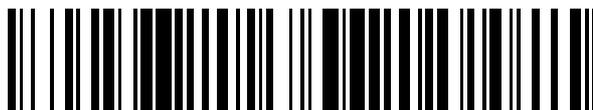


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 932**

51 Int. Cl.:

**A61F 2/02** (2006.01)

**C08L 5/08** (2006.01)

**C08L 5/10** (2006.01)

**A61L 27/44** (2006.01)

**A61L 27/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2008 PCT/ES2008/000640**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.04.2010 WO10040865**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2008 E 08874660 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2351538**

54 Título: **Nuevo biomaterial a partir de la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.06.2018**

73 Titular/es:

**HISTOCELL S.L. (100.0%)**  
**Parque Tecnológico de Bizkaia Edificio 800, 2ª planta**  
**48160 Derio, Bizkaia, ES**

72 Inventor/es:

**FONT PÉREZ, JULIO;**  
**DEL OLMO BASTERRECHEA, MAITE;**  
**CASTRO FEO, MARÍA BEGOÑA;**  
**INFANTE MARTÍNEZ, ARANTZA;**  
**ALONSO VARONA, ANA ISABEL y**  
**PALOMARES CASADO, TEODORO**

74 Agente/Representante:

**ARIZTI ACHA, Monica**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 670 932 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).

**DESCRIPCIÓN**

Nuevo biomaterial a partir de la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano

**5 Campo técnico de la invención**

La presente invención hace referencia a un biomaterial, concretamente un hidrogel, formado a partir de la matriz extracelular del cordón umbilical para su aplicación en medicina regenerativa. En particular, la invención hace referencia a un biomaterial compuesto por glucosaminoglucanos aislados exclusivamente de la gelatina de Wharton del cordón umbilical que opcionalmente puede contener células, y también a los métodos para su producción y uso.

**Antecedentes de la invención**

Los biomateriales formados por polímeros juegan un papel central en medicina regenerativa ya que proporcionan anclajes temporales tridimensionales para la adhesión, la proliferación y la diferenciación de células trasplantadas. Este carácter tridimensional proporciona una plataforma adecuada para la comunicación intercelular y la relación de las células con los componentes del biomaterial. La biointeracción que, con el paso del tiempo, se produce entre la matriz y las células, 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 (Dawson *et al.*, 2008).

Para que sucedan estos fenómenos, es necesario que el biomaterial permanezca en el lugar de la aplicación durante un tiempo limitado hasta su reabsorción, conservando su estructura durante un tiempo suficiente para dar lugar a una acción celular adecuada con consecuencias regenerativas.

Un tipo de biomaterial concreto, los hidrogeles, poseen numerosas propiedades que los hacen muy adecuados para su aplicación en ingeniería tisular.

Los hidrogeles son estructuras formadas por polímeros hidrófilos de origen natural o sintético interconectados, con capacidad de contener una gran cantidad de agua en el interior de su estructura, desde el 10-20 % hasta cientos de veces su propio peso. Estos geles exhiben una morfología semi-sólida cuyo entramado tridimensional se presenta como candidato ideal para formar una matriz estructural capaz de actuar como soporte. Esta estructura tridimensional puede estar formada por reticulación tanto física como química. La reticulación física produce hidrogeles reversibles cuya estructura puede invertirse en función de la aplicación final, mientras que la reticulación química produce hidrogeles permanentes cuya estructura se mantendrá a lo largo de toda la aplicación (Coburn *et al.*, 2007). Por lo tanto, los hidrogeles son materiales poliméricos (de origen natural o sintético) reticulados en forma de red tridimensional, que se hinchan en contacto con el agua formando materiales flexibles, elásticos y que retienen una fracción significativa de la misma en su estructura sin disolverse.

Los hidrogeles presentan una serie de características particulares tales como:

1. Carácter hidrófilo: 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 vivos (Elisseeff *et al.*, 2005).
2. Son insolubles en agua: debido a la existencia de una red polimérica tridimensional en su estructura.
3. Tienen una consistencia suave y elástica que está determinada por el monómero hidrófilo de partida y la baja densidad de reticulación del polímero.

Tienen la capacidad de hincharse en presencia de agua o soluciones acuosas, aumentando considerablemente su volumen hasta alcanzar un equilibrio químico-físico, pero sin perder su forma. Esta capacidad de hincharse proporciona un microambiente acuoso comparable al que se ven 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 cruciales y esenciales para la viabilidad celular, así como el transporte de los desechos celulares fuera del hidrogel (Torres *et al.*, 2000).

El cordón umbilical es una estructura muy vascularizada con un componente celular importante. Las células y el sistema vascular están integrados en un tejido conectivo gelatinoso denominado Gelatina de Wharton (GW). La GW contiene una baja cantidad de células y altos niveles de matriz extracelular, compuesta principalmente por colágeno, ácido hialurónico y glucosaminoglucanos sulfatados.

Los glucosaminoglucanos (GAG), también denominados mucopolisacáridos, son heteropolisacáridos que se encuentran en los organismos unidos a un núcleo proteico formando macromoléculas denominadas proteoglicanos. Estos pueden encontrarse en las superficies de las células o en la matriz extracelular y desempeñan importantes

funciones en las interacciones que se producen entre las células y entre las células y la matriz extracelular. Se encuentran en forma sulfatada y no sulfatada y la característica común de estas moléculas es su composición en una secuencia repetida de disacáridos formada por dos azúcares distintos: uno de ellos es habitualmente un hexuronato mientras que el otro es una hexosamina. La variación configuracional en la unión de los disacáridos y la posición de la sulfatación lleva a un incremento de la diversidad en las propiedades físicas y químicas de estas cadenas. El elevado contenido en sulfato y la presencia de ácido urónico confiere una gran carga negativa a los GAG, por lo que la gran cantidad de ellos en la GW hace que este tejido se encuentre extremadamente hidratado.

Existen diversos tipos de GAG que están directamente implicados en las funciones celulares básicas, no solo debido a su estructura, sino también porque son lugares de anclaje de diversas moléculas de señalización celular.

El ácido hialurónico es el GAG más abundante de la GW. Es el único miembro no sulfatado de la familia de 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 en varios tipos de células y se secreta al espacio extracelular donde interactúa con otros componentes de la matriz extracelular creando la estructura de soporte y protección que rodea a las células (Collins *et al.*, 2008). Es un polímero lineal, grande y polianiónico, y una sola molécula puede tener un peso molecular de 100.000 a  $5 \cdot 10^6$  Da (Toole *et al.*, 2004; Bertolami *et al.*, 1992). Adopta una estructura en espiral que ocupa un gran volumen, dando lugar a soluciones de alta viscosidad. Las moléculas individuales de ácido hialurónico se asocian entre ellas formando redes o entramados. En los tejidos en desarrollo, el ácido hialurónico es considerado la principal macromolécula estructural implicada en la proliferación y la migración celular.

