

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 573**

21 Número de solicitud: 201531544

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

A61K 31/60 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.10.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.04.2017

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (100.0%)
PLAZA SANTA CRUZ 5, BAJO
47002 VALLADOLID ES**

72 Inventor/es:

GAYOSO RODRÍGUEZ, Manuel José

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA DESCELULARIZACIÓN DE ÓRGANOS Y TEJIDOS BIOLÓGICOS**

57 Resumen:

Procedimiento para la descelularización de órganos y tejidos biológicos.

La presente invención se refiere al uso de salicilato de metilo para la descelularización de órganos y/o tejidos, preferiblemente de tejido nervioso. Además también se refiere al tejido y/u órgano obtenidos mediante dicho uso y a su utilización para la elaboración de una prótesis implantable para la regeneración de tejidos y/u órganos.

ES 2 610 573 A1

Procedimiento para la descelularización de órganos y tejidos biológicos

DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se refiere al uso de salicilato de metilo para la descelularización de órganos y/o tejidos, preferiblemente de tejido nervioso. Los tejidos y órganos obtenidos mediante dicho uso son útiles para la regeneración de tejidos y/u órganos. Por lo tanto la presente invención se puede encuadrar en el campo de la medicina.

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA**

La descelularización consiste en la eliminación de las células de un órgano o tejido, intentando mantener la mayor integridad posible de la matriz extracelular restante, para, generalmente, utilizar esta matriz como soporte o andamiaje para la reparación
15 o, si fuera posible, la sustitución de tejidos u órganos lesionados. La descelularización se lleva a cabo mediante la destrucción de las células y la supresión de los desechos celulares. La eliminación de las células y sus restos conlleva la desaparición de los antígenos que producen tanto las reacciones inflamatorias como las inmunitarias, mientras que los componentes de la matriz extracelular son proteínas cuya estructura
20 es muy similar en diferentes individuos de la misma especie e incluso entre individuos de especies diferentes pues son proteínas que se hallan filogenéticamente muy conservadas que no suelen producir reacciones inflamatorias ni inmunitarias, que sustituirán al tejido u órgano dañado (Constantinou y Jiménez. 1991. Matrix 11:1–9). La matriz extracelular una vez descelularizada puede servir de andamiaje o soporte
25 para una posterior recelularización con las células del receptor u otras inmunocompatibles que no producirán rechazo inmunológico. La descelularización y recelularización se están llevando a cabo en numerosos órganos y tejidos, tales como: válvulas cardíacas, tendón, ligamentos, vasos sanguíneos, vejiga urinaria, hígado, riñón, pulmón, músculo esquelético, piel y nervios. (Gilbert *et al.* 2006. Biomaterials
30 27; 3675–3683; Isaac Perea-Gil *et al.* 2015. Am J Transl Res; 558-573; Ott *et al.* 2008. Nat Med; 14: 213-221).

La descelularización, generalmente, comienza por la destrucción física de las células. Después de destruir las células, se suelen eliminar los restos celulares con
35 tratamientos enzimáticos o con detergentes que desorganizan las membranas

celulares y facilitan la eliminación de los restos mientras se pretende conservar, en la medida de lo posible, la estructura y funciones de la matriz extracelular.

5 El nervio periférico tiene la capacidad de regenerar sus fibras nerviosas tras una sección en condiciones favorables. Es decir, si un nervio es seccionado por un traumatismo, resección quirúrgica de un tumor u otra causa si las condiciones son favorables, puede regenerar sus fibras nerviosas y recuperar sus funciones. Las circunstancias más favorables son una sección limpia del nervio sin separación de los cabos proximal y distal de la sección. Esta situación ideal no suelen ser frecuente y los
10 cabos proximal y distal suelen quedar más o menos separados. En estos casos, si se intenta traccionar de los extremos del nervio para suturarlos la tensión impide la regeneración de las fibras nerviosas, por lo que se necesita interponer un material a modo de puente entre los cabos del nervio seccionado. Lo más efectivo hasta el momento es el implante de nervio autólogo, es decir, se sacrifica un nervio
15 generalmente sensorial del propio individuo para recuperar un nervio motor. Este método tiene como inconvenientes principales la morbilidad causada y la escasez del material disponible para el implante. Por estas razones se han estudiado diferentes alternativas como son el implante alogénico pero necesita inmunosupresión, así como la construcción de implantes biocompatibles ya sean biológicos como tubos de colágeno o de biomateriales como los polímeros del ácido láctico, de la caprolactona o
20 del ácido glicólico.

Para el comienzo de la descelularización, la destrucción de las células, en el nervio y en otros órganos y tejidos, se han empleado métodos tales como: el choque osmótico
25 con disoluciones hipotónicas o con agua destilada, la congelación y descongelación brusca y la sonicación (Gilbert *et al.* 2006. *Biomaterials* 27; 3675-3683). De entre los primeros estudios de descelularización en el nervio destaca el realizado por Johnson *et al.* 1982. (*Muscle & Nerve* 5; 335-344.). El objetivo principal era el estudio ultraestructural y bioquímico de la matriz extracelular del nervio. Para obtener dicha
30 matriz libre de células, los autores utilizaron detergentes fuertes, basándose en la destrucción más o menos completa, que producen los detergentes sobre las uniones entre lípidos y proteínas.

Posteriormente Sondell *et al.* 1998 (*Brain Research*, 795; 44-54) obtuvieron resultados
35 más específicos mediante un tratamiento que combina el choque osmótico, con agua destilada, y el uso de detergentes no iónicos (Triton™ X-100) y aniónicos

(deoxicolato). La matriz extracelular obtenida de este modo parece corresponder a la lámina basal que rodea a las fibras nerviosas por lo que, según estos autores, estos tubos de lámina basal sirven como soporte o andamiaje para la regeneración, a través de su interior ahora vacío, de las prolongaciones nerviosas interrumpida. De esta forma, la lámina basal rodea a las unidades de regeneración. Hudson *et al.* 2004 (Tissue Engineering, 10; 1346-1358) buscaron lo que denominaron la optimización del método estudiando la acción específica de cada detergente sobre las células y la matriz extracelular. Su método comienza con un choque osmótico con agua destilada y utiliza detergentes anfóteros (sulfobetaina 10 y sulfobetaina 16) y aniónicos (Triton™ X-200) para eliminar los restos celulares. Con prótesis de este tipo se han obtenido resultados experimentales similares a los obtenidos con implantes autólogos o isogénicos y mucho más eficaces que los obtenidos con el método de Sondell *et al.* 1998.

El único implante obtenido de nervio alogénico humano y comercialmente disponible, es AVANCE®. Esta prótesis procede de donantes humanos y después de congelar y descongelar el segmento de nervio se descelulariza con detergentes y con CSPG (condroitín sulfato proteoglicano) condroitinasa (Muir. 2010. Experimental Neurology 23; 102-111) .El CSPG está constituido por un núcleo de proteína y un número variable de glicosaminoglicanos como el condroitín sulfato.

Hasta el momento actual, la descelularización de órganos y tejidos se basa, principalmente, en la acción de distintos tipos de detergentes sobre los lípidos y las proteínas de las células.

Para la regeneración de tejidos y órganos, debido a la importancia de que el andamiaje presente la forma tridimensional correcta, existe la necesidad de producir un tejido u órgano descelularizado con la misma estructura intersticial tridimensional, forma y tamaño que la del nativo. La reconstrucción de un órgano artificial utilizando un órgano descelularizado producirá de esta manera un órgano artificial que funcione tan bien como el órgano nativo debido a que conserva la misma forma, tamaño y estructura intersticial que permite que las células asuman una morfología y estructura comparables a las del órgano nativo. Además, en el caso de la regeneración de nervios motores, existe la necesidad de conseguir un nervio motor descelularizado alogénico para evitar la necesidad de sacrificar nervios sensoriales del propio individuo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente invención se demuestra el uso de salicilato de metilo para la
5 descelularización de órganos y tejidos. Como ejemplo del procedimiento de nuestra
invención se describe la descelularización del nervio periférico pero dicho uso puede
ser ampliado a otros tejidos u órganos, tales como por ejemplo nervio periférico, tracto
del sistema nervioso central, nervio óptico, dermis, coroides, corazón, riñón, hígado,
páncreas, bazo, vejiga, uréter y uretra.

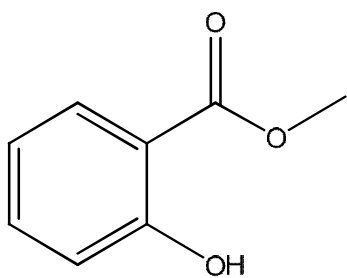
10

El método aquí descrito no utiliza ningún tipo de detergente, sino que es el salicilato
de metilo el agente que realiza la descelularización. Este hecho permite que, con
resultados similares en cuanto a la regeneración, estas prótesis presentan cualidades
físicas más aptas para su utilización quirúrgica ya que presentan más consistencia y
15 rigidez que otras prótesis obtenidas con otros métodos.

15

El salicilato de metilo (también denominado metil éster 2-hidroxibenzoico o metil 2-
hidroxibenzoato), de fórmula molecular $C_8H_8O_3$ es conocido por el experto por el
número CAS 119-36-8. La fórmula estructural del salicilato de metilo es la siguiente:

20



25

En la presente invención se ha utilizado salicilato de metilo puro (100%), sin embargo,
es posible utilizarlo diluido, por ejemplo en alcohol absoluto, a menor concentración
siempre que conserve sus propiedades descelularizantes, por lo que podría utilizarse
por ejemplo salicilato de metilo al 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83,
84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100%.

30

El salicilato de metilo puede ser de origen natural, por ejemplo de origen vegetal (por
ejemplo de las plantas de género *Gaultheria*, por ejemplo *Gaultheria procumbens*; o

del género *Betula*) u obtenido por síntesis química, por ejemplo obtenido por reacción del ácido salicílico con metanol.

5 La presente invención también se refiere a las sales de salicilato de metilo o de sus derivados que pueden ser generadas mediante métodos químicos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, mediante una reacción con un ácido en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos. Como disolvente orgánico puede utilizarse éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Los ejemplos de las sales de adición de ácido incluyen sales de adición de ácido mineral tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato, y sales de adición de ácido orgánico tales como, por ejemplo, acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y p-toluenosulfonato. La preparación de sales puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en el estado de la técnica.

15 El salicilato de metilo se ha utilizado en el estado del arte como ingrediente activo en cremas y pomadas analgésicas, antiirreumáticas, protectoras solares y como transparentador de secciones histológicas y anatómicas (es decir, para la mejora de la visualización de células, núcleos y citoplasmas celulares).

20 La presente invención se refiere a un método de descelularización para órganos y tejidos que elimina las células y restos celulares respetando la matriz extracelular. El procedimiento consiste en la ruptura de las células mediante choque osmótico, preferiblemente por inmersión en agua destilada o purificada. Al ser el salicilato hidrofóbico es necesario deshidratar las muestras antes de someterlas a la acción del salicilato de metilo, por lo tanto, se continúa con una deshidratación en alcoholes de concentración creciente y desde el alcohol absoluto se pasa a salicilato de metilo para extraer los restos celulares. Por último, se lava en alcohol absoluto y se hidrata en alcoholes decrecientes hasta agua, por ejemplo, agua desionizada, destilada o purificada, preferiblemente desionizada. Se puede utilizar DNasa para eliminar, si los hubiera, restos excesivos de material nuclear. Se puede repetir el proceso hasta volver al agua desde donde las piezas pueden pasarse a un líquido fisiológico y utilizarse como soporte para la recelularización o bien ponerlas en un medio adecuado y conservarlas hasta el momento de su utilización. Por ejemplo, si la prótesis obtenida no se va a utilizar en ese momento se puede, tras inmersión en un tampón de

congelación y un descenso lento de la temperatura (por ejemplo de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$), conservar congelada.

5 La prótesis (tejidos y/u órganos descelularizados) puede ser recelularizada “in vitro” con el tipo célula que se desee. Por ejemplo, con células de Schwann, células madre mesenquimales de la médula ósea, células madre mesenquimales del tejido adiposo, etc.

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

En un primer aspecto la presente invención se refiere al uso de salicilato de metilo para descelularización de tejidos y/u órganos.

15 En una realización preferida del primer aspecto de la invención el tejido se selecciona de la lista que consiste en: tejido nervioso, nervios y tractos nerviosos, dermis, coroides, corazón, riñón, hígado, páncreas, bazo, vejiga, uréter y uretra. Preferiblemente es tejido nervioso, donde el tejido nerviosos es un nervio, más preferiblemente es un nervio periférico, más preferiblemente un nervio periférico mixto.

20 En otra realización preferida del primer aspecto de la invención el uso es un uso *in vitro* o *ex vivo*.

25 En la presente invención se utiliza “regeneración” como sinónimo de reconstrucción, es decir, de reparación bien total o parcial de la estructura y/o funcionalidad de un tejido y/u órgano.

30 El término “in vitro” se refiere a que el uso se realiza fuera del cuerpo del sujeto. Es decir, se realiza en una muestra biológica de un sujeto.

35 El término “muestra biológica” en la presente invención se refiere a cualquier muestra que comprenda tejidos y/u órganos de un individuo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. La muestra biológica en la presente invención puede ser fresca o congelada.

El término "ex vivo" se refiere a que el método de la invención se realiza fuera del cuerpo del sujeto en condiciones similares a las que se encuentra en tejido y/u órgano dentro del cuerpo del sujeto.

5 En otra realización preferida del primer aspecto de la invención el uso es un uso *in vivo*.

Los tejidos y/u órganos descritos en la presente invención pueden ser tejidos y/u órganos enteros o fragmentos de ellos de cualquier tamaño. En una realización preferida el tejido y/u órgano está aislado. En una realización preferida son de mamífero. Entre los mamíferos adecuados se incluyen el ser humano, primates, perros, gatos, roedores (por ejemplo ratones, ratas), vacas, caballos, cerdos, conejos, cabras y ovejas. Más preferiblemente de origen humano, donde el humano es de cualquier edad o sexo. En otra realización preferida son de origen autólogo, alogénico, xenogénico (heterólogo). En una realización preferida los tejidos u órganos se obtienen de individuos *post mortem*, preferiblemente de donantes de órganos.

Se entiende por "descelularización" la eliminación de células así como de sus fragmentos (por ejemplo, membranas celulares, componentes citoplasmáticos y/o nucleares), componentes antigénicos y/o inflamatorios. La descelularización de órganos comprende eliminar los componentes nucleares y celulares de un órgano aislado o parte de un órgano, dejando una estructura intersticial que presenta el mismo tamaño y forma del órgano nativo.

25 La expresión órgano descelularizado tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un órgano o parte del mismo del que se ha eliminado la totalidad del contenido celular y de tejidos, dejando una estructura intersticial (la matriz extracelular). Los órganos están compuestos de diversos tejidos especializados. El tejido especializado de un órgano es el parénquima y proporciona la función específica asociada con el órgano. La mayoría de órganos también presentan un armazón, el estroma, compuesto de tejido conectivo no especializado que da soporte al parénquima. El procedimiento de descelularización elimina el parénquima, dejando la estructura intersticial tridimensional de tejido conectivo, compuesta principalmente de colágeno. La estructura intersticial presenta la misma forma y tamaño que el órgano nativo, proporcionando el armazón de soporte que permite que las células se unan y crezcan sobre el mismo. Los órganos descelularizados pueden ser rígidos o

semirrígidos, presentando la capacidad de alterar su forma. Entre los ejemplos de órganos descelularizados se incluyen, pero sin limitarse a ellos, nervio periférico, tracto nervioso, nervio óptico, dermis, coroides, corazón, riñón, hígado, páncreas, bazo, vejiga, uréter y uretra.

5

En la presente invención, "tejido descelularizado" se entiende como aquel tejido al que se le ha eliminado la totalidad del contenido celular dejando la estructura intersticial, es decir la matriz extracelular. Cuando nos referimos a tejidos en la presente invención, también nos referimos a partes de los mismos.

10

La expresión órgano o tejido aislado tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un órgano que ha sido extirpado de un individuo, preferiblemente un mamífero. Entre los mamíferos adecuados se incluyen el ser humano, primates, perros, gatos, roedores (por ejemplo, ratones, ratas), vacas, caballos, cerdos, conejos, cabras y ovejas. La expresión órgano aislado también incluye un órgano extirpado de un sujeto que necesita un órgano reconstruido artificialmente. Los órganos adecuados pueden ser cualquier órgano o parte de órgano requerido para el implante en un sujeto. Entre los ejemplos se incluyen, pero sin limitarse a ellos, nervio periférico, tracto del sistema nervioso, nervio óptico, dermis, coroides, corazón, riñón, hígado, páncreas, bazo, uréter y uretra.

15

20

Un órgano o parte de un órgano puede aislarse del sujeto que requiere un órgano reconstruido artificial. Por ejemplo, puede extirparse un órgano enfermo de un sujeto y descelularizarlo, con la condición de que la enfermedad afecte al parénquima del órgano, pero que no perjudique al tejido conectivo, por ejemplo por necrosis del tejido. El órgano enfermo puede extirparse del sujeto y descelularizarse. El órgano descelularizado, o parte del órgano, puede utilizarse como andamiaje tridimensional para reconstruir un órgano artificial. Puede reconstruirse un órgano artificial autólogo utilizando el propio órgano descelularizado del sujeto como andamiaje y recelularizándolo con una población de células derivadas de tejidos del propio sujeto. Por ejemplo, poblaciones de células derivadas de la piel, médula ósea, tejido adiposo, hígado, páncreas, arterias, venas, cordón umbilical y tejidos placentarios del sujeto. Si las células no son autólogas provocan su rechazo inmunológico, a menos que se instaure un tratamiento inmunosupresor.

25

30

35

Puede reconstruirse un órgano artificial alogénico utilizando como andamiaje, el órgano descelularizado de otro individuo de la misma especie y recelularizándolo con poblaciones de células derivadas del propio sujeto. En este caso, el andamiaje sería alogénico y las células autólogas. Por ejemplo, pueden derivarse diferentes poblaciones de células a partir de mamíferos tales como primates, perros, gatos, roedores (por ejemplo ratones, ratas), vacas, caballos, cerdos, conejos, cabras y ovejas. La recelularización se realizaría con poblaciones de células derivadas del propio sujeto, en este caso se consideraría la prótesis xenogénica (heteróloga) y las células autólogas. Los procedimientos estándar para el aislamiento de un órgano diana son bien conocidos por el experto en la materia y pueden utilizarse para aislar el órgano.

También puede derivarse un órgano, o parte de un órgano, de un cadáver humano o de especies de mamífero diferentes del sujeto, tales como órganos procedentes de primates, perros, gatos, roedores (por ejemplo ratones, ratas), vacas, caballos, conejos, cerdos, cabras y ovejas. Los procedimientos estándar para el aislamiento de un órgano diana son bien conocidos por el experto en la materia y pueden utilizarse para aislar el órgano.

En un segundo aspecto la presente invención se refiere a un método para descelularizar un tejido o un órgano *in vitro* que comprende las siguientes etapas:

- a. ruptura de las células de un órgano o tejido;
- b. deshidratación del órgano o tejido del paso (a), con alcoholes de gradación creciente;
- c. Inmersión del órgano o tejido del paso (b) en salicilato de metilo;
- d. Inmersión del órgano o tejido del paso (c) en alcohol absoluto;
- e. hidratación del órgano o tejido descelularizado del paso (d) con alcoholes de gradación decreciente;

En adelante nos referiremos a él como al “método primero de la invención” o al “método primero de la presente invención”.

En un tercer aspecto la presente invención se refiere a un método para descelularizar un tejido o un órgano que comprende las siguientes etapas:

- a. ruptura de las células de un órgano o tejido;
- b. deshidratación de un órgano o tejido con alcoholes de gradación creciente;

- c. descelularización del órgano o tejido del paso (b) por contacto con salicilato de metilo;
- d. eliminación del salicilato de metilo del paso (c) con alcohol absoluto;
- e. hidratación del órgano o tejido descelularizado del paso (d) con alcoholes de gradación decreciente;

5

donde al menos una de las etapas se realiza en el cuerpo del sujeto sin vida.

En adelante nos referiremos a él como al “método segundo de la invención” o al “método segundo de la presente invención”. En una realización preferida del método segundo de la invención la ruptura del paso (a) se realiza en el cuerpo sin vida de un sujeto. En una realización preferida al menos una de las etapas se realiza mediante perfusión.

10

15

En la presente invención los tejidos y/u órganos obtenidos de un “sujeto sin vida” son obtenidos de cadáveres procedentes de autopsias médico-legales y de donantes de órganos fallecidos, todos ellos obtenidos según la legislación vigente.

20

En la presente invención los tejidos y/u órganos procedentes de un “sujeto sin vida” pueden ser obtenidos en el momento del fallecimiento o tras horas o días después del mismo.

25

Los tejidos y/o fragmentos de órganos en la presente invención también pueden proceder de biopsias de organismos vivos.

En una realización preferida del segundo y tercer aspectos de la invención los pasos (a) a (e); es decir, (a), (b), (c), (d) y (e); se realizan más de una vez, preferiblemente dos veces.

30

Preferiblemente en una realización preferida del segundo y tercer aspectos de la invención el paso (d) se realiza al menos tres veces, durante al menos 12 horas uno de los lavados. En este paso se extrae el salicilato de metilo.

35

En una realización preferida del segundo y tercer aspectos de la invención el tejido se selecciona de la lista que consiste en: nervio periférico, tracto del sistema nervioso central, nervio óptico, dermis, coroides, corazón, riñón, hígado, páncreas, bazo, vejiga, uréter y uretra. Preferiblemente el nervio periférico es un nervio periférico mixto.

En la presente invención el término sujeto se refiere a un mamífero, preferiblemente primate, más preferiblemente a un humano, donde el humano es de cualquier edad o sexo. El individuo también puede ser un perro, gato, roedor (por ejemplo, ratón, rata),
5 conejo, vaca, caballo, cerdo, cabra y oveja.

En una realización preferida del segundo y tercer aspecto de la invención en el paso (a) la ruptura de las células se realiza mediante choque osmótico, sonicación o por congelación y descongelación. Preferiblemente el choque osmótico se realiza
10 mediante la inmersión (o perfusión) en una solución hipotónica, agua destilada, agua bidestilada o agua purificada, preferiblemente en agua destilada.

Procedimientos de sonicación incluyen, pero sin limitarse a ellos, cuernos acústicos, cristales piezoeléctricos o cualquier otro procedimiento para producir ondas sónicas
15 estables, por ejemplo con sondas de sonicación. La sonicación debe llevarse a cabo a una frecuencia que elimine selectivamente las membranas celulares y/o material celular sin destruir la estructura intersticial. Las frecuencias de sonicación que resulten adecuadas dependerán del tamaño y tipo de órgano aislado que se descelulariza. Las frecuencias de sonicación típicas se encuentran comprendidas entre 40 kHz y 50 kHz.
20 Sin embargo, es previsible que un intervalo amplio de frecuencias, desde las subauditivas hasta las ultrasónicas (entre aproximadamente 7 Hz y 40 MHz, preferentemente entre 7 Hz y 20 MHz), proporcionen una disociación incrementada sónicamente de los tejidos. Las variaciones en el tipo de sonicación también se contemplan en la invención e incluyen la sonicación pulsante frente a la continua. Los
25 niveles de potencia de la fuente de sonicación se encuentran comprendidos entre 10-4 y aproximadamente 10 vatios/cm².

Si es necesario, porque los restos de ácido desoxirribonucleico (ADN) sean de más de 50 ng/mg de peso seco, se puede tratar con nucleasa (fosfodiesterasa) (por ejemplo
30 utilizar S1 Nucleasa (Thermo Scientific) que tiene actividad DNasa y RNasa) o con desoxirribonucleasa (DNasa), por ejemplo a una concentración de 0,1mg/ml y posterior lavado con agua destilada. Por lo que en otra realización preferida del segundo y tercer aspecto de la invención el método además comprende después del paso (e) la utilización de nucleasa o (DNasa) sobre el órgano o tejido hidratado (es
35 decir, en un paso (f)).

En una realización más preferida del segundo y tercer aspecto de la invención el método además comprende un paso (g) donde el órgano o tejido descelularizado se introduce en un líquido seleccionado de entre el grupo que consiste en agua destilada, agua bidestilada, agua purificada, alcohol (de cualquier gradación), tampón fisiológico y medio de cultivo. Preferiblemente es en agua destilada. Posteriormente puede introducirse en otro líquido de entre los seleccionados anteriormente.

En una realización aún más preferida del segundo y tercer aspecto de la invención al menos una de las etapas anteriormente mencionadas se realiza en agitación (para mejorar la difusión de los líquidos). Preferiblemente por agitación mecánica. En una realización particular, el procedimiento de agitación mecánica implica la utilización de una placa de agitación mecánica (por ejemplo una placa de movimiento orbital). El órgano o tejido aislado, o parte del mismo, se introduce en un recipiente (sellado o no) con un volumen adecuado de fluido y se agita en la placa a una velocidad adecuada. La velocidad adecuada para agitar el órgano aislado dependerá del tamaño de éste. Por ejemplo, una velocidad de rotación comprendida entre aproximadamente 50 revoluciones por minuto (r.p.m.) y aproximadamente 150 r.p.m. Un órgano de grandes dimensiones requerirá una velocidad más rápida en comparación con un órgano más pequeño, tal y como es conocido por el experto en la materia. El volumen de fluido en el que se introduzca el órgano aislado y el tiempo que permanezca en él también dependerá del tamaño del órgano aislado, tal y como es conocido por el experto en la materia.

En el método de la invención cualquiera de las etapas (a), (b), (c), (d) (e) o (f) se pueden realizar al menos dos veces. Preferiblemente se realizan al menos dos veces las etapas (a) a (e).

Los tiempos y volúmenes de soluciones en las que se sumerge o se perfunde el tejido y/u órgano van a variar dependiendo del tamaño del mismo.

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención en el paso (a) para romper las células se utilizará el choque osmótico, mediante la inmersión de la pieza en agua destilada o purificada durante, al menos, 24 horas. Se cambiará el agua al menos tres veces, preferiblemente cuatro veces. El volumen de los líquidos de inmersión será, al menos 20 veces el volumen de la pieza y los tiempos dependerán

del tamaño de las piezas que se procesen, tal y como es conocido por el experto en la materia.

5 En otra realización preferida del segundo o tercer aspecto de la invención en el paso (b) la deshidratación se realiza en alcoholes de concentración creciente, preferiblemente alcoholes de 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100%, más preferiblemente 70, 96 y 100 % (alcohol absoluto). Más preferiblemente las piezas se mantiene el tejido o el órgano a descelularizar en cada concentración de alcohol, al menos, 30 min
10 y se hacen, al menos, tres cambios.

En otra realización preferida del segundo o tercer aspecto de la invención en el paso (c) la inmersión en salicilato de metilo o el contacto con el salicilato de metilo se realiza con al menos tres cambios en dicho líquido, preferiblemente en el último de los
15 cuales permanecerá durante unas 6-24 horas, preferiblemente 18-22 horas.

En otra realización preferida del segundo o tercer aspecto de la invención en el paso (e) la hidratación se realiza en alcoholes de concentración decreciente preferiblemente 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 79, 78,
20 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71 o 70%, más preferiblemente 100, 96 y 70 %. Preferiblemente en cada concentración de alcohol se mantendrán 30 min y se harán al menos tres cambios.

En otra realización preferida del segundo o tercer aspecto de la invención en el paso (e) el último paso es a agua destilada (es decir tras la última concentración de alcohol utilizada), preferiblemente con al menos tres cambios de entre 15-45 minutos, más preferiblemente de 30 min.
25

En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención todos los pasos
30 deben realizarse en agitación continua.

El tejido y/u órgano se puede mantener antes del paso (a) y/o después del paso (e) en un medio de cultivo celular adecuado, por ejemplo, dependiendo del tejido y/u órgano se utilizará el más adecuado tal y como conoce el experto en la materia, por ejemplo,
35 aunque sin limitarse a ellos, RPMI 1640, medio de Fisher, medio de Iscove, medio de McCoy, medio de Dulbecco y similares.

Los métodos de la invención pueden comprender adicionalmente el secado o la congelación del órgano o tejido descclularizado. El órgano o tejido descclularizado seco o congelado puede almacenarse a temperatura adecuada o equilibrarse en un fluido de equilibración previamente a su utilización.

La equilibración del órgano descclularizado tiene lugar en un fluido de equilibración. Entre los ejemplos de fluido de equilibración se incluyen, pero sin limitarse a ellos, agua destilada, alcohol (de cualquier gradación), tampón fisiológico y medio de cultivo (por ejemplo, aunque sin limitarse a ellos, RPMI 1640, medio de Fisher, medio de Iscove, medio de McCoy, medio de Dulbecco y similares.)

Entre los procedimientos de secado del órgano o tejido descclularizado se incluyen el secado por congelación o la liofilización del órgano para eliminar el fluido residual. El órgano o tejido descclularizado liofilizado puede almacenarse a una temperatura adecuada hasta que se requiera su utilización.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere al tejido u órgano descclularizado (o fragmentos de los mismos) según el método descrito en el segundo o el tercer aspecto de la presente invención. En adelante nos referiremos a él como al "tejido y/u órgano de la invención" o "el tejido y/u órgano descclularizado de la invención".

En la presente invención el tejido u órgano de la invención también se denomina "andamiaje", "andamiaje tridimensional", "estructura tridimensional", "prótesis" o "injerto".

Los injertos de tejido y/o de órganos (o partes de los mismos) de la presente invención proporcionan un tejido y/u órgano sustituto natural y conservan las propiedades biológicas para la promoción de la regeneración celular a través del injerto. La estructura nativa de la matriz extracelular se conserva, en concreto, en el caso de injertos de nervios, la lámina basal y endoneuro conservan su estructura natural y original, de esta manera el andamiaje de la invención promueve la regeneración de axones y células de Schwann guiándolos hacia el nervio distal.

Los tejidos y órganos descclularizados de la invención son tolerados inmunológicamente.

Los tejidos y órganos descelularizados de la invención pueden formar parte de una sutura, de un tubo, una lámina o un andamiaje para su correcto posicionamiento en el cuerpo del sujeto.

5

El tejido y/u órgano puede ser congelado antes de la descelularización y posteriormente guardado hasta su posterior uso.

10

En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención el tejido se selecciona de la lista que consiste en: nervio periférico, tracto del sistema nervioso, nervio óptico, dermis, coroides, corazón, riñón, hígado, páncreas, bazo, vejiga, uréter y uretra. Preferiblemente el nervio periférico es un nervio periférico mixto.

15

El tejido y/u órgano descelularizado del cuarto aspecto de la invención además puede comprender un factor de crecimiento. Preferiblemente el factor de crecimiento se seleccionan de la lista que consiste en: factores de crecimiento nervioso, epidérmico, endotelial, fibroblástico, semejante a insulina, factor neurotrófico derivado del cerebro, neuregulinas y neurotrofinas.

20

Las neurotrofinas (o factores neurotróficos) promueven la supervivencia y funcionalidad del nervio o células de la glía. Incluyen un factor que participa en la diferenciación neuronal, induce proliferación neural, influye en la función sináptica y/o promueve la supervivencia neuronal. Ejemplos de neurotrofinas son: *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *nerve growth factor* (NGF), FGF, *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *Neurotrophin-3* (NT-3), *glia derived neurotrophic factor* (GDNF), NT-4, NT-5, NT-6, NT-7, Purpurin y similares. Otros factores que tengan actividades neurotróficas aunque no estén clasificados como neurotrofinas estarían contemplados en la presente invención. Por ejemplo entre estos "neurotrophin-like factors" se incluirían el factor de crecimiento epidérmico (EGF), *heparin-binding neurite-promoting factor* (HBNF), *insulin-like growth factor 2* (IGF-2), *fibroblastic growth factor* (a-FGF y b-FGF), *platelet derived growth factor* (PDGF), NSE, y activina A.

30

35

El tejido y/u órgano descelularizado del cuarto aspecto de la invención además puede comprender citoquinas y/u hormonas. Por ejemplo, pero sin limitarse, la hormona del crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina, interleucina 3, interleucina 6, interleucina

7, factor estimulante de colonias de macrófagos, *c-kit ligand stem cell factor*, *osteoprotegerin ligand*, insulina, factores de crecimiento similares a la insulina, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico ciliar, factor de crecimiento derivado de plaquetas y proteína morfogenética ósea.

5

El tejido y/u órgano descelularizado del cuarto aspecto de la invención además puede comprender materiales o sustancias que favorezcan su implantación. Por ejemplo, puede comprender *phorbol ester phorbol myristate acetate* (PMA) para la reducción de la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD4+. El tejido y/u órgano descelularizado del cuarto aspecto de la invención además puede comprender un antibiótico y/o in inmunosupresor.

10

El tejido y/u órgano descelularizado del cuarto aspecto de la invención además puede comprender al menos un conservante.

15

Se entiende por conservante aquella sustancia que mantenga las propiedades del medicamento al inhibir la contaminación por gérmenes, pueden ser conservante iónico o no-iónico. El conservante empleado no será tóxico, será estable químicamente, y compatible con la el tejido y/u órgano. Como agentes conservantes pueden utilizarse los conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, el conservante puede referirse a alcohol etílico, ácido benzoico, benzoato sódico, ácido ascórbico, sorbato potásico, metilparabeno, etilparabeno o butilparabeno. Se entiende por "gérmenes" cualquier célula que pueda crecer y multiplicarse en la composición de la invención, por ejemplo bacterias, hongos o levaduras.

20

25

Otra realización preferida se refiere al uso donde la composición además comprende un antioxidante.

30

El término "antioxidante" se refiere a aquella sustancia que es capaz de retardar o prevenir la oxidación. Como agentes antioxidante pueden utilizarse los conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo tocoferol, ácido ascórbico, ascorbato sódico, ácido tartárico, butilhidroxianisol, ácido cítrico, vitamina A o vitamina E.

35

El tejido y/u órgano descelularizado producido mediante los procedimientos de la invención puede utilizarse como andamiaje tridimensional para reconstruir un órgano artificial.

Para la reconstrucción (o regeneración) del órgano artificial pueden utilizarse poblaciones celulares preferiblemente autólogas, para evitar un tratamiento inmunosupresor, pero también pueden utilizarse poblaciones celulares tanto alogénicas como xenogénicas. Los procedimientos para el aislamiento y cultivo de células utilizadas para reconstruir un órgano son conocidos para el experto en la materia. Las células pueden aislarse utilizando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, el tejido u órgano puede disgregarse mecánicamente y/o tratarse con enzimas digestivos y/o con agentes quelantes que debiliten las conexiones entre células vecinas, haciendo posible dispersar el tejido en una suspensión de células individuales sin niveles apreciables de rotura celular. La disociación enzimática puede conseguirse triturando el tejido y tratando el tejido triturado con cualquiera de entre varios enzimas digestivos, sea solos o en combinación. Entre éstos se incluyen, pero sin limitarse a ellos, tripsina, quimotripsina, colagenasa, elastasa y/o hialuronidasa, DNasa, pronasa y dispasa. La ruptura mecánica también puede conseguirse mediante varios procedimientos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, raspar la superficie del órgano, la utilización de trituradores, mezcladores, tamices, homogeneizadores, celdas de presión o sonicadores, entre otros. Entre los tipos celulares preferentes se incluyen, pero sin limitarse a ellos, células madre mesenquimales de la médula ósea o del tejido adiposo, células nerviosas, células de la coroides, renales, uroteliales, células de tejido adiposo, músculo esquelético o liso, miocitos (células madre musculares), fibroblastos, condrocitos, adipocitos, miofibroblastos y células ectodérmicas, incluyendo células dúctiles y de la piel, hepatocitos, células de los islotes, células presentes en el intestino y otras células parenquimatosas, osteoblastos y otras células formadoras de hueso o cartílago. Las células aisladas pueden cultivarse *in vitro* con el fin de incrementar el número de células disponibles para la infusión en el andamiaje tridimensional. Si se produce una respuesta inmunológica en el sujeto tras el implante del órgano artificial reconstruido donde se hayan utilizado poblaciones celulares alogénicas o xenogénicas, el sujeto puede tratarse con agentes inmunosupresores tales como ciclosporina o FK506, con el fin de reducir la probabilidad de rechazo.

La invención se refiere también al uso de un tejido y/o un órgano descelularizado como andamiaje tridimensional para reconstruir un órgano. Mediante la utilización de un órgano descelularizado se conserva la estructura intersticial de tejido conectivo. Ello permite que las poblaciones de células del paciente al que se le administra el

andamiaje o células cultivadas *in vitro* en el andamiaje o bien profundidas se unan al andamiaje tridimensional. La conservación de una estructura intersticial tridimensional igual al órgano *in vivo* crea el ambiente óptimo para las interacciones célula-célula y para el desarrollo y diferenciación de las poblaciones de células.

5

Por lo tanto, un quinto aspecto de la invención se refiere al uso del tejido u órgano descelularizado del cuarto aspecto de la invención como prótesis, es decir, para la elaboración de una prótesis. Preferiblemente una prótesis implantable.

10

En la presente invención se entiende prótesis como tejido y/u órgano que reemplaza un tejido y/u órgano dañado y que cumple con su misma función.

15

Un sexto aspecto de la invención se refiere a la prótesis que comprende el tejido u órgano descelularizado del cuarto aspecto de la invención. En una realización particular la prótesis se selecciona de la lista que consiste en: prótesis de nervio periférico, tracto del sistema nervioso, nervio óptico, dermis, coroides, corazón, riñón, hígado, páncreas, bazo, vejiga, uréter y uretra. Preferiblemente la prótesis es de nervio periférico mixto.

20

La presente invención también se refiere al uso de la prótesis del sexto aspecto de la invención para la regeneración de tejidos y/u órganos. Preferiblemente para la regeneración de nervio periférico, tracto del sistema nervioso, nervio óptico, dermis, coroides, corazón, riñón, hígado, páncreas, bazo, vejiga, uréter o uretra. Más preferiblemente el nervio periférico es nervio periférico mixto.

25

Un séptimo aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende el tejido y/u órgano del cuarto aspecto de la invención. Preferiblemente la composición además comprende al menos un factor de crecimiento. Más preferiblemente el factor de crecimiento se seleccionan de la lista que consiste en: factores de crecimiento nervioso, epidérmico, endotelial, fibroblástico, semejante a insulina, factor neurotrófico derivado del cerebro, neuregulinas y neurotrofinas (por ejemplo : *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *nerve growth factor* (NGF), FGF, *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *Neurotrophin-3* (NT-3), *glia derived neurotrophic factor* (GDNF), NT-4, NT-5, NT-6, NT-7, Purpurin y similares, Otros factores que tengan actividades neurotróficas aunque no estén clasificados como neurotrofinas estarían contemplados en la presente invención. Por ejemplo entre estos "neurotrophin-like factors" se incluirían el

30

35

factor de crecimiento epidérmico (EGF), *heparin-binding neurite-promoting factor* (HBNF), *insulin-like growth factor 2* (IGF-2), *fibroblastic growth factor* (a-FGF y b-FGF), *platelet derived growth factor* (PDGF), NSE, y activina A.

5 La composición del séptimo aspecto de la invención además puede comprender citoquinas y/u hormonas. Por ejemplo, pero sin limitarse, la hormona del crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina, interleucina 3, interleucina 6, interleucina 7, factor estimulante de colonias de macrófagos, *c-kit ligand stem cell factor*, *osteoprotegerin ligand*, insulina, factores de crecimiento similares a la insulina, factor de crecimiento
10 de fibroblastos, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico ciliar, factor de crecimiento derivado de plaquetas y proteína morfogenética ósea.

La composición del séptimo aspecto de la invención además puede comprender un antibiótico, una citoquina y/o in inmunosupresor.

15 Un octavo aspecto de la presente invención se refiere al uso de la composición del séptimo aspecto de la invención para la elaboración de un medicamento. Por lo tanto la presente invención también se refiere a la composición del séptimo aspecto de la invención para uso como medicamento.

20 El término medicamento y composición farmacéutica y se utilizan en esta invención de manera indistinta. El término "composición farmacéutica" en esta memoria hace referencia a cualquier sustancia usada para alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el ser humano o en los animales. La composición farmacéutica de la
25 invención puede utilizarse tanto sola como en combinación con otras composiciones farmacéuticas. En el contexto de la presente invención la composición farmacéutica o el medicamento se caracterizan por comprender la composición del séptimo aspecto de la invención en una cantidad terapéuticamente activa.

30 En la presente invención la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del tejido y/u órgano o fragmentos de los mismos calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, por las características propias de los tejidos, la ruta, forma y frecuencia de administración de los mismos, y otros factores, incluyendo la edad, estado del paciente, así como la severidad de la
35 alteración o trastorno.

El término "vehículo", al igual que el excipiente, hace referencia a una sustancia que se emplea en la composición farmacéutica o medicamento para diluir cualquiera de los componentes de la presente invención comprendidos en ella hasta un volumen o peso determinado. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros
5 elementos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacológicamente aceptable es el diluyente. Los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en la composición farmacéutica de la presente invención son los vehículos conocidos por los expertos en la materia.

10

En otra realización particular, dicha composición farmacéutica se prepara en forma sólida o en suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable.

15

La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por ejemplo por vía parenteral, por vía intrarterial, por vía intravenosa, por vía oral, por vía intraperitoneal o subcutánea,
20 preferiblemente por vía intravenosa.

20

La composición de la invención se puede administrar en una o en varias dosis durante la duración del tratamiento con el fin de optimizar el efecto terapéutico.

25

Un noveno aspecto de la invención se refiere al uso de la composición del séptimo aspecto de la invención para la elaboración de un medicamento para la regeneración y/o reparación de tejidos y/u órganos. Preferiblemente los tejidos y/u órganos a regenerar se seleccionan de la lista que consiste en: nervio periférico, tracto del sistema nervioso central, nervio óptico, dermis, coroides, corazón, riñón, hígado,
30 páncreas, bazo, vejiga, uréter y uretra. Más preferiblemente el nervio periférico es nervio periférico mixto.

30

35

Por lo tanto la presente invención también se refiere a la composición del séptimo aspecto de la invención para su uso en terapia, preferiblemente en terapia de
35 reparación y/o regeneración de tejidos. Preferiblemente los tejidos y/u órganos a regenerar se seleccionan de la lista que consiste en: nervio periférico, tractos del

sistema nervioso central, nervio óptico, dermis, coroides, corazón, riñón, hígado, páncreas, bazo, vejiga, uréter y uretra. Más preferiblemente es nervio periférico mixto.

5 El tejido u órgano descelularizado puede pretratarse previamente a su uso con el fin de potenciar la unión de células al órgano descelularizado. Por ejemplo, podría tratarse el órgano descelularizado con, por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares, glicoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo heparán sulfato, condroitín-4-sulfato, condroitín-6-sulfato, dermatán sulfato, queratín sulfato, etc.). También puede pretratarse con células mesenquimales, endoteliales y/o
10 parenquimales para permitir una mejor adherencia de las células al tejido y/u órgano de la invención.

La prótesis, preferiblemente implantable, puede también comprender células mesenquimales (por ejemplo células mesenquimales de tejido adiposo), endoteliales o
15 parenquimales para su crecimiento en el tejido u órgano descelularizado. En el caso de células nerviosas también puede comprender células de Schwann.

La presente invención también se refiere a un método de regeneración de tejidos y/u órganos que comprende el uso de salicilato de metilo para descelularizar un órgano
20 y/o tejido e implantación del tejido y/u órgano descelularizado en un sujeto. El tejido o el órgano pueden ser del mismo sujeto al que se le va a implantar o de otro individuo de la misma especie o de otra especie.

La presente invención también se refiere al uso *in vitro* del tejido y/u órgano del cuarto
25 aspecto de la invención o de la composición del séptimo aspecto de la invención.

La presente invención también se refiere a un kit que comprende el tejido y/u órgano descelularizado del cuarto aspecto de la invención, la prótesis del sexto aspecto de la invención o la composición del séptimo aspecto de la invención. El kit además puede
30 comprender una o más soluciones útiles para resuspender o rehidratar el tejido y/u órgano del cuarto aspecto de la invención, por ejemplo solución salina estéril o un tampón farmacológicamente aceptable. Además el kit también puede comprender células (por ejemplo células mesenquimales, particularmente células mesenquimales de tejido adiposo; endoteliales o parenquimales para su crecimiento en el tejido u
35 órgano descelularizado o también en el caso de nervios, células de Schwann) u otros componentes útiles para la regeneración, por ejemplo, citoquinas y/o comprender

factores de crecimiento nervioso, epidérmico, endotelial, fibroblástico, semejante a insulina, factor neurotrófico derivado del cerebro, neuregulinas y neurotrofinas.

5 La presente invención también se refiere al uso del kit para la regeneración de tejidos y/u órganos. Preferiblemente para la regeneración de nervio periférico, tracto del sistema nervioso, nervio óptico, dermis, coroides, corazón, riñón, hígado, páncreas, bazo, vejiga, uréter o uretra. Más preferiblemente el nervio periférico es nervio periférico mixto.

10 En la presente invención los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" se usan indistintamente.

15 En la presente memoria, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de palabras tales como "un", "una" y "el" incluyen sus correspondientes referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

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

25 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

FIG. 1 Sección transversal de un nervio normal (A), una prótesis acelular (B) y una prótesis en regeneración (C). Las flechas señalan los núcleos celulares.

30 **EJEMPLOS**

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

35 **EJEMPLO 1** Uso del salicilato de metilo como agente descelularizador en nervio periférico

El objetivo es la descelularización, es decir, la eliminación de las células y restos celulares, de un órgano o tejido, conservando la matriz extracelular. Como ejemplo tomaremos la descelularización de un segmento de nervio. Los productos químicos utilizados se obtuvieron, excepto los que se detallan de Sigma-Aldrich (Madrid).

5

La pieza objeto del proceso se sometió a los siguientes pasos:

1. Se anestesió una rata, con una dosis letal (0,6 ml/kg) de ketamina (Imalgene™ 1000, Merial Laboratorios).

10

2. Se tomó un segmento de 1 cm de longitud de un nervio ciático.

3. Para romper las células se utilizó el choque osmótico, mediante la inmersión de la pieza en agua destilada o purificada durante, al menos, 24 horas. Se cambió el agua cuatro veces. El volumen de los líquidos de inmersión fue, al menos 20 veces el volumen de la pieza y los tiempos dependieron del tamaño de las piezas que se procesaron.

15

4. Se deshidrató en alcoholes de concentración creciente: 70, 96 y 100 %. Las piezas se mantuvieron en cada concentración de alcohol, al menos, 30 min y se hicieron al menos tres cambios.

20

5. Se sumergió en salicilato de metilo puro, con tres cambios, en el último de los cuales permaneció durante una noche, unas 18 horas.

25

6. Se extrajo el salicilato mediante alcohol absoluto en el que se hicieron al menos tres cambios y permaneció en el último cambio hasta el día siguiente (unas 18 horas).

7. Se hidrató en alcoholes de concentración decreciente: 100, 96 y 70 %. En cada concentración de alcohol se mantuvo durante 30 min y se realizaron tres cambios.

30

8. Se pasaron las piezas a agua destilada, con tres cambios de 30 min. Si es necesario, porque los restos de ADN sean de más de 50 ng/mg de peso seco, se puede tratar con DNasa 0,1mg/ml y lavar con agua destilada.

35

Todos estos pasos del 1 al 8 se realizaron en agitación continua en un agitador orbital con una frecuencia de 30 rpm.

9. Desde este punto se repitió el proceso, es decir se vuelve al paso 3.

5

10. Desde que se finaliza el último lavado, en agua destilada o en agua desionizada, el segmento de nervio descelularizado se puede, tras lavado en una disolución fisiológica, implantar, por ejemplo, en una neurectomía practicada en otra rata. La prótesis será recelularizada por las células del animal receptor reparando así la lesión causada por la neurectomía.

10

En la figura 1 se aprecia una sección del nervio ciático normal (A), una sección de prótesis descelularizada (B) y una sección de la misma prótesis con fibras nerviosas regeneradas (C). Obsérvese la ausencia de núcleos en la prótesis descelularizada.

15

La descripción precedente es la realizada con una prótesis implantada en nervio periférico. Si se desea descelularizar un órgano sólido como por ejemplo el pulmón, el intestino, el hígado, es necesario perfundir por la vía adecuada con los líquidos mencionados, por ejemplo: por vía aérea (pulmón), vía digestiva (intestino), vía sanguínea (hígado).

20

Por lo tanto, en la presente invención se demuestra la utilidad del salicilato de metilo para la descelularización de nervio periférico pero el experto puede extrapolar, sin necesidad de experimentación indebida, su uso para otros órganos de interés, como por ejemplo, otros nervios, dermis, coroides, corazón, riñón, hígado, páncreas, bazo, vejiga, uréter o uretra.

25

REIVINDICACIONES

1. Uso de salicilato de metilo para la descelularización de un tejido y/o un órgano *in vitro*.
5
2. Uso según la reivindicación 1 donde el tejido se selecciona de la lista que consiste en: nervio periférico, tracto del sistema nervioso central, nervio óptico, dermis, coroides, corazón, riñón, hígado, páncreas, bazo, vejiga, uréter y uretra.
- 10 3. Uso según la reivindicación 2 donde el nervio periférico es nervio periférico mixto.
4. Método para descelularizar un tejido o un órgano *in vitro* que comprende las siguientes etapas:
 - a. ruptura de las células de un órgano y/o tejido;
 - 15 b. deshidratación del órgano y/o tejido del paso (a) con alcoholes de gradación creciente;
 - c. Inmersión del órgano o tejido del paso (b) en salicilato de metilo;
 - d. Inmersión del órgano o tejido del paso (c) en alcohol absoluto;
 - e. hidratación del órgano o tejido descelularizado del paso (d) con alcoholes
20 de gradación decreciente.
5. Método según la reivindicación 4 donde en el paso (a) la ruptura de las células se realiza mediante choque osmótico, sonicación o por congelación y descongelación.
25
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5 que además comprende un paso (f) donde se utiliza nucleasa o DNasa sobre el órgano o tejido hidratado del paso (e).
- 30 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 que además comprende un paso (g) donde el órgano o tejido descelularizado se introduce en un líquido seleccionado de entre el grupo que consiste en: agua destilada, agua bidestilada, agua purificada, tampón fisiológico y medio de cultivo.
- 35 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 donde al menos una de las etapas se realiza en agitación.

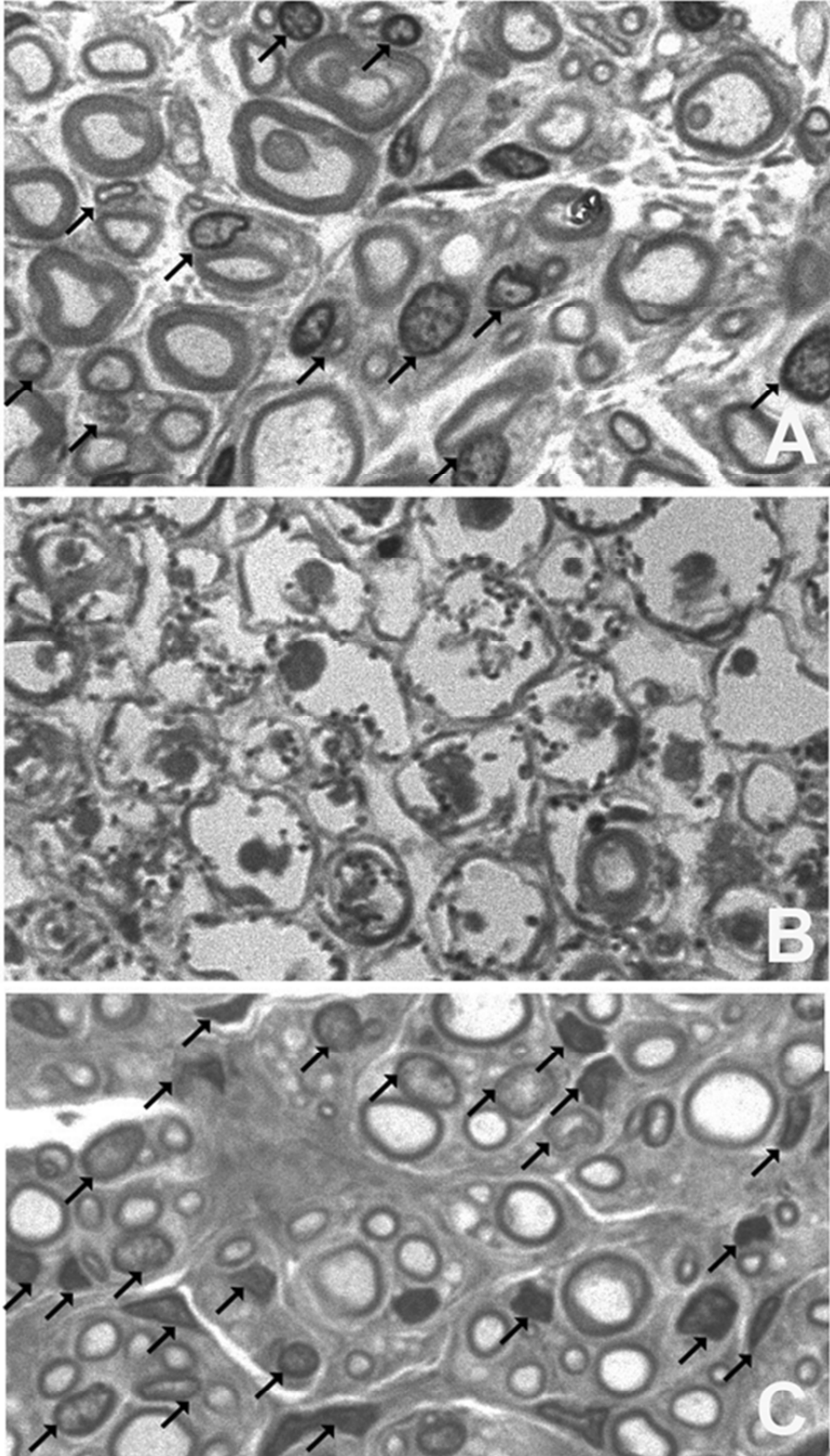
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 donde las etapas (a) a (e) se realizan al menos dos veces.
- 5 10. Método para descelularizar un tejido o un órgano en un sujeto sin vida que comprende las siguientes etapas:
- a. ruptura de las células de un órgano y/o tejido en un sujeto sin vida;
 - b. deshidratación del órgano y/o tejido con alcoholes de gradación creciente;
 - 10 c. descelularización del órgano o tejido del paso (b) por contacto con salicilato de metilo;
 - d. eliminación del salicilato de metilo del paso (c) con alcohol absoluto;
 - e. hidratación del órgano o tejido descelularizado del paso (d) con alcoholes de gradación decreciente;
- donde al menos una de las etapas se realiza mediante perfusión.
- 15 11. Método según la reivindicación 10 donde en el paso (a) la ruptura de las células se realiza mediante choque osmótico.
- 20 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 que además comprende en un paso (f) la utilización de nucleasa o DNasa sobre el órgano o tejido hidratado de paso (e).
- 25 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 que además comprende un paso (g) donde se introduce el tejido y/u órgano descelularizado en un líquido seleccionado de entre el grupo que consiste en: agua destilada, agua bidestilada, agua purificada, tampón fisiológico y medio de cultivo.
- 30 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 donde al menos una de las etapas se realiza en agitación.
- 35 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14 donde las etapas (a) a (e) se realizan al menos dos veces.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 15 donde el tejido se selecciona de la lista que consiste en: nervio periférico, tracto del sistema nervioso

central, nervio óptico, dermis, coroides, corazón, riñón, hígado, páncreas, bazo, vejiga, uréter y uretra.

- 5 17. Método según la reivindicación 16 donde el nervio periférico es un nervio periférico mixto.
18. Tejido y/u órgano descelularizado según el método descrito en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 17.
- 10 19. Tejido y/u órgano descelularizado según la reivindicación 18 que además comprende al menos un factor de crecimiento.
- 15 20. Tejido y/u órgano descelularizado según la reivindicación 19 donde el factor de crecimiento se selecciona de la lista que consiste en: factor de crecimiento nervioso, epidérmico, endotelial, fibroblástico, semejante a insulina, factor neurotrófico derivado del cerebro, neuregulinas y neurotrofinas.
- 20 21. Uso del tejido y/u órgano descelularizado según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20 como prótesis.
- 25 22. Uso del tejido y/u órgano descelularizado según la reivindicación 21 donde la prótesis se selecciona de la lista que consiste en: prótesis de nervio periférico, tracto del sistema nervioso central, nervio óptico, dermis, coroides, corazón, riñón, hígado, páncreas, bazo, vejiga, uréter y uretra.
- 30 23. Uso del tejido y/u órgano descelularizado según la reivindicación 22 donde la prótesis es una prótesis de nervio periférico mixto.
- 35 24. Prótesis que comprende el tejido y/u órgano según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20.
25. Prótesis según la reivindicación 24 donde la prótesis se selecciona de la lista que consiste en: nervio periférico, tracto del sistema nervioso central, nervio óptico, dermis, coroides, corazón, riñón, hígado, páncreas, bazo, vejiga, uréter y uretra.
26. Prótesis según la reivindicación 25 donde la prótesis es de nervio periférico mixto.

27. Composición que comprende el tejido y/u órgano descelularizado según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20.
- 5 28. Composición según la reivindicación 27 que además comprende al menos un factor de crecimiento.
29. Composición según la reivindicación 28 donde el factor de crecimiento se selecciona de la lista que consiste en: factor de crecimiento nervioso, epidérmico, endotelial, fibroblástico, semejante a insulina, factor neurotrófico derivado del cerebro, neuregulinas y neurotrofinas.
- 10
30. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29 para la elaboración de un medicamento.
- 15
31. Uso según la reivindicación 30 para la elaboración de un medicamento para la regeneración de tejidos y/u órganos.
32. Uso según la reivindicación 31 donde los tejidos y/u órganos a regenerar se seleccionan de la lista que consiste en: nervio periférico, tracto del sistema nervioso central, nervio óptico, dermis, coroides, corazón, riñón, hígado, páncreas, bazo, vejiga, uréter y uretra.
- 20
33. Uso según la reivindicación 32 donde el nervio periférico es nervio periférico mixto.
- 25
34. Uso *in vitro* del tejido y/u órgano según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20.

Fig. 1





- ②① N.º solicitud: 201531544
②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.10.2015
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N5/071** (2010.01)
A61K31/60 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WANG Q., <i>et al.</i> The preparation and comparison of decellularized nerve scaffold of tissue engineering. Journal of biomedical materials research. Part A United States 19/02/2014 (en línea) VOL: 102 No: 12 Pags: 4301 - 4308 ISSN 1552-4965 (Electrónico) Doi: doi:10.1002/jbm.a.35103 pubmed:24497414. Materiales y métodos, 2º párrafo.	1-34
A	SRIDHARAN R., <i>et al.</i> Decellularized grafts with axially aligned channels for peripheral nerve regeneration. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials Netherlands 14/10/2014 (en línea)VOL: 41 Pags: 124 - 135 ISSN 1878-0180 (Electrónico) Doi: doi:10.1016/j.jmbbm.2014.10.002 pubmed:25460409. Resumen, y apartado 2.2 de Materiales y métodos.	1-34
A	CRAPO P M, <i>et al.</i> An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials England 05/02/2011 00/04/2011 VOL: 32 No: 12 Pags: 3233 - 3243 ISSN 1878-5905 (Electrónico) Doi: doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.057 pubmed:21296410. Apartados 3 y 4.	1-34

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
08.08.2016

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/4

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

C12N, A61K

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

INVENES WPIAP EPODOC TXPEA TXPEB TXPEC TXPEE TXPEF TXPEH TXPEI TXPEP TXPEPEA TXPES TXPUSE0A TXPUSE1A TXPUSEA TXPUSEB TXPW0EA BIOSIS COMPDX EMBASE INSPEC MEDLINE NPL XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.08.2016

Declaración

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

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WANG Q., <i>et al.</i> Journal of biomedical materials research. Part A United States 19/02/2014 (en línea) VOL: 102 No: 12 Pags: 4301 - 4308 ISSN 1552-4965 (Electrónico) Doi: doi:10.1002/jbm.a.35103 pubmed:24497414.	19.02.2014
D02	SRIDHARAN R., <i>et al.</i> Journal of the mechanical behavior of biomedical materials Netherlands 14/10/2014 (en línea)VOL: 41 Pags: 124 - 135 ISSN 1878-0180 (Electrónico) Doi: doi:10.1016/j.jmbbm.2014.10.002 pubmed:25460409.	14.10.2014

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

No se han encontrado documentos en el estado de la técnica que divulguen el uso del salicilato de metilo para descelularizar órganos o tejidos, ni documentos que divulguen el método de la solicitud tal y como está reivindicado, por lo que las reivindicaciones 1 a 34 de la solicitud tienen novedad, según el artículo 6 de la Ley de Patentes 11/1986. Tampoco se han encontrado documentos que, solos o en combinación con otros, pudieran conducir al experto en la materia a los usos y métodos de la invención, por lo que las reivindicaciones 1 a 34 de la presente solicitud cumplen también el requisito de actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

Se citan en esta opinión escrita documentos que se consideran cercanos a la invención, por divulgar procedimientos de descelularización de tejido nervioso, pero que no afectan su novedad ni su actividad inventiva.

Así, el documento D01 describe tres métodos diferentes de descelularización de tejido nervioso periférico, y compara los resultados obtenidos con cada uno de ellos. A diferencia del método reivindicado en la presente solicitud, en ningún caso se emplea salicilato de metilo para el proceso de descelularización.

Tampoco en el documento D02 se utiliza salicilato de metilo para el proceso descrito de descelularización, sino diferentes detergentes.

En consecuencia, las reivindicaciones 1 a 34 de la solicitud satisfacen los requisitos de patentabilidad establecidos en el art. 4.1 de la Ley de Patentes 11/1986.