTT en cocultivo en el biomaterial de la presente invención. La tinción es tanto a los 3 días como a los 7. Las células teñidas de color negro son viables y metabólicamente activas. En resumen, basándose en los resultados presentados en la figura 6, el biomaterial de la presente invención conserva la viabilidad celular frente al control en el ensamblaje celular sometido a prueba.

Ejemplo 12: Capacidad proliferativa de células hechas crecer en la presente invención en comparación con ácido hialurónico (HA).

Se llevó a cabo la capacidad proliferativa de las células en el biomaterial de la presente invención y HA utilizando MTT, según la técnica descrita en el ejemplo 8. Las células sometidas a prueba incluyeron: condrocitos humanos, fibroblasto L-929, fibroblastos humanos y células madre mesenquimatosas de tejido adiposo humano (CMMa). Se observó proliferación a las 24, 48 y 72 horas de cultivo. Las figuras 7 y 8 ilustran ambas que la proliferación y supervivencia de células cultivadas es significativamente mayor en el biomaterial de la presente invención en comparación con HA a concentraciones similares.

Ejemplo 13: Afinidad y capacidad para el crecimiento tridimensional de células en el biomaterial de la presente invención en comparación con ácido hialurónico (HA).

Un objetivo de utilizar el biomaterial de la presente invención es potenciar el reclutamiento celular en la zona de lesión desde el tejido circundante así como actuar como vehículo para la aplicación de poblaciones celulares terapéuticas a una lesión. Por tanto, la importancia del biomaterial de la presente invención en el mantenimiento de la homeostasis celular es evidente.

Para determinar la capacidad de los condrocitos para formar agregados en el interior del biomaterial de la presente invención, se cultivaron 750k condrocitos por pocillo en placas de 6 pocillos con o bien 1,0 o bien 2,0 mg/ml del biomaterial de la presente invención. Setenta y dos horas después del inicio del cultivo, se observó que los condrocitos formaban agrupaciones en el hidrogel a 2,0 mg/ml de concentración mientras que no había agregaciones en el hidrogel a 1,0 mg/ml. Noventa y seis horas después del inicio del cultivo, se agregaron por completo los condrocitos en 2,0 mg/ml de biomaterial de la presente invención en agrupaciones mientras que aquéllos en el hidrogel de 1,0 mg/ml comenzaron a formar agrupaciones. En otras palabras, la agregación y formación de agrupaciones se producen fácilmente en la concentración superior del material de la presente invención en comparación con el control.

Las células dispuestas en contacto con el biomaterial de la presente invención demuestran una mayor afinidad por el biomaterial de la presente invención con respecto a la de las superficies de plástico de cultivo celular convencionales. Se desprenden de la placa de cultivo celular y migran hacia el biomaterial de la presente invención en el que forman agrupaciones viables. Sin embargo, cuando se usa la misma concentración de HA como control, las células demuestran una mayor afinidad por el plástico de cultivo celular. A las mismas concentraciones, existen diferencias sustanciales en la consistencia entre el biomaterial de la presente invención y el HA. El HA es menos viscoso que el biomaterial de la presente invención. La figura 9 ilustra este efecto migratorio observado en el biomaterial de la presente invención en comparación con el HA. Se usó el ensayo Live/Dead (células vivas/células muertas) para diferenciar las células viables (de color verde) de las células no viables (de color rojo). En conclusión, las células utilizadas en este experimento tienen una mayor afinidad por el biomaterial de la presente invención que por el plástico de cultivo celular, un hallazgo que no se repite para el HA y el plástico.

Ejemplo 14: una observación de la funcionalidad de las células cultivadas en la presente invención frente a las células cultivadas en HA.

En este ejemplo, se determinó la expresión de marcadores asociados con la regeneración de tejido.

Para determinar la expresión de diferentes marcadores de cartílago en CMM en el biomaterial de la presente invención y en el HA de control, las células se cultivaron en matraces T75 con $7,5 \times 10^5$ células por matraz en dos concentraciones diferentes del hidrogel (0,1 y 0,5 mg/ml) y HA. Después de cuatro días, se extrajo el ARN de las muestras mediante centrifugación de las células y posterior purificación del ARN con el minikit de aislamiento de ARN total Agilent (Agilent technologies, EE.UU.). Tras la extracción del ARN, se sintetizó ADNc y se llevó a cabo RT-PCR según protocolos convencionales para la expresión de colágeno de tipo II y versicano.

La figura 10 ilustra los resultados de los análisis de expresión génica de los factores de cartílago colágeno II y

versicano de CMM cultivadas en el biomaterial de la presente invención frente a un control de HA. El colágeno de tipo II forma la mayoría de la matriz de cartílago articular (90%) y es un marcador de la diferenciación celular hacia el fenotipo de condrocito. Las CMM cultivadas en el biomaterial de la presente invención comienzan la expresión de colágeno de tipo II tras 4 días de cultivo, un fenómeno no observado cuando se cultivan en HA. El versicano es un componente minoritario en la matriz extracelular de cartílago. Se considera un marcador de desdiferenciación o de pérdida del fenotipo de condrocito en células similares a condrocitos previamente. A medida que maduran las células dirigidas a condrocitos, expresan menos versicano y aumentan de manera concomitante su expresión de agregano, sulfato de condroitina y colágeno II. Las CMM en el biomaterial de la presente invención, en comparación con la población de control de células en HA de concentración coincidente, demuestran una reducción en la expresión del gen de versicano con y un aumento de la expresión de colágeno II. Por tanto, el biomaterial de la presente invención indica una inducción de diferenciación del fenotipo de condrocito o la capacidad para la síntesis de moléculas relacionadas con la regeneración de cartílago articular.

Ejemplo 15 Caracterización reométrica del biomaterial de la presente invención derivado de fuentes humanas y porcinas.

Se llevan a cabo de manera rutinaria caracterizaciones mecánicas de biomateriales con el fin de proporcionar información tanto relevante como comparativa sobre armazones para ingeniería de tejidos. Con los hidrogeles, los estudios mecánicos pueden proporcionar información importante sobre la idoneidad de un hidrogel para inyección usando diversas técnicas, o el grado de finalización de un proceso químico tal como reticulación.

En este ejemplo, se tomaron alícuotas de armazones de GAG aislados de GW tal como se describió anteriormente, en disoluciones al tres por ciento (1%, 5%, 10%) en volúmenes respectivos de 2 ml con el fin de evaluar el efecto de la concentración sobre parámetros reológicos. En el experimento se empleó un reómetro modelo AR2000ex de TA Instruments. En primer lugar, para cada muestra, se llevó a cabo un barrido de deformación con el fin de confirmar que cada muestra se sometía a prueba dentro de su intervalo viscoelástico lineal (datos no mostrados) en estudios posteriores que implicaban el módulo de almacenamiento y pérdida, así como la viscosidad.

Tras la determinación del intervalo viscoelástico lineal, se determinaron el módulo de pérdida, el módulo de almacenamiento y la viscosidad para cada muestra con frecuencia constante a lo largo de un barrido de temperatura fisiológicamente relevante que varió desde 20°C hasta 50°C. Los datos se representaron gráficamente y se muestran en las figuras 11 - 13.

En figura 11, los valores humanos de la concentración del 10% fueron mayores que los valores porcinos a la concentración del 10%. Los valores humanos al 5% superaron a los porcinos al 5%. Los resultados a concentraciones inferiores (1% para ambos, y 5% para porcinos) tuvieron una razón de señal con respecto a ruido inferior debido a las cualidades internas del cono del viscosímetro. Cuantitativa y cualitativamente, las muestras humanas comparadas en una base de gramos con las muestras porcinas presentaron mayores módulos. Además, se observó una ligera disminución en los módulos a lo largo del cambio de temperatura sometido a prueba; un hallazgo que concuerda con los efectos de temperatura viscoelásticos a temperatura cambiante bajo una frecuencia de oscilación constante. En figura 12, los resultados de los valores humanos superaron a los de las muestras porcinas a lo largo de las concentraciones respectivas. Los resultados a concentraciones inferiores (1% para ambos, y 5% para porcinos) tuvieron una baja razón de señal con respecto a ruido debido a las cualidades internas del cono del viscosímetro. Como en los resultados del módulo de almacenamiento, se observa una ligera disminución esperada en los módulos con la temperatura. Los valores del módulo de pérdida son mayores que los valores del módulo de almacenamiento en todos los casos respectivos, indicando por tanto el predominio de efectos viscosos sobre efectos elásticos. Esto es un hallazgo esperado dado que los GAG aislados son un hidrogel no reticulado con comportamiento de flujo inherente. Los resultados del módulo de pérdida para tres concentraciones diferentes del biomaterial de la presente invención derivan de fuentes porcinas y humanas. En la figura 13, los resultados de valores humanos superaron a los de las muestras porcinas a lo largo de las concentraciones respectivas. Los resultados a concentraciones inferiores (1% para ambos, y 5% para porcinos) tuvieron una baja razón de señal con respecto a ruido debido a las cualidades internas del cono del viscosímetro. Es posible un amplio intervalo de viscosidades a través de la variación de la concentración de las muestras aunque en una base por gramo, el hidrogel humano es sistemáticamente más viscoso. Una disolución al 10% del biomaterial humano de la presente invención en este ejemplo posee una viscosidad promedio similar a la del aceite de ricino.

En conclusión, simplemente ajustando la concentración de los GAG extraídos se dispone de una amplia variedad de viscosidades y módulos.

Ejemplo 16: Reclutamiento celular de los tejidos circundantes (quimiotaxia).

El objetivo de esta prueba era determinar la capacidad quimiotáctica del biomaterial de la presente invención para las células de un tejido. Para esto, se usaron muestras de cartílago humano de dos pacientes humanos diferentes. Como se ha probado que la concentración de 2 mg/ml es adecuada en pruebas de viabilidad y proliferación para

CMM y condrocitos, se utilizó esta concentración en el presente ejemplo. Se utilizaron placas no adherentes para evitar la presencia de un sustrato pro-unión. La configuración experimental fue la siguiente:

- Control negativo: fragmento en DMEM
- Ácido hialurónico: fragmento en HA a 2 mg/ml
- Material de interés: fragmento en el biomaterial de la presente invención hasta 2 mg/ml

Además, como control positivo, se utilizó una placa de lisis adhesiva. El tejido se cultivó en DMEM complementado con suero bovino fetal al 10%. Se captaron imágenes diariamente y se presentan en la figura 14. Los resultados no muestran células en ninguno de los controles ni en el fragmento expuesto a HA. Sin embargo, en el fragmento que estaba en el biomaterial de la presente invención, se observó que un gran número de células había migrado hasta la superficie exterior del cartílago desde el punto de tiempo inicial. Se utilizó el ensayo Live/Dead para determinar si las células que migraban hasta la superficie de los fragmentos de cartílago eran viables o no. Los resultados se muestran en la figura 15 e indican que la gran mayoría de las células que emergen de los fragmentos de cartílago son viables. Sin embargo, no se observó que las células migrasen desde la superficie de los fragmentos de cartílago hasta el biomaterial circundante de la presente invención.

Basándose en este conjunto de resultados, se puede llegar a la conclusión de que:

1. El biomaterial de la presente invención presenta la capacidad para reclutar células de cartílago a partir de tejido nativo.
2. Las células de cartílago que recluta el biomaterial de la presente invención son viables.

Puesto que podrían obtenerse diversas realizaciones posibles de la invención anterior, y puesto que podrían realizarse diversos cambios en las realizaciones expuestas anteriormente, ha de entenderse que todo el contenido descrito en el presente documento ha de interpretarse como ilustrativo y no en un sentido limitativo.

BILIOGRAFÍA

- Collins M. N, Birkinshaw C. 2008. "Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels". Journal of Material Science. Materials in Medicine, 19: 3335-3343.
- Coburn J. A, Pandit A. 2007. "Development of naturally-derived biomaterials and optimization of their biomechanical properties". Topics in Tissue Engineering, 3: 1-14.
- Cui F. Z, Tian W. M, Hou S. P, Xu Q. Y, Lee I. S. 2006. "Hyaluronic acid hydrogel immobilized with RGD peptides for brain tissue engineering". Journal of Material Science. Materials in Medicine, 17: 1393-1401.
- Danishefsky I, Bella Jr. A. 1996. "The sulfated mucopolysaccharides from human umbilical cord", J. of Biological Chemistry, 241: 143-146.
- Dawson J. I, Oreffo R. 2008. "Bringing the regeneration gap: stem cells, biomaterials, and clinical translation in bone tissue engineering". Archives of Biochemistry and Biophysics, 473: 124- 131.
- Elisseeff J, Ruffner M, Kim T. G, Williams C. 2005. "Cellular photoencapsulation in hydrogels". Culture of Cells for Tissue Engineering, Chapter 9.
- Goa K. L, Benfield P. 1994. "Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing." Drugs, 47: 536-566.
- Gogiel T, Galewska Z, Jaworski S. 2005. "Pre-eclampsia-associated alterations in Wharton's jelly proteoglycans". Acta Biochim Pol, 52: 501-507.
- Hadidian Z, Pirie N. W. 1948. "The preparation and some properties of hyaluronic acid from human umbilical cord". The Biochemical Journal, 42: 260-265.
- Hiles M, Hodde J. 2006. "Tissue engineering a clinically useful extracellular matrix biomaterial". Int Urogynecol Journal, 17: 39- 43.
- Ishihara M, Obara K, Ishizuka T, Fujita M, Sato M, Masuoka K, Saito Y, Yura H, Matsui T, Hattori H, Kikuchi M, Kurita A. 2002. "Controlled release of fibroblasts growth factors and heparin from photocrosslinked chitosan hydrogels and subsequent effect on in vivo vascularization". Journal of Biomedical Materials Research, 78: 364-

371.

- Jeanloz R. W, Forchielli E. 1950. "Studies on hyaluronic acid and related substances I. Preparation of hyaluronic acid and derivatives from human umbilical cord". *Journal of Biological Chemistry*, 186: 495-511.
- 5 - Kanematsu A, Yamamoto S, Ozeki M, Noguchi T, Kanatani I, Ogawa O, Tabata Y. 2003. "Collagenous matrices as release carriers of exogenous growth factors". *Biomaterials*, 25: 4513-4520.
- Laurent T. C, Fraser J. R. E. 1992. "Hyaluronan". *The FASEB Journal*, 6: 2397-2404
- 10 - Longaker M, Chiu E.S, Harrison M. R, Crombleholme, Langer J. C, Duncan B. W, Adzick N. S, Verrier E. D, Stern R. 1989. "Studies in fetal wound healing" *Annals of Surgery*, 210: 667-672.
- Mahoney D. J, Aplin R. T, Calabro A, Hascall V.C, Day A. J. 2001. "Novel methods for the preparation and characterization of hyaluronan oligosaccharides of defined length". *Glycobiology*, 11: 1025-1033.
- 15 - Malkowski A, Sobolewski K, Jaworski S, Bankowski E. 2007. "FGF binding by extracellular matrix components of Wharton's jelly". *Acta Biochim Pol*, 54: 357-363.
- 20 - Moore R. D, Schoenberg M. D. 1957. "Studies on connective tissue. I. The polysaccharides of the human umbilical cord". *A. M. A. Archives of pathology*, 64: 39-45.
- Pieper J. S, Oosterhof A, Dijkstra P.J, Veerkamp J. H, van Kuppevelt T.H. 1999. "Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate",
- 25 *Biomaterials*, 20: 847-858.
- Rabenstein D. L. 2002. "Heparin and heparin sulfate: structure and function". *Natural products reports*, 19: 312-331.
- 30 - Rogers B. A, Murphy C. L, Cannon S. R, and Briggs T. W. R. 2006. "Topographical variation in glycosaminoglycan content in human articular cartilage". *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 88: 1670-1674.
- Sobolewski K, Malkowski A, Bankowski E, Jaworski S. 2005. "Wharton's jelly as a reservoir of peptide growth factors." *Placenta*, 26, 747- 752.
- 35 - Toole B. P. 2004. "Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue". *Nature Cancer Reviews*, 4, 528-539.
- Torres D. S, Freyman T. M, Yannas I. V, Spector M. 2000. "Tendon cell contraction of collagen-GAG matrices in vitro: effect of cross-linking. *Biomaterials*, 21, 607-619.
- 40 - Trowbridge J. M, Gallo R. 2002. "Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan". *Glycobiology*, 12: 117-125.
- Ueno N, Chakrabarti B, Garg H. G. Hyaluronic acid of human skin and post-burn scar: heterogeneity in primary structure and molecular weight". 1992. *Biochem Int*, 26: 787-796.
- 45 - Wissink M. J. B, Beernink R, Pieper J. S, Poot A. A, Engbers G. H. M, Beugeling T, van Aken W. G, Feijen J. 2001. "Binding and release of basic fibroblast growth factor from heparinized collagen matrices", *Biomaterials*, 22: 2291-2299.
- 50

REIVINDICACIONES

1. Un biomaterial en forma de un hidrogel inyectable, que comprende un extracto de gelatina de Wharton del cordón umbilical de animales (no humanos), **caracterizado por que:**
 - dicho extracto consiste en la mezcla de glicosaminoglicanos (GAG) presentes en el cordón umbilical, que consiste en ácido hialurónico, sulfato de queratano, 6-sulfato de condroitina, sulfato de heparano, 4-sulfato de condroitina, sulfato de dermatano y heparina, y
 - dicho extracto carece de membrana de cordón umbilical, de vasos sanguíneos y de células o de restos de células, tal como se presentan originalmente en la gelatina de Wharton.
2. El biomaterial según la reivindicación 1, **caracterizado por que** comprende ácido hialurónico al 40-80% de la mezcla total de GAG.
3. El biomaterial según la reivindicación 1, **caracterizado por que** comprende sulfato de queratano al 2-25% de la mezcla total de GAG.
4. El biomaterial según la reivindicación 1, **caracterizado por que** comprende 6-sulfato de condroitina al 3-10% de la mezcla total de GAG.
- 5- El biomaterial según la reivindicación 1, **caracterizado por que** comprende sulfato de heparano al 1-9% de la mezcla total de GAG.
6. El biomaterial según la reivindicación 1, **caracterizado por que** comprende 4-sulfato de condroitina al 0,5-7% de la mezcla total de GAG.
7. El biomaterial según la reivindicación 1, **caracterizado por que** comprende sulfato de dermatano al 0,1-7% de la mezcla total de GAG.
8. El biomaterial según la reivindicación 1, **caracterizado por que** comprende heparina al 0,05-3% de la mezcla total de GAG.
9. El biomaterial según la reivindicación 1, **caracterizado por que** contiene: ácido hialurónico (70%), sulfato de queratano (10%), 6-sulfato de condroitina (7%), sulfato de heparano (5%), 4-sulfato de condroitina (4%), sulfato de dermatano (3%) y heparina (1%).
10. El biomaterial según las reivindicaciones 1-9, **caracterizado por que** el hidrogel inyectable tiene una viscosidad de 10 cS-150.000 cS.
11. El biomaterial según la reivindicación 10, **caracterizado por que** tiene una viscosidad de entre 10 y 15.000 cS.
12. El biomaterial según la reivindicación 11, **caracterizado por que** tiene una viscosidad de entre 10 y 2.000 cS.
13. El biomaterial según las reivindicaciones 1-10, **caracterizado por que** tiene una estructura tridimensional.
14. El biomaterial según la reivindicación 13, **caracterizado por que** tiene una estructura sustancialmente porosa con un diámetro de poro de 0,5-1000 µm.
15. El biomaterial según la reivindicación 14, **caracterizado por que** el diámetro de poro es de 0,5-500 µm.
16. El biomaterial según las reivindicaciones 1-15, **caracterizado por que** comprende adicionalmente células distintas de las originalmente presentes en la gelatina de Warthon.
17. El biomaterial según la reivindicación 16, **caracterizado por que** dichas células se seleccionan del grupo que consiste en células madre mesenquimatosas no diferenciadas o células madre mesenquimatosas diferenciadas en otra estirpe celular y/o células madre hematopoyéticas no diferenciadas o células madre hematopoyéticas diferenciadas en otra estirpe celular y/o condrocitos y/o condroblastos y/o osteoblastos y/o osteocitos y/o queratinocitos y/o fibroblastos y/o miocitos y/o adipocitos y/o neuronas y/u otras células del sistema nervioso y/o células del sistema de glóbulos blancos y/o células corneales y/o células endoteliales y/o células epiteliales.
18. Un biomaterial según cualquier reivindicación anterior, combinándose el biomaterial con un material de refuerzo para formar un material compuesto.

19. Un procedimiento para obtener el biomaterial según las reivindicaciones 1-18, **caracterizado por que** comprende las siguientes etapas:

- a) obtener un cordón umbilical de origen animal (no humano);
- b) tratar el cordón umbilical con una disolución salina y antibióticos;
- 5 c) eliminar toda la sangre de la superficie del cordón;
- d) fragmentar el cordón en secciones de 1-2 cm;
- e) limpiar toda la sangre retenida en el interior;
- f) eliminar la membrana del cordón umbilical y los vasos sanguíneos;
- 10 g) separar la sustancia gelatinosa que comprende la gelatina de Wharton;
- h) digerir enzimáticamente la sustancia gelatinosa obtenida;
- i) precipitar y aislar los GAG; y resuspender el precipitado sólido en H₂O Milli-Q para obtener un extracto acuoso que consiste en una mezcla de GAG que consiste en ácido hialurónico, sulfato de queratano, 6-sulfato de condroitina, sulfato de heparano, 4-sulfato de condroitina, sulfato de dermatano y heparina, y careciendo dicho extracto de membrana de cordón umbilical, de vasos sanguíneos y de células o de restos de células, tal como se
- 15 presentan originalmente en la gelatina de Wharton;
- j) Opcionalmente, reticular los GAG obtenidos en la etapa i).

20. El procedimiento para obtener el biomaterial según la reivindicación 19, **caracterizado por que** la reticulación es reticulación covalente y se lleva a cabo mediante cambios en la temperatura, reacciones químicas o fotopolimerización.

21. El procedimiento para obtener el biomaterial obtenido según la reivindicación 20, **caracterizado por que** la reticulación es iónica y se lleva a cabo mediante modificaciones de grupos laterales en componentes de GAG individuales en la GW.

22. El biomaterial según las reivindicaciones 1-18, para su uso en la remodelación, el relleno o la reconstrucción de tejidos blandos, el tratamiento de arrugas, pliegues y cicatrices, quemaduras, úlceras, aumento de tejidos blandos, lipoatrofia facial, enfermedades de los discos intervertebrales, reparación de cartílago, lesiones musculoesqueléticas, osteoartritis y periartritis; tratamiento de tumores, enfermedades vaginales, lesiones cerebrales, reparación de médula, trastornos degenerativos, enfermedades cardiovasculares y procesos de lubricación, como analgésico y antiinflamatorio; tratamiento de quemaduras, úlceras y defectos dermoepidérmicos, tratamiento de enfermedades oftalmológicas, tales como lesiones corneales, lesiones retinianas o cataratas; reparación de cartílago, tratamiento del sistema osteoarticular, como en el caso de defectos osteocondrales, osteoartritis o defectos óseos, y como un adyuvante en la resolución de enfermedades vaginales, tratamiento de gingivitis y periodontitis; y para su uso en el desarrollo de sistemas de cultivo celular.

FIG. 1

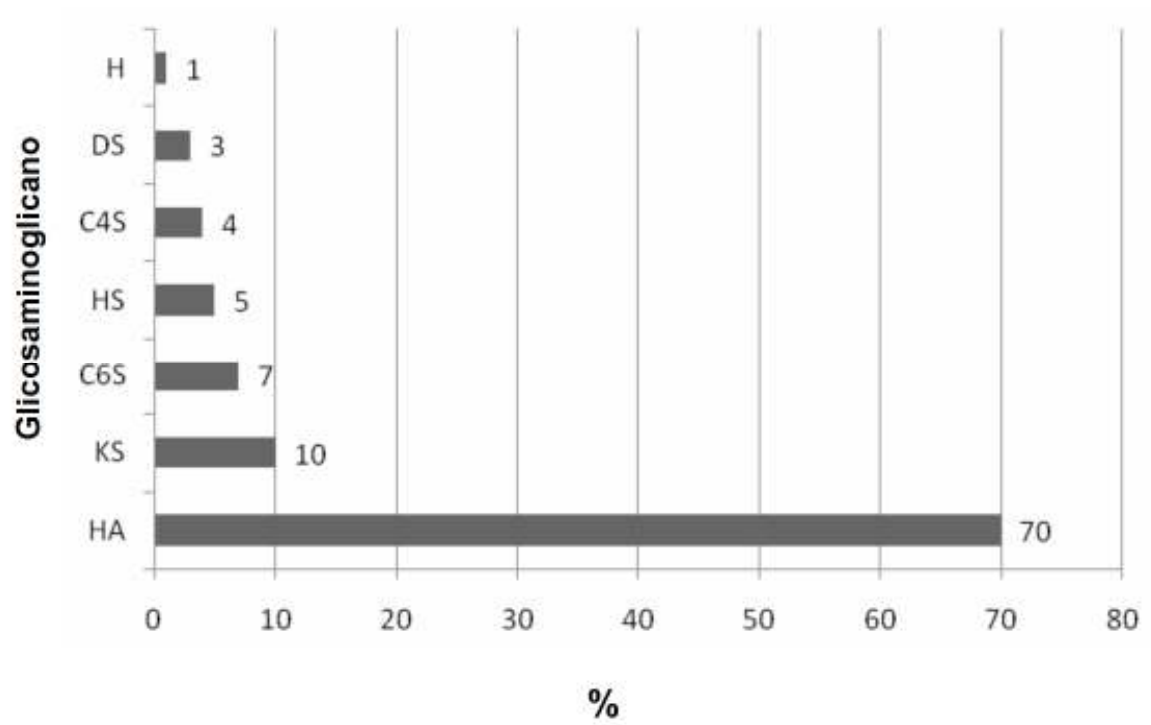


FIG. 2

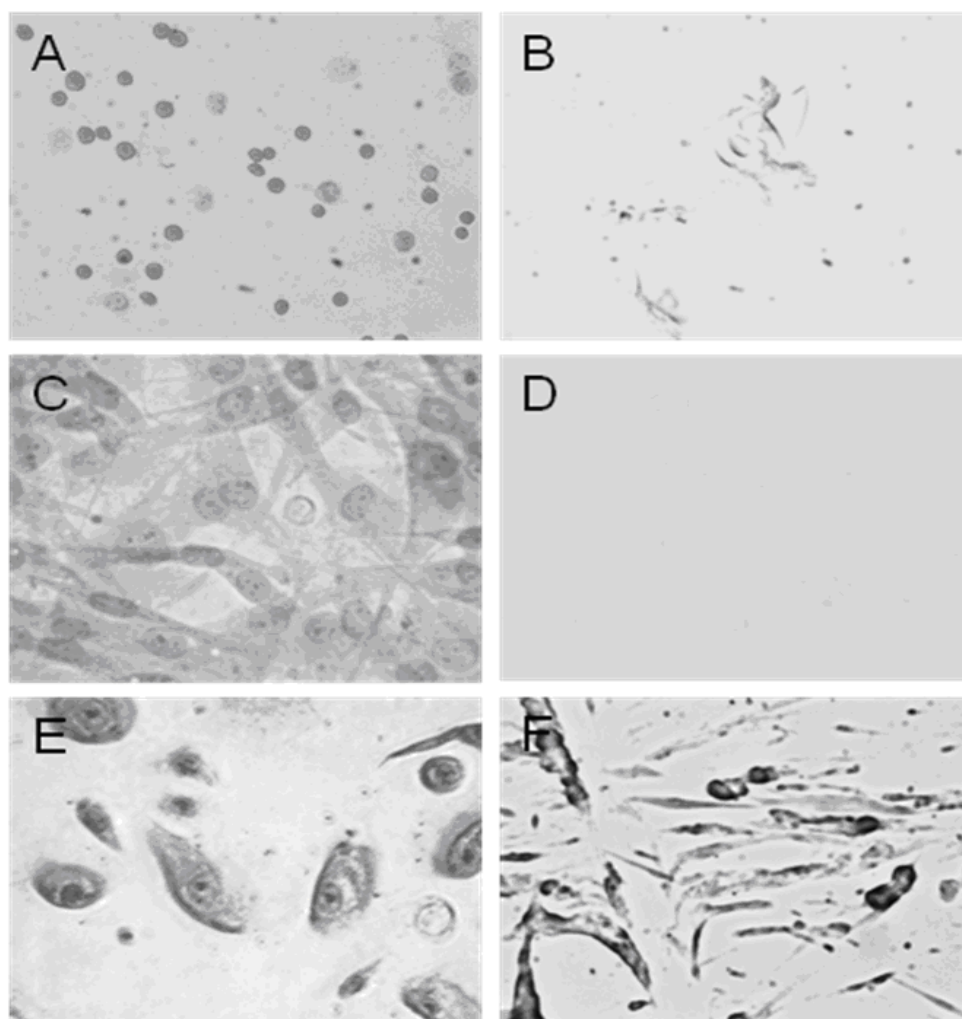


FIG. 3

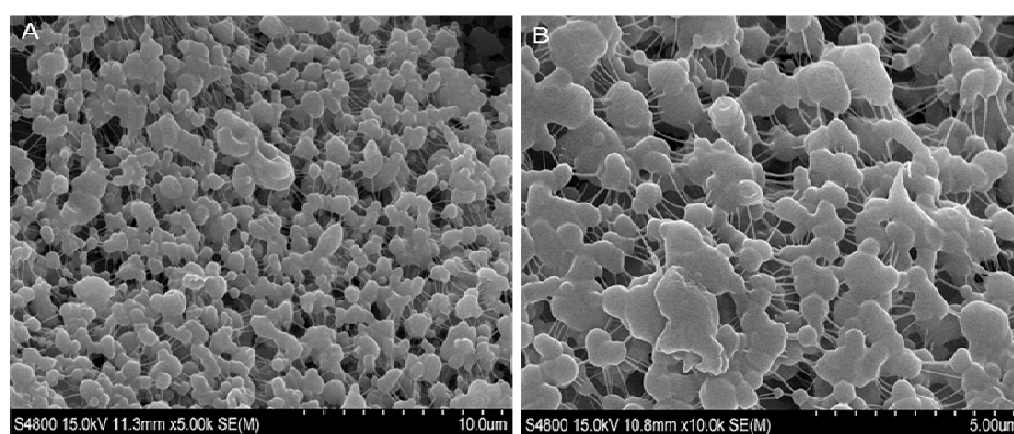


FIG. 4

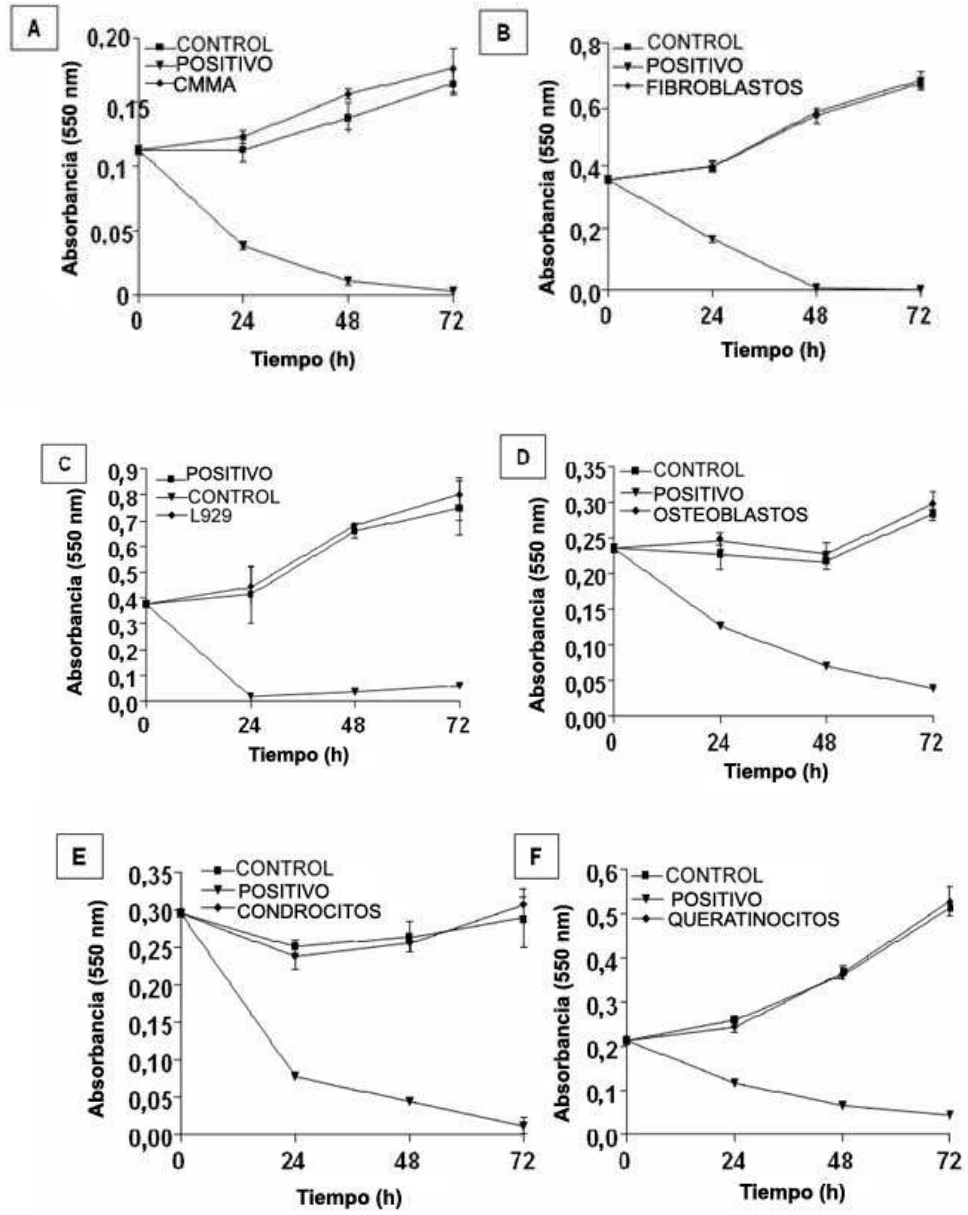


FIG. 5

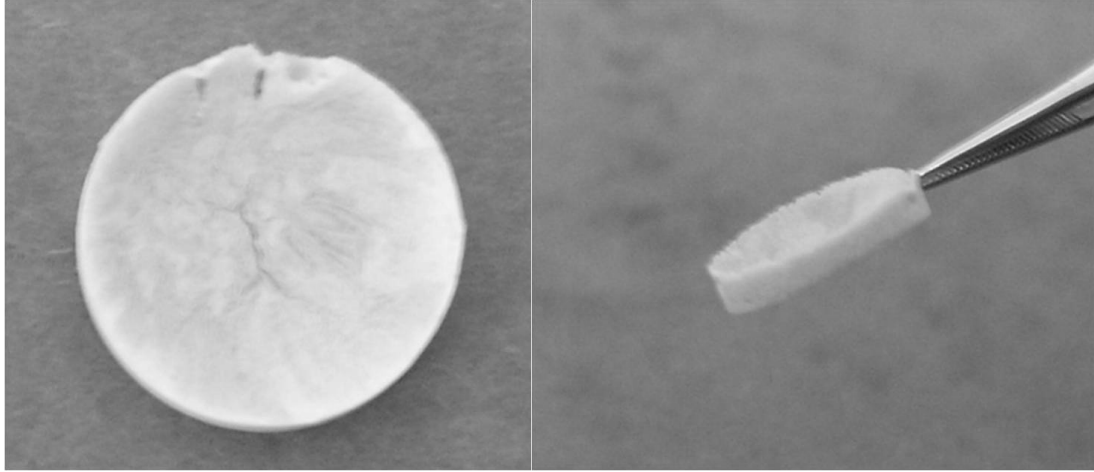


FIG. 6

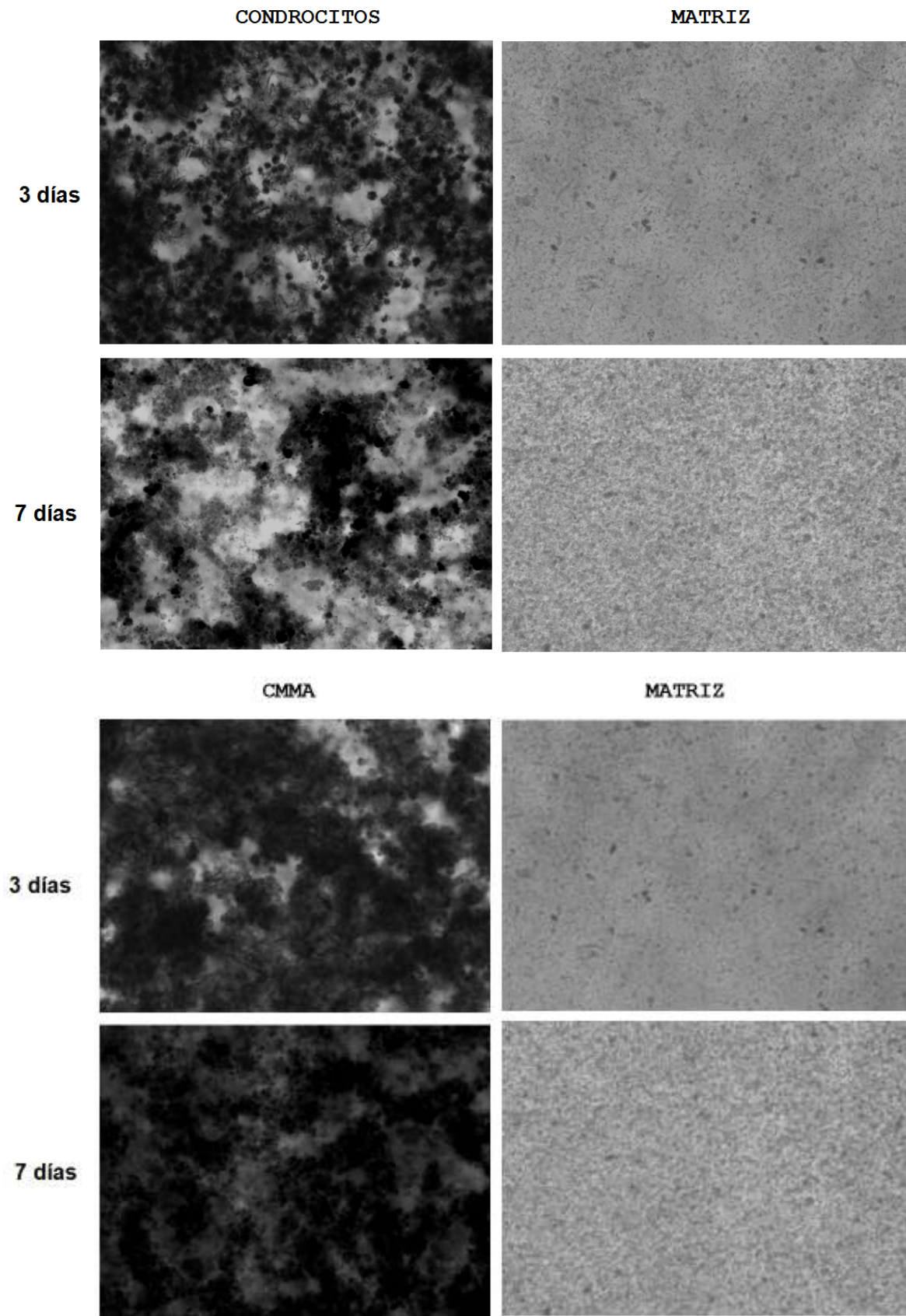


FIG. 7

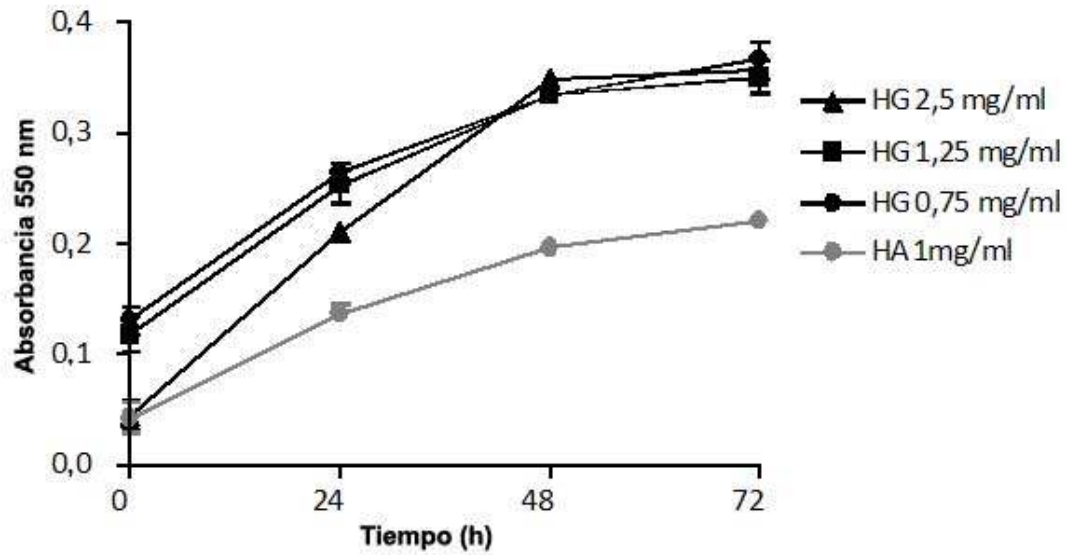


FIG. 8

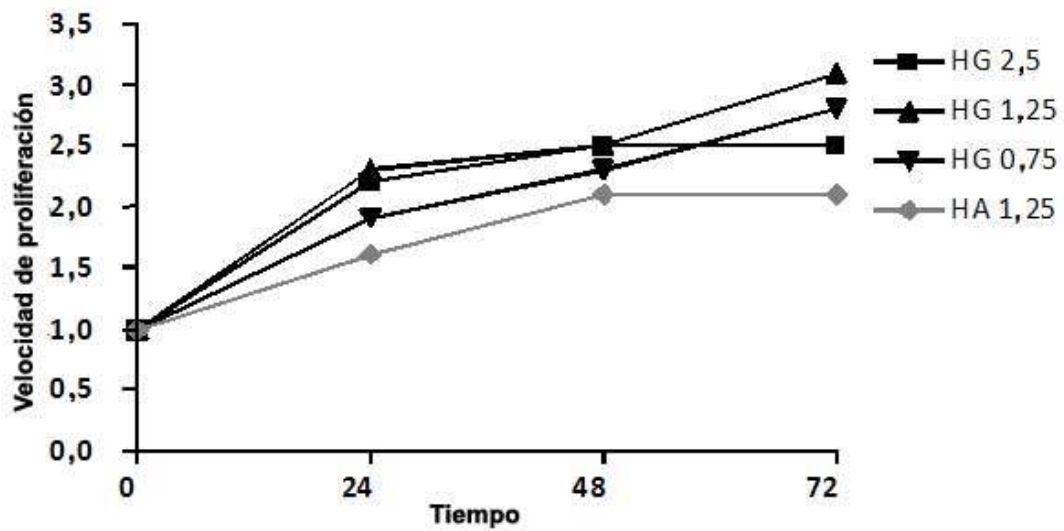


FIG. 9

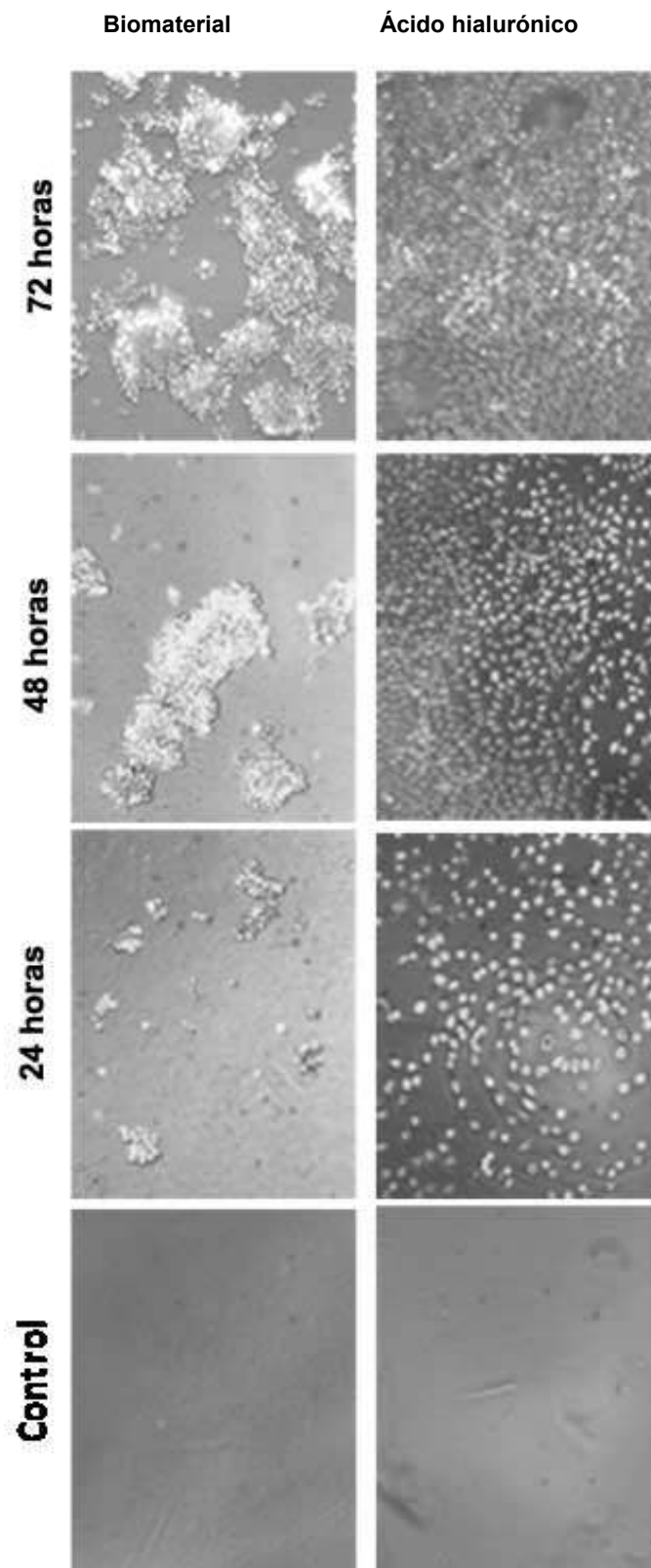


FIG. 10

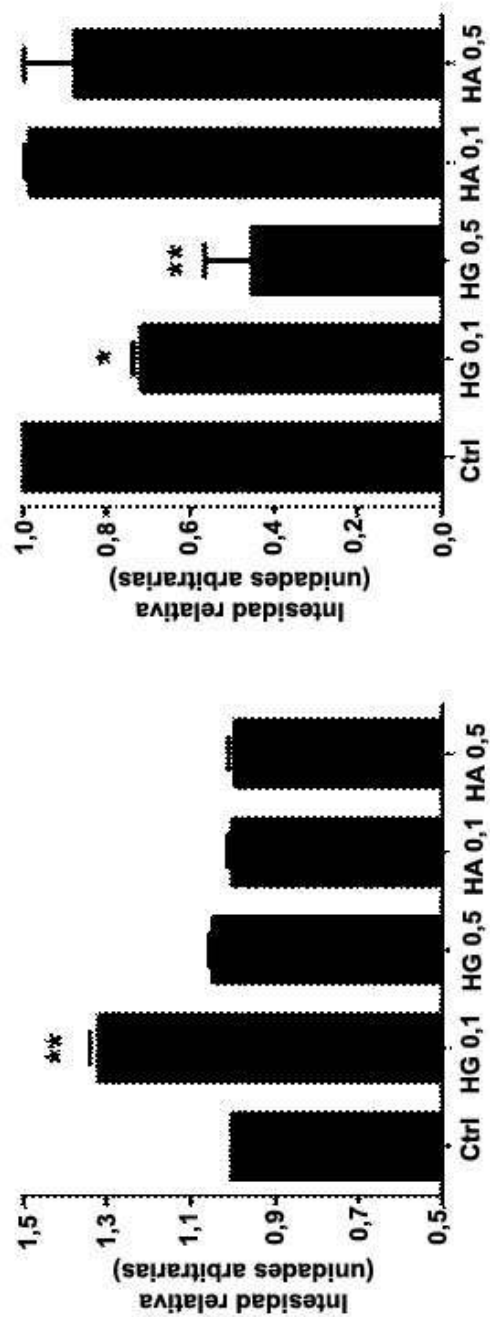


FIG. 11

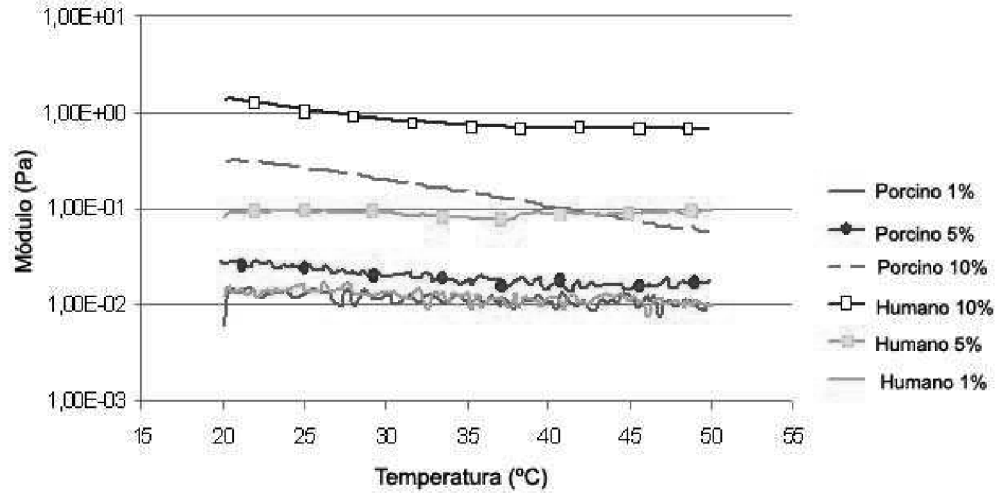


FIG. 12

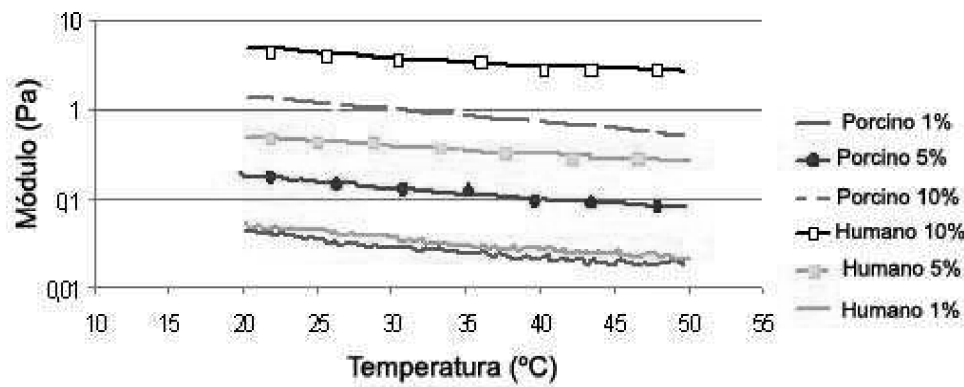


FIG. 13

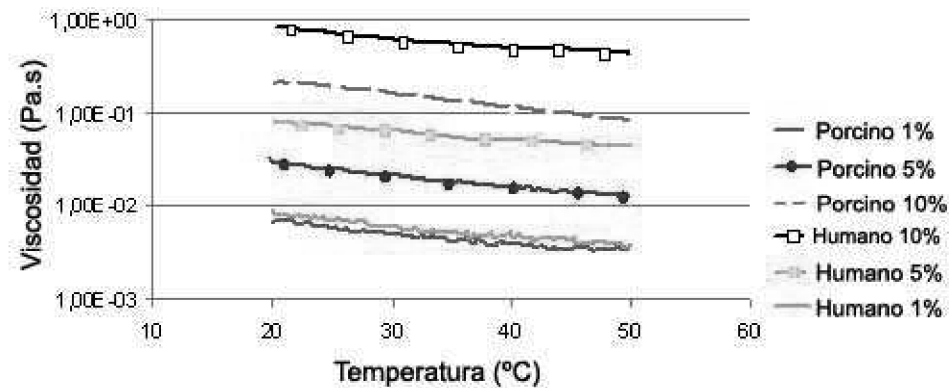


FIG. 14

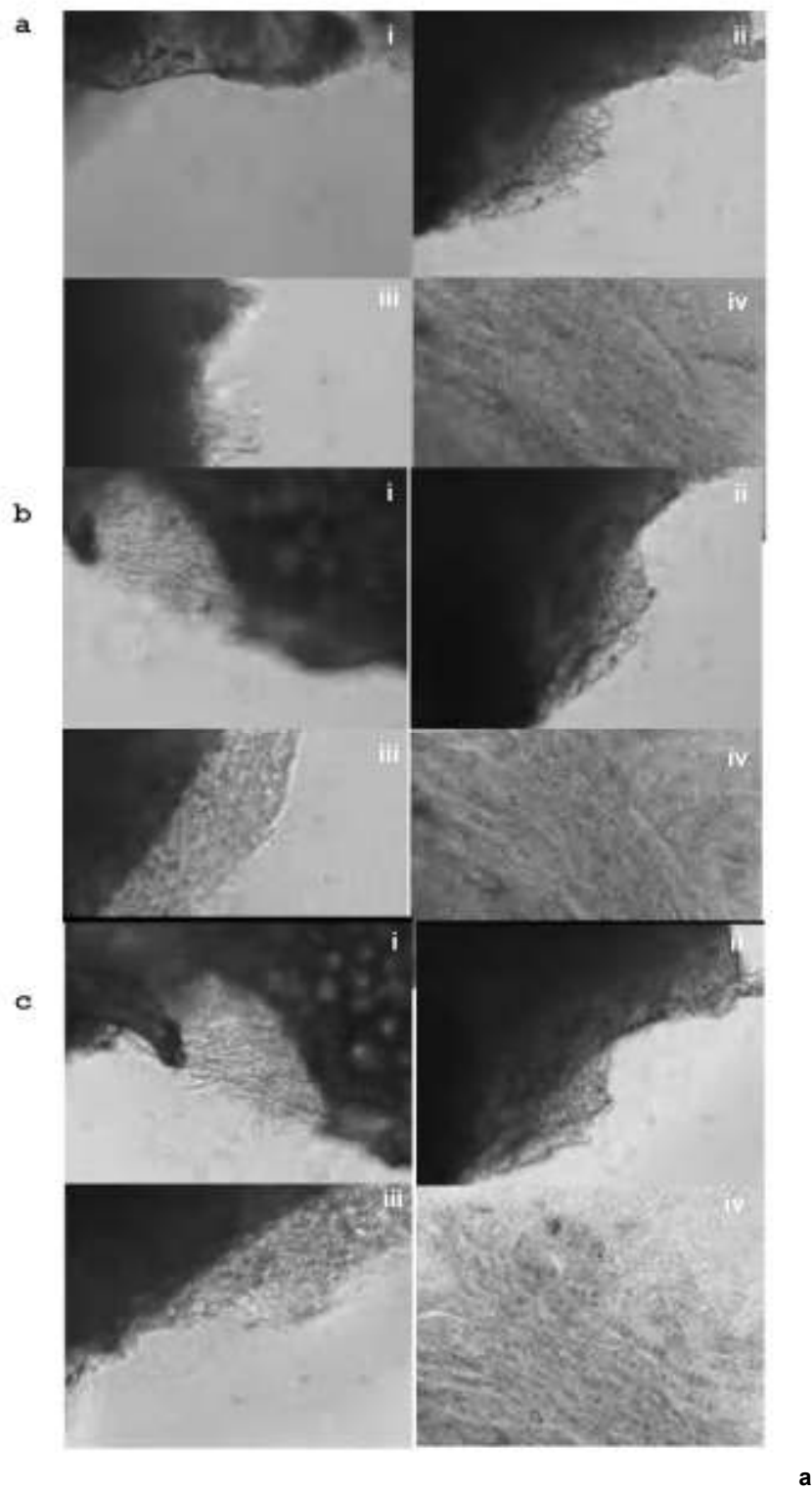


FIG. 15

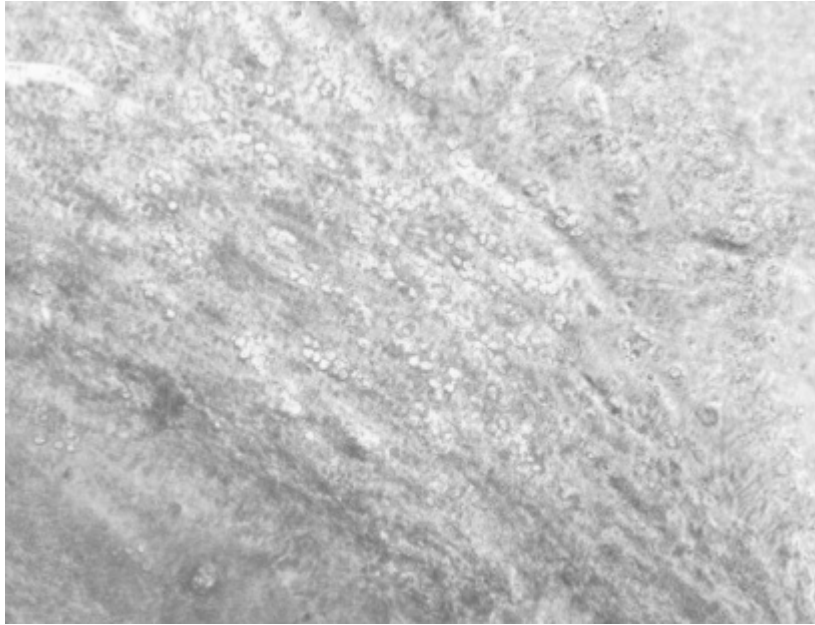


FIG. 16