El ácido hialurónico ha sido implicado en diversos procesos, tales como vascularización, morfogénesis, reparación e integridad general de la matriz extracelular. Se sabe que el ácido hialurónico contenido en gran cantidad en el líquido amniótico, favorece la reparación de las heridas fetales (Longaker *et al.*, 1989). Además, se han observado variaciones en sus propiedades moleculares entre la piel sana y las cicatrices, siendo seguramente distinto el ácido hialurónico presente en las cicatrices normales al de las hipertróficas (Ueno *et al.*, 1992).

El condroitín sulfato es un polímero lineal formado por la repetición de un dímero de ácido D-glucurónico y N-acetilgalactosamina. Su utilidad ha sido probada en terapias dirigidas a combatir artropatías mediante la inhibición de la actividad de las enzimas responsables de la degradación de la matriz de los componentes del cartílago. También actuaría como un antiinflamatorio mediante la inhibición del complemento y es útil en el tratamiento de trastornos tromboembólicos, en cirugía y clínicas oftalmológicas.

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

Los glucosaminoglucanos, en general, y en particular la heparina, tienen la capacidad de modular la actividad de las cascadas plasmáticas, potenciando la inhibición de la vía intrínseca de la coagulación e inhibiendo la vía clásica de activación del complemento en diversos puntos (Rabenstein, 2001). Otras funciones conocidas de la heparina son la inhibición de la angiogénesis, el crecimiento humoral y su actividad antivírica.

El heparán sulfato tiene una estructura muy relacionada con la heparina. Se distribuye ampliamente en los tejidos animales y entre sus funciones destacan la adhesión celular y la regulación de la proliferación celular. Posee un efecto protector frente a la degradación de proteínas, regulando su transporte a través de la membrana basal e interviniendo también en su internalización (Rabenstein, 2001).

Existen varios documentos de patente que se refieren a mucopolisacáridos obtenidos de origen animal o humano. El documento US 3.887.703 se refiere a mezclas de mucopolisacáridos obtenidas a partir de tegumentos cutáneos y del cordón umbilical de fetos ovinos o bovinos. El único ejemplo que utiliza un cordón umbilical es de un feto de vaca de 1-9 meses y no menciona que se elimine la membrana ni los vasos ya que la primera operación es un molido a una temperatura por debajo de 10 °C. No se mencionan los mucopolisacáridos individuales que forman las mezclas ni las cantidades presentes, los productos activos se identifican por la cantidad de hexosaminas que están presentes en la mezcla. Con los extractos, se preparan composiciones para el tratamiento del cabello y del cuero cabelludo grasiento, así como para las inflamaciones, tanto en forma de inyectable como por ingestión oral.

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 y agua que en agua, y un mucopolisacárido que forma parte de un fármaco, en el que cristales o partículas del fármaco están distribuidos en la superficie de las partículas del mucopolisacárido y en el que dicho fármaco se disuelve en agua más deprisa que si estuviera solo. Dicha composición puede tener forma granular.

En la solicitud de patente WO 2008/021391 A1, se describen 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 es preferentemente seco y puede ser liso, tubular o adaptado para encajar en una estructura específica. La invención también proporciona métodos de fabricación del biomaterial que comprende al menos una capa de la membrana del cordón umbilical, así como métodos para obtener dichos biomateriales y su uso para la reparación de tejidos u órganos.

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

También se menciona que el biomaterial también puede comprender colágeno que no provenga de cordones umbilicales y que tenga origen comercial o que se haya aislado de otros tejidos y a partir de métodos conocidos en el estado de la técnica. Además los autores añaden, que el biomaterial puede comprender compuestos no estructurales tales como factores de crecimiento, hormonas, antibióticos, factores inmunomoduladores, etc. R. E. Baier, Journal of Biomaterials Application, vol. 2 abril 1988, 615-626, XP002590650, menciona el uso de la gelatina de Wharton para productos terapéuticos. En la patente española ES 8600613 se 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 principal componente es colágeno, y para hacer que el tejido corporal sea adecuado para utilizarse como injerto corporal, que comprende extraer dicho tejido con al menos un detergente, conservando al mismo tiempo un tamaño y forma adecuados para su injerto en el cuerpo.

El documento de patente ES 2 180 653 T3 describe métodos para transformar materiales biológicos en sustancias que han sufrido autólisis para eliminar al menos el 70 % de las células y métodos de tratamiento de dicho material para inhibir su mineralización posterior a la implantación en un ser humano o animal. La patente reivindica que el material biológico de partida puede ser, entre otros, el cordón umbilical; aunque específicamente se refiere a una válvula aórtica porcina. No obstante, la descripción no contiene detalle alguno respecto a la realización con cordón umbilical. El biomaterial resultante se utiliza para la creación de una válvula cardíaca bioprotésica.

El documento de patente US 4.240.794 se refiere a la preparación de cordones umbilicales de origen humano o animal para su utilización como reemplazo vascular. Específicamente el documento describe una técnica de deshidratación en alcohol del cordón umbilical seguido de un método de fijación en la configuración deseada. Se describe que una vez que el cordón umbilical se ha limpiado de posibles restos de otros tejidos, éste se monta sobre un mandril y se sumerge en una solución concreta de alcohol etílico durante el tiempo necesario para que se deshidrate. Tras la deshidratación, el cordón se sumerge en una solución de aldehído al 1 % para su fijación.

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

Existen documentos de patente que utilizan cordón umbilical para obtener células de su interés, para lo cual llevan a cabo procesos para separar la gelatina de Wharton y eliminarla, obteniendo así dichas células. Por ejemplo, el documento PCT 98/17791 describe el aislamiento de pre-condrocitos del cordón umbilical, que posteriormente se utilizan de forma terapéutica para producir cartílago. De forma similar, en el documento WO 2004/072273 A1 se describen células progenitoras extraídas de la gelatina de Wharton existente en la zona perivascular del cordón umbilical y se utilizan para reparar tejidos humanos.

Sin embargo, no existe ningún documento que mencione un biomaterial formado por glucosaminoglucanos localizados en la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano, sin membrana ni vasos sanguíneos de cordón umbilical humano, que pueda formar un hidrogel que se adapte a las características de viscosidad necesarias, etc. para utilizarse en diversas patologías humanas.

Por lo tanto, el biomaterial de la presente invención está compuesto exclusivamente por los GAG que forman la matriz extracelular del cordón umbilical denominada GW. La matriz extracelular es una sustancia biológica compleja y específica de tejido. La matriz extracelular derivada de vasos sanguíneos de la vejiga urinaria es completamente diferente de la derivada de la dermis (Hiles & Hodde, 2006). De esta manera, aunque en la bibliografía se conocen varios intentos de sintetizar matriz extracelular, no se ha conseguido por el momento obtener una composición exacta que simule las condiciones naturales de un determinado tejido.

El biomaterial desarrollado en la presente invención ofrece una estructura tridimensional que permite su utilización como matriz base en ingeniería tisular y además, aplicado directamente, o con células, en una patología, interviene en el proceso regenerativo, ejerciendo un efecto llamada sobre las células del propio tejido y proporcionando un entorno favorable para la activación de los procesos celulares.

La GW se caracteriza por contener un número muy bajo de células y, sin embargo, una gran cantidad de matriz extracelular (colágeno y GAG). Es decir, las células que se encuentran en la GW están muy estimuladas y son capaces de producir altos niveles de matriz. Esto es debido a que en la GW se acumulan grandes cantidades de factores de crecimiento, entre los que se encuentran el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), el factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF-I), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Estos factores de crecimiento ejercen su papel regulador de la actividad celular mediante la unión a receptores específicos, algunos de los cuales se encuentran en los diversos GAG que componen la GW. Estos factores de crecimiento controlan la proliferación, diferenciación y síntesis celular y el remodelado de la matriz extracelular que forma la GW. La gran cantidad de matriz sintetizada proporciona una gran resistencia mecánica, elasticidad y una gran capacidad de hidratación que se utiliza para prevenir la oclusión de los vasos sanguíneos provocada por los movimientos de contracción del útero o fetales (Sobolewski et al., 2005).

A diferencia de otros biomateriales, el biomaterial de la presente invención está compuesto por una combinación de distintos GAG procedentes de la GW del cordón umbilical. De forma mayoritaria está compuesto por ácido hialurónico, pero además, a diferencia de otros compuestos de GAG, contiene dermatán sulfato, heparán sulfato, heparina, queratán sulfato, condroitín-4-sulfato y condroitín-6-sulfato. Esta combinación de GAG mejora la bioactividad del biomaterial, puesto que cada uno de ellos ejerce funciones reguladoras del comportamiento celular. Por ejemplo, se sabe que el heparán sulfato y la heparina son los principales lugares de unión para el FGF y el EGF (Kanematsu et al., 2003; Ishihara et al., 2002), los cuales los protegen de la proteólisis y permiten concentraciones locales de estos factores en el entorno celular, creando el microambiente molecular adecuado para una gran activación celular (Malkowski et al., 2007).

La combinación de GAG presentes en este biomaterial proporciona numerosos lugares específicos de unión de moléculas de señalización que van a permitir, en el lugar de la aplicación, una alta activación de las células del propio tejido para la síntesis de altos niveles de matriz extracelular que va a regenerar y reparar el defecto tratado.

Además, el origen del biomaterial de la invención proporciona una estructura natural de origen humano de una zona no inmunogénica, cuya eliminación se integra en los ciclos fisiológicos normales, lo que evita las reacciones de los biomateriales de origen animal o los efectos secundarios que pueden producir algunos biomateriales sintéticos, como puede ser la inflamación, induración (endurecimiento de los tejidos de un órgano), aparición de granulomas, necrosis en mucosas y complicaciones tisulares por las sustancias tóxicas empleadas en su elaboración.

En el cordón umbilical, una de las funciones más importantes de los GAG es proporcionar fuerza, elasticidad y resistencia para proteger el sistema vascular que se encuentra en su interior de las agresiones externas. De hecho, la síntesis deficitaria de estas moléculas es la causante de patologías importantes desarrolladas durante el embarazo (Gogiel et al., 2005). La obtención de un biomaterial compuesto por los 7 tipos de GAG diferentes que forman parte del cordón umbilical, sería capaz de formar reticulaciones entre sus fibras, simulando lo que sucede en el organismo y proporcionando de esta manera una fuerza, elasticidad, resistencia y compresión similar a la que confieren en el cordón.

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

#### 45 Descripción de las figuras

Figura 1: Caracterización y cuantificación de GAG presentes en el biomaterial de la invención. El gráfico de barras muestra los diferentes tipos de GAG presentes en el biomaterial de la invención, así como el porcentaje de cada uno de ellos en el mismo. AH: ácido hialurónico, QS: queratán sulfato, C6S: condroitín-6-sulfato, HS: heparán sulfato, C4S: condroitín-4-sulfato, DS: dermatán sulfato, H: heparina.

Figura 2: Comprobación de la presencia de GAG en la muestra y de la ausencia de células y DNA/RNA en las mismas mediante tinción histológica.

En las imágenes de la izquierda se observan tinciones de las muestras con células y en las de la derecha tinciones del biomaterial solo. A, B: tinción con hematoxilina y eosina; C, D: tinción con verde de metilo pironina; E, F: tinción con azul alcian.

Figura 3: Imágenes de la estructura tridimensional interna del biomaterial de la invención por microscopía electrónica de barrido.

La imagen muestra la estructura interna del biomaterial de la invención a dos aumentos diferentes (A: 10  $\mu\text{m}$  y B: 5  $\mu\text{m}$ ), en el que se observan las unidades de GAG interconectadas entre sí, ofreciendo una estructura porosa muy homogénea.

Figura 4: Resultados del estudio de toxicidad de las células dispuestas en el biomaterial de la invención.

Los gráficos muestran curvas de citotoxicidad de células CMMA (células madre mesenquimáticas de tejido adiposo) (Figura A), fibroblastos de ratón (Figura B9), L929 (Figura C), osteoblastos (Figura D), condrocitos (Figura E) y queratinocitos (Figura F). Los resultados se dan con respecto a un control (células sin biomaterial) y a un control positivo (células en un biomaterial tóxico determinado por la norma ISO-10993, PVC).

5 Como se puede observar en las gráficas, el biomaterial no produce toxicidad en ninguno de los tipos de células ensayados, puesto que la actividad mitocondrial de las células dispuestas sobre el biomaterial no muestra diferencias con respecto a las células de control (en condiciones estándar de cultivo).

Figura 5: Imagen macroscópica del biomaterial tridimensional

10 En esta imagen se observa la estructura tridimensional macroscópica del biomaterial sólido de la invención tras su liofilización para la cual se ha utilizado como molde una placa de cultivo estándar de 24 pocillos. La imagen corresponde a la cantidad de biomaterial solidificado en un pocillo.

### 15 Descripción detallada de la invención

El cordón umbilical contiene grandes cantidades de GAG (sulfatados y no sulfatados) formando parte del tejido conectivo 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 proporciones menores de GAG sulfatados (Danishefsky *et al.*, 1966). Además, estudios histológicos del cordón umbilical han sugerido la presencia de heparina (Moore *et al.*, 1957). Es muy probable también que el cordón umbilical tenga más GAG sulfatados minoritarios que no se han reconocido hasta el momento.

25 La invención descrita en el presente documento es un hidrogel que consiste en un extracto acuoso, que consiste en GAG obtenidos exclusivamente de la GW del cordón umbilical. Este hidrogel está completamente exento de las células presentes en la GW del cordón umbilical humano a partir del cual se obtiene el biomaterial, por lo que no presenta componentes inmunogénicos y carece de membrana y vasos sanguíneos del cordón umbilical humano. El biomaterial está formado por una mezcla de glucosaminoglucanos seleccionados del grupo que comprende: ácido hialurónico, queratán sulfato, condroitín-6-sulfato, heparán sulfato, condroitín-4-sulfato, dermatán sulfato y heparina.

30 El biomaterial se encuentra preferentemente formando la siguiente combinación y proporción de la mezcla de GAG: ácido hialurónico (65-75 %), queratán sulfato (5-15 %), condroitín-6-sulfato (6-8 %), heparán sulfato (3-7 %), condroitín-4-sulfato (2-6 %), dermatán sulfato (1-5 %) y heparina (0,1-2 %), más preferentemente la combinación de GAG es: ácido hialurónico (70 %), queratán sulfato (10 %), condroitín-6-sulfato (7 %), heparán sulfato (5 %), condroitín-4-sulfato (4 %), dermatán sulfato (3 %) y heparina (1 %).

35 La presente invención también se refiere al biomaterial compuesto por el hidrogel anteriormente descrito, que opcionalmente contiene células. De esta manera se potencia la acción del hidrogel en el proceso regenerativo y de reparación tisular en aquellos tejidos muy dañados o sin posibilidad de aporte celular *in situ* por parte del paciente, gracias a que el biomaterial presenta células sanas del mismo tipo que las del tejido afectado. Las células contenidas en el biomaterial pueden ser, entre otras: células madre mesenquimáticas indiferenciadas o diferenciadas en otra estirpe celular, células madre hematopoyéticas indiferenciadas o 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 leucocitario, células corneales, células endoteliales o células epiteliales.

45 La presente invención se divide en las siguientes secciones: (i) obtención de extracto de GAG a partir de gelatina de Wharton del cordón umbilical (ii) producción de un hidrogel a partir de los GAG aislados de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (iii) caracterización del hidrogel obtenido y (iv) usos del biomaterial.

### 50 Obtención de un extracto de GAG de la GW del cordón umbilical.

El procedimiento de obtención del biomaterial comprende las siguientes etapas:

- a. Obtención de un cordón umbilical humano;
- 55 b. Tratamiento del cordón umbilical con una solución salina y antibióticos;
- c. Eliminación de toda la sangre de la superficie del cordón;
- d. Fragmentación del cordón en secciones de 1-2 cm;
- e. Limpieza de toda la sangre retenida en el interior;
- f. Eliminación de la membrana y de los vasos sanguíneos del cordón umbilical;
- 60 g. Separación de la sustancia gelatinosa que comprende la gelatina de Wharton;
- h. Digestión enzimática de la sustancia gelatinosa obtenida; y
- i. Precipitación y aislamiento de los GAG;

Concretamente, para aislar los glucosaminoglucanos de la GW del cordón umbilical se procede de la siguiente

manera:

Obtención de la Gelatina de Wharton

5 Inmediatamente después del parto, se recoge el cordón umbilical y se procesa o se mantiene a una temperatura de 4 °C hasta su procesamiento, no deben transcurrir más de 24 horas en estas condiciones.

10 Para su procesamiento, el cordón umbilical se mantiene preferentemente en condiciones estériles en una campana de flujo laminar de nivel de bioseguridad II. Se somete a al menos tres lavados sucesivos con una solución de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) o con tampón fosfato 1X (PBS 1X) con una mezcla de antibióticos (penicilina, estreptomycin, anfotericina B) y/o una solución de tampón de lisis de eritrocitos, para eliminar por completo los restos de sangre.

15 Una vez limpia de sangre la superficie del cordón umbilical, se transfiere a una placa de Petri y se fragmenta en secciones de 1-2 cm. Al cortar el cordón en fragmentos es posible que se libere sangre retenida en el interior de los vasos sanguíneos del cordón umbilical, por lo que será necesario en este caso limpiar a fondo los fragmentos de cordón.

20 El cordón umbilical consta a nivel estructural de dos arterias umbilicales y una vena umbilical, sostenidas por una matriz consistente que es la GW y recubierto de una fina membrana. Para obtener exclusivamente la GW, se procede a eliminar de forma mecánica la membrana y los vasos sanguíneos. Para ello, se seccionan longitudinalmente los fragmentos de cordón umbilical y con la ayuda de un escalpelo y unas pinzas se retiran con cuidado tanto la membrana del cordón umbilical, así como los vasos sanguíneos. La sustancia gelatinosa que se obtiene como consecuencia de ésta separación mecánica es la GW. Generalmente, a partir de un cordón umbilical de 25 a 200 g se obtienen entre 20 y 160 g de gelatina de Wharton.

Extracción de GAG de la Gelatina de Wharton

30 Para la obtención de los GAG a partir de cartílago humano por medio de digestión enzimática con la enzima papaína (Rogers et al., 2006) para obtener GAGs a partir de cartílago humano mediante digestión enzimática con el enzima papaína (SIGMA, Ref: P-4762) se utilizó el protocolo descrito en la bibliografía (Rogers et al., 2006), con algunas modificaciones.

35 La GW obtenida en el punto anterior se sumerge en 10 ml de la solución tampón de extracción (L-Cisteína 5 mM, solución tampón Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, EDTA 5 mM, papaína 10 mg (14 U/mg), pH 7,5) durante 24-48 horas a 60 °C, para su completa digestión.

40 Una vez digerida en su totalidad la GW, se centrifuga para eliminar el residuo inservible de la digestión. En este punto, se observa que el volumen de la digestión es superior al volumen de partida. Este aumento se debe a la disolución de los GAG presentes en la GW y por lo tanto a la liberación del agua que éstos acumulan.

Centrifugada la muestra, se transfiere el sobrenadante a otro recipiente y se procede a la precipitación de los GAG presentes en la muestra.

45 Precipitación y aislamiento de los GAG de la GW del cordón umbilical.

50 Los GAG de la GW se precipitaron con 5 volúmenes de etanol al 100 %. Mediante esta etapa se precipitan los GAG de la muestra así como las sales presentes en ésta. La precipitación ocurre debido a que las moléculas de agua presentes en la muestra interactúan con las moléculas de etanol, de tal forma que las moléculas de agua no pueden interactuar con los GAG de la muestra, volviéndose estos últimos insolubles en el agua, y por lo tanto precipitando. De esta manera, justo después de añadir el etanol y agitar el tubo, se observa un precipitado de color blanquecino. Los GAG se dejan precipitando 12 horas a -20 °C. Una vez precipitados, se procede a centrifugar 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 totalmente el sobrenadante.

60 Una vez precipitada la muestra de los GAG, se deja secando el residuo sólido durante un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente hasta que se haya evaporado todo el etanol. Una vez evaporado el etanol, la muestra de los GAG se resuspende en H<sub>2</sub>O Mili-Q y se mantiene almacenada a 4 °C indefinidamente.

La resistencia mecánica de este tipo de materiales es baja; no están pensados para soportar cargas, a no ser que se combinen con otro tipo de materiales tipo composites o fosfatos cálcicos, sino para realizar una acción bioactiva regeneradora en la zona dañada. Sin embargo, la gran afinidad que se da entre las moléculas de polisacáridos que componen este hidrogel, hace que mantengan una gran cohesión entre ellas, manteniéndose en el lugar de

inyección y presentando un carácter adhesivo.

Reticulación: obtención de hidrogel

5 Existen otras aplicaciones terapéuticas que requieren un biomaterial más resistente y permanente, con una estructura interna que permita su colonización por células procedentes bien de los tejidos adyacentes en el lugar de aplicación o por células dispuestas en el biomaterial previamente a su implantación. En este caso el biomaterial de la invención actuaría a modo de matriz tridimensional bioactiva para inducir la curación y reparación de una lesión tisular.

10 El ácido hialurónico, el condroitín-6- y -4-sulfato, el queratán sulfato, el dermatán sulfato, el heparán sulfato y la heparina, regulan la actividad celular y activan la síntesis de nueva matriz extracelular. La diversidad de GAG presentes en el biomaterial permite la existencia de numerosos lugares de unión específicos para factores de crecimiento que regulan los procesos de proliferación y diferenciación celular, así como la capacidad de síntesis de nueva matriz extracelular y factores de crecimiento por parte de las células. Este efecto produce una mayor capacidad de respuesta en los tejidos afectados y acelera la regeneración e incluso permite la curación en el caso de zonas muy degradadas, como es el caso de úlceras crónicas.

15 Para que el biomaterial pueda utilizarse como una matriz tridimensional, el extracto de los GAG tiene que estabilizarse, aumentando sus propiedades mecánicas y permitiendo la formación de una estructura tridimensional. Para conseguir estos objetivos, los GAG pueden modificarse o reticularse químicamente para formar un material en forma de hidrogel sólido. Estas modificaciones químicas típicamente implican grupos carboxílicos o alcohol.

20 Para la obtención de un hidrogel estable y sólido, es necesario someter la muestra a una reacción de reticulación (reticulación, polimerización). Este proceso implica que las cadenas de un polímero soluble en agua se convierten en insolubles (Elisseff et al., 2005).

25 Los hidrogeles obtenidos mediante la reticulación poseen propiedades únicas que los hace potencialmente útiles en ingeniería tisular: alto contenido acuoso para el transporte de nutrientes o sustancias de desecho, elasticidad y capacidad de encapsular o de inmovilizar células *in situ* en un microambiente 3D. La densidad de la reticulación influye directamente en el tamaño del poro del hidrogel y, por lo tanto, en las propiedades físicas del mismo, tal como, por ejemplo, el contenido acuoso o la resistencia mecánica. De esta manera, un hidrogel con una densidad de reticulación grande y, por lo tanto, un tamaño de poro muy pequeño, absorberá menos agua y poseerá una mayor resistencia mecánica que un hidrogel con un grado menor de reticulación y con un tamaño de poro grande.

30 La formación de un hidrogel por reticulación se puede llevar a cabo mediante diversos métodos: cambios de temperatura, reacciones químicas y fotopolimerización.

35 En la presente invención la reacción de reticulación se lleva a cabo de la siguiente manera: se obtiene una solución acuosa del polímero a reticular (en este caso una solución acuosa de los GAG) y se añade el reactivo químico que producirá la reticulación. En este caso para desarrollar el hidrogel se utiliza EDC (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil carbodiimida) ya que el EDC activa a grupos carboxilo en soluciones acuosas. Estos grupos carboxilo activados son capaces de reaccionar con aminos primarias o grupos hidroxilo, dando como resultado enlaces amida o éster. Una vez formado el hidrogel, se lava varias veces con PBS para eliminar los restos de EDC que puedan quedar. De esta manera se consigue que las moléculas de GAG absorban grandes cantidades de agua, formando un hidrogel de aspecto sólido y poroso (Pieper et al., 1999; Wissink et al., 2001).

40 El hidrogel con una forma y tamaño específico, se solidifica durante el proceso de reticulación en el molde destinado para tal fin, de forma que adopta la forma y el tamaño deseado dependiendo del molde que se utilice.

45 Los hidrogeles sólidos se pueden deshidratar mediante el proceso denominado liofilización, para obtener de esta manera una estructura porosa, debido a la eliminación de las moléculas de agua intercaladas entre las moléculas de GAG presentes en el hidrogel (Fig. 5). Además, una vez liofilizado el biomaterial, se puede caracterizar la estructura tridimensional del hidrogel mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) (Fig. 3). Mediante la liofilización se congela el hidrogel sólido obtenido y una vez congelado se introduce en una cámara de vacío para que elimine el agua por el proceso denominado sublimación. Mediante diversos ciclos de congelación se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el hidrogel original.

50 Una vez obtenido el hidrogel en su forma final, se procede a su esterilización, mediante la exposición a radiación ultravioleta durante un periodo de 40 minutos. Las pruebas de esterilidad realizadas sobre el hidrogel demostraron que el biomaterial se esterilizó de forma óptima.

Una vez esterilizado, el hidrogel se encuentra en formato de producto final, listo para su aplicación directa o su asociación con células.

Ensayos de asociación de células con el hidrogel de la invención demostraron que el biomaterial no produce efectos tóxicos sobre las células, siendo su capacidad de proliferación similar a la que se produce en condiciones estándar de cultivo (Fig. 4).

5

#### Usos del biogel

El biomaterial de la invención, ya sea en su forma combinada con células o sólo, puede aplicarse en su forma inyectable en enfermedades del sistema articular y en tratamientos estéticos. Las células que se pueden utilizar son, entre otras: células madre mesenquimáticas indiferenciadas o diferenciadas en otra estirpe celular, células madre hematopoyéticas indiferenciadas o 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 leucocitario, células corneales, células endoteliales o células epiteliales.

10

Dependiendo de la aplicación a la que vaya destinada 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 inyectable es de 10 a 15.000 cS (centistokes), preferentemente entre 10 y 2.000 cS. El hidrogel reticulado puede poseer una viscosidad superior a 15.000 cS. La viscosidad del hidrogel puede modificarse por reticulación según las necesidades, pudiendo obtener viscosidades superiores a 15.000 cS.

15

20

El biomaterial desarrollado en la presente invención puede aplicarse preferentemente de forma inyectable en las siguientes patologías: remodelado, relleno o reconstrucción de tejidos blandos, tratamiento de arrugas, pliegues y cicatrices, quemaduras, úlceras, aumento de tejidos blandos, lipoatrofia facial, patologías del disco intervertebral, reparación de cartílago, lesiones musculoesqueléticas, artrosis y periartritis; tratamiento de tumores, enfermedades vaginales, lesiones cerebrales, reparación medular, trastornos neurodegenerativos, enfermedades cardiovasculares y procesos de lubricación, como analgésico y antiinflamatorio.

25

El biomaterial de la invención en su forma sólida, posee una estructura sustancialmente porosa. En dicha estructura, el diámetro de poro es de 0,5 - 1.000  $\mu\text{m}$ , preferentemente de 0,5 - 500  $\mu\text{m}$ , pudiendo presentar una viscosidad superior a 15.000 cS. Dicho biomaterial en su forma sólida puede aplicarse preferentemente en las siguientes patologías:

30

tratamiento de quemaduras, úlceras y defectos dermoepidérmicos, tratamiento de enfermedades oftalmológicas, tales como lesiones en la córnea, en la retina o cataratas; reparación del cartílago, tratamiento del sistema osteoarticular, como en el caso de defectos osteocondrales, artrosis o defectos óseos, y como un adyuvante en la resolución de enfermedades vaginales, tratamiento de la gingivitis y la periodontitis; uso en el desarrollo de sistemas de cultivo celular.

35

Las enfermedades condrales constituyen un importante problema socioeconómico mundial. En este sentido, a pesar de la dificultad de registrar su incidencia, se estima que las lesiones articulares afectan a 500 millones de personas.

40

Las patologías condrales se producen como consecuencia de lesiones o enfermedades que, si no se tratan, pueden producir enfermedades degenerativas tales como la artrosis (A).

La A es uno de los tipos más comunes de artritis que afecta a 35-40 millones de personas en Estados Unidos y Europa. Es una enfermedad degenerativa que provoca la desintegración del cartílago, acompañada con una reacción en el hueso. Generalmente afecta a manos, rodillas, caderas, pies y cuello y, en los adultos, está considerada como una de las causas más comunes de inhabilitación física.

45

El cartílago articular es un tejido avascular muy especializado que protege al hueso de la articulación diartrodial de las fuerzas asociadas con el peso y con impactos que conducen a fricciones entre las superficies articulares. 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, en el interior de esta red, macroagregados de proteoglucanos que contienen GAG tales como condroitín sulfato, queratán sulfato, ácido hialurónico y agregán.

50

55

La especializada arquitectura del cartílago y su limitada capacidad de reparación hacen 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.

60

Durante los últimos años, se están utilizando biomateriales biodegradables para el tratamiento de lesiones condrales. En este sentido, los polímeros sintéticos macroscópicos (ácido láctico, ácido glicólico, caprolactona...) se han convertido en el grupo de biomateriales más importante y numeroso. Sin embargo, estos materiales

macroscópicos sólidos requieren el uso de procedimientos quirúrgicos agresivos, tales como la cirugía convencional. Con el objetivo de superar estas limitaciones, en la actualidad se están desarrollando nuevas biomatrices que pueden implantarse por técnicas mínimamente invasivas, tales como la inyección o la artroscopia.

5 Por lo tanto, en una aplicación, el biomaterial inyectable de la presente invención es para su uso en la regeneración del cartílago articular dañado por el proceso degenerativo de la artrosis. Dicho biomaterial se puede administrar fácilmente en la zona a regenerar mediante técnicas percutáneas, tales como artroscopia o mediante cualquier dispositivo de inyección. Además de su facilidad para la administración, el hidrogel inyectable posee la propiedad de formar un implante estable que se ajusta al tamaño y a la geometría del tejido deteriorado. Otra aplicación del biomaterial es el uso del biomaterial tridimensional para el tratamiento de heridas.

15 Las úlceras crónicas, diabéticas, de decúbito y venosas, constituyen 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 al 15 % de los pacientes ingresados en un hospital padece esta dolencia. La gran cantidad de pacientes que padece estas lesiones, produce importantes repercusiones socioeconómicas y sanitarias, constatándose, de este modo, un elevado coste de tratamiento, y alterando, de manera importante, la calidad de vida del paciente.

20 Las úlceras son traumatismos que tienen una gran repercusión sobre el organismo con una fisiopatología considerablemente compleja. En el lecho de una herida, se produce una compleja interacción sinérgica entre fibroblastos (células de la dermis), queratinocitos (células de la epidermis), proteínas de la matriz extracelular y derivadas del plasma, con el fin de que se produzcan las diferentes fases de cicatrización de la herida, hemostasia, inflamación, reparación y remodelación.

25 Sin embargo, la cronicidad y la recidiva son las incidencias más relevantes en la evolución clínica. A pesar de la gran variedad de tratamientos y apósitos disponibles en la actualidad, el porcentaje y la velocidad de cicatrización siguen siendo extremadamente bajos, precisando, por lo tanto, de tratamientos más eficaces que consigan una rápida cicatrización de la lesión. El progresivo conocimiento de la fisiopatología de las úlceras crónicas durante los últimos años ha originado el desarrollo de nuevos apósitos que pueden suponer un avance significativo en el tratamiento de esta enfermedad. Aunque hasta el momento, no existe un apósito ideal para el recubrimiento de la piel; dicho apósito debe cumplir con una serie de características básicas como son la rápida adhesión a la herida, proporcionar una barrera eficaz contra la pérdida de líquidos, resistir contra presiones mecánicas para proporcionar una estabilidad a largo plazo, ha de ser fácil de esterilizar, manipular y transportar y debe ser inocuo.

35 El biomaterial sólido de la invención posee 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* utilizando ratones.

## 40 Ejemplos

### Ejemplo 1. Obtención de la gelatina de Wharton

Para aislar los GAG de la GW del cordón umbilical, se procedió de la siguiente manera:

45 Inmediatamente después del parto, se recogieron 50 g de cordón umbilical en un frasco estéril en el que previamente se habían depositado 300 ml de PBS a una concentración 1X (para 1 litro de H<sub>2</sub>O: NaCl 8 g, KCl 0,2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g, pH=7,4 en 1 l de H<sub>2</sub>O) y 3 ml de una mezcla de antibióticos de penicilina (30.000 unidades), estreptomina (30.000 µg) y anfotericina-B (75 µg) (LONZA, Ref: 17-745 E) a una concentración 1X. El cordón umbilical se puede conservar a 4 °C, durante no más de 24 horas hasta su procesamiento, pero en este ejemplo se procesó inmediatamente tras su recepción.

50 Para su procesamiento, el cordón umbilical se mantuvo en condiciones estériles, en una campana de flujo laminar de nivel de bioseguridad II y se sometió a sucesivos lavados para eliminar totalmente los restos de sangre que contenía. Para ello, se dispuso en un recipiente y se añadieron 300 ml de PBS 1X (para 1 litro H<sub>2</sub>O: NaCl 8 g, KCl 0,2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g, pH=7,4 en 1 l de H<sub>2</sub>O) que contenían 3 ml de una mezcla de antibióticos de penicilina (30.000 unidades), estreptomina (30.000 µg) y anfotericina-B (75 µg) (LONZA, Ref: 17-745 E); se agitó manualmente inclinando la botella verticalmente 5 veces durante 10 seg y se desechó el líquido, repitiéndose esta operación un mínimo de 3 veces, hasta que se eliminó la mayor parte de la sangre. A continuación se procedió al lavado del cordón umbilical con 500 ml de una solución de lisis de eritrocitos a una concentración 1X (para 1 litro de H<sub>2</sub>O: NH<sub>4</sub>Cl 8,99 g, KHCO<sub>3</sub> 1 g, EDTA 37 mg, pH 7,3) hasta la eliminación total de restos de sangre.

Una vez limpia de sangre la superficie del cordón umbilical, se transfirió a una placa de Petri de 10 cm y se troceó con unas tijeras estériles en fragmentos de 1-2 cm. Como al cortar el cordón umbilical en fragmentos se liberó sangre retenida en el interior de los vasos sanguíneos, para limpiar a fondo dichos fragmentos, se añadieron 10 ml

de PBS 1X conteniendo 1 ml de una mezcla de antibióticos (10.000 unidades), estreptomina (10.000 µg) y anfotericina-B (25 µg), y se presionó la superficie del fragmento contra su superficie de apoyo, haciendo movimientos de desplazamiento horizontales a lo largo del fragmento con un escalpelo estéril. Este proceso se repitió hasta eliminar totalmente todos los restos de sangre de su interior. Los fragmentos del cordón umbilical, totalmente limpios, se transfirieron a un tubo estéril y se procesaron acto seguido, aunque en caso necesario se pueden crioconservar a -80 °C indefinidamente.

A continuación se procedió a eliminar mecánicamente la membrana que rodea al cordón umbilical y los vasos sanguíneos que se encuentran en su interior. Para ello, se abrieron longitudinalmente los trozos de cordón umbilical y con la ayuda de un escalpelo y unas pinzas se retiraron cuidadosamente tanto la membrana del cordón umbilical como los vasos sanguíneos. La sustancia gelatinosa que se obtuvo como consecuencia de ésta separación mecánica fue la GW. Se obtuvieron 40 g de GW.

#### Ejemplo 2. Extracción de los GAG de la Gelatina de Wharton

Para la obtención de los GAG a partir de la GW del cordón umbilical se utilizó, con algunas modificaciones, el protocolo descrito para obtener los GAG a partir de cartílago humano (Rogers et al., 2006).

La GW obtenida en el Ejemplo 1 se sumergió en 10 ml de la solución tampón de extracción (242 µl de L-cisteína 200 mM, 1,42 ml de tampón Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 704 mM, 100 µl de EDTA 0,5 M, papaína (SIGMA, Ref: P-4762) 10 mg (14 U/mg), pH 7,5) y se mantuvo durante 24 horas a 60 °C, para digerir completamente la GW y una vez digerida se centrifugó la muestra a 800 rpm durante 5 min para eliminar el residuo de la digestión. Se observó que el volumen de la digestión era de 30 ml, aproximadamente 20 ml más que los 10 ml de volumen de partida, debido a la disolución de los GAG presentes en la GW y por lo tanto a la liberación del agua que éstos acumulaban.

Una vez centrifugada la muestra, el sobrenadante se transfirió a otro tubo y se procedió a la precipitación de los GAG presentes en la muestra.

#### Ejemplo 3. Precipitación y aislamiento de los GAG de la GW del cordón umbilical.

Los GAG de la GW presentes en el sobrenadante se precipitaron con 5 volúmenes de etanol al 100 %. Mediante esta etapa se precipitaron los GAG de la muestra, así como las sales presentes en ésta. Esto se debe a que las moléculas de agua presentes en la muestra interactúan con las de etanol, de tal forma que las moléculas de agua no pueden interactuar con los GAG de la muestra. Los GAG se dejaron precipitando durante 12 horas a -20 °C. Una vez precipitados, se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min, eliminándose así todo el etanol al 100 %. El precipitado se lavó con 5 volúmenes de etanol al 75 % para eliminar las posibles sales residuales que hubieran precipitado en la muestra. A continuación, se centrifugó unos 5 min a 2500 rpm y se eliminó totalmente el sobrenadante.

Una vez precipitada la muestra, se dejó secando el residuo sólido durante unos 30 minutos a temperatura ambiente hasta que se hubo evaporado todo el etanol. La cantidad de GAG que precipita partiendo de una muestra de unos 40 g de GW, puede variar entre 50 y 300 mg, dependiendo del material de partida. En este caso concreto se obtuvieron 200 mg de precipitado de GAG, que se resuspendieron en 2 ml de H<sub>2</sub>O Mili-Q y así se mantuvieron conservados a 4 °C hasta producir el hidrogel.

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

El contenido acuoso del hidrogel puede llegar a ser desde un 10 % hasta 100 veces su propio peso, dependiendo de la viscosidad que se requiera para su aplicación.

El hidrogel obtenido tras la resuspensión de los GAG precipitados en 2 ml de H<sub>2</sub>O, se resuspendió en una solución de suero fisiológico inyectable para dar lugar a una viscosidad de 1000 cS. Posteriormente, este hidrogel se resuspendió en 8 ml de una solución de suero fisiológico inyectable para dar lugar a una viscosidad de 200 centistokes (Cs) y, para impedir la degradación de la estructura del gel, se dejó agitando de forma moderada en una agitadora vorticial (*vortex*) hasta su completa disolución y homogeneización.

Una vez disuelto el hidrogel, se conservó 4 °C, pudiendo guardarse indefinidamente.

#### Ejemplo 5. Producción de un hidrogel sólido de los GAG de la GW del cordón umbilical.

Para producir el hidrogel sólido, se procedió según lo descrito en la bibliografía (Cui et al., 2006). A partir del extracto de GAG obtenido de la GW según el Ejemplo 3, se preparó una solución acuosa. Concretamente, se preparó una solución al 1 % de GAG en H<sub>2</sub>O. Para ello, se añadieron 10 ml de H<sub>2</sub>O a los 200 mg de GAG obtenidos tras su precipitación y aislamiento (Ejemplo 3). A la solución se añadieron 1,2 g de ácido adípico dihidrazida (ADH) y el pH de la solución se ajustó a un valor de 3,5 con HCl 0,1N. Una vez ajustado este pH, a la solución se añadieron 0,6 g

de fijador, EDC (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil carbodiimida) (SIGMA, Ref: E6383). La mezcla se mantuvo entre 30 minutos y 1 hora con agitación constante a temperatura ambiente hasta obtener el hidrogel sólido.

Una vez formado el hidrogel sólido, este se lavó 3 veces con PBS 1X (para 1 litro H<sub>2</sub>O: NaCl 8 g, KCl 0,2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g, pH=7,4 en 1 l de H<sub>2</sub>O) 5 minutos cada vez, para eliminar el exceso de EDC. En cuanto a la forma física del hidrogel, éste tendrá la forma del molde en el que solidifique, de tal manera que se pueden emplear placas de cultivo estándar de 96, 48, 24, 12 y 6 pocillos, placas de Petri o cualquier otro recipiente con la forma deseada. Adicionalmente, el hidrogel se puede solidificar en un recipiente grande, tal como un vaso de precipitados, y una vez solidificado, se puede cortar con una forma y grosos característicos. Concretamente, en este ejemplo, el hidrogel se solidificó en pocillos de placas de 24 pocillos y, una vez solidificado, se lavó 3 veces durante 5 minutos con 500 µl de PBS 1X.

En este caso, el hidrogel sólido reticulado en placas de 24 pocillos, se sometió al proceso de liofilización que constaba de las siguientes etapas: el hidrogel se congeló a -80 °C. Las muestras de hidrogel congeladas se introdujeron en la cámara de vacío del liofilizador. Las muestras de hidrogel se sometieron al vacío al mismo tiempo que la temperatura se aumentó a -40 °C a una velocidad de 0,1 °C/min y la temperatura se mantuvo a -40 °C durante 20 min. Posteriormente la temperatura se aumentó a -20 °C a una velocidad de 0,1 °C/min y se mantuvo a -20 °C durante 15 min. Transcurrido este tiempo, la temperatura se aumentó a 0 °C a una velocidad de 0,1 °C/min y la temperatura se mantuvo a 0 °C durante 15 min. Posteriormente la temperatura se aumentó a 25 °C a una velocidad de 0,1 °C/min y se mantuvo a esta temperatura durante el tiempo necesario para igualar la presión exterior y la presión interior de la cámara de vacío.

En este ejemplo, para la caracterización tridimensional del hidrogel a través de microscopía electrónica de barrido (MEB), una vez liofilizado el hidrogel, se procedió de la siguiente manera: se cortó una sección del hidrogel liofilizado y, en un secador AUTOSAMDRI-814, se deshidrató con CO<sub>2</sub> hasta el punto crítico y se metalizó con oro en un SPUTTER. Las preparaciones se observaron en un microscopio electrónico de barrido JEUL (JSM35) a un voltaje 20 KV.

El análisis del hidrogel mediante MEB (Figura 3), indicó que éste posee una estructura porosa uniforme y que contiene una red interconectada de poros. La micrografía refleja la existencia de una estructura tridimensional muy porosa, con un diámetro de poro que varía entre 0,5 y 500 µm. Este intervalo de diámetro de poro implica la existencia de micro y macroporosidad. Los macroporos (300-500 µm) son necesarios para que se realice una colonización celular adecuada, tanto para que se concentre un número elevado de células como para que convivan diferentes tipos de células, favoreciendo la formación de tejidos estructurados, por ejemplo, para que se pueda formar una red vascular. Los poros intermedios permiten la integración celular. Los microporos (0,5-50 µm) son necesarios para la supervivencia celular, ya que son los responsables de que se lleve a cabo una correcta difusión de gases, nutrientes y la eliminación de los productos de desecho procedentes del metabolismo celular. El tamaño del poro se mide en función de la escala métrica obtenida a través del microscopio electrónico de barrido.

En este caso, a diferencia del ejemplo anterior del biomaterial inyectable, el hidrogel sólido proporciona una estructura tridimensional, que constituye una matriz para el crecimiento y la colonización celular en toda su estructura, tanto interna como externa. Este biomaterial muestra una mayor sensibilidad estructural, siendo indicado para aplicaciones en las que se busca no solamente un carácter bioactivo y de acción trófica, sino también una estructura que pueda albergar temporalmente células hasta que se lleve a cabo la reparación tisular, tal como el tratamiento de úlceras y de otras enfermedades dermoepidérmicas, la reparación de cartílago y tratamientos oftalmológicos, entre otros. Las células contenidas en el biomaterial pueden ser las de los tejidos adyacentes al lugar de implantación, que han conseguido colonizarlo, o también células dispuestas *ex vivo* en el biomaterial antes de su aplicación clínica, de tal manera que se potencia su acción regeneradora.

Este biomaterial tiene una distribución homogénea de poros cuyo tamaño se encuentra distribuido en un intervalo de 0,01 a 500 micrómetros, determinado mediante 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 la entrada de células en su interior.

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

Los distintos GAG presentes en el biomaterial de la invención se analizaron y cuantificaron mediante la técnica de espectrometría de masas (ESI/MS). Dado que mediante esta técnica solamente se pueden determinar moléculas con un peso molecular de entre 200 y 2000 Daltons y que las moléculas de GAG superan en gran medida este intervalo, se procedió en primer lugar a digerir enzimáticamente la muestra, para obtener de esta manera cadenas de GAG con un peso molecular entre 200 y 2000 Da.

Como patrón para la identificación y cuantificación de los GAG, se utilizaron compuestos comerciales patrón de cada uno de ellos con una concentración conocida. Concretamente, los patrones utilizados para llevar a cabo la

cuantificación de los GAG fueron los siguientes: para el ácido hialurónico: sal potásica de ácido hialurónico (SIGMA, Ref: 53750); para el condroitín sulfato: sal sódica de condroitín sulfato (SIGMA, Ref: C4384); para el dermatán sulfato: sal sódica de dermatán sulfato (SIGMA, Ref: C3788); para el queratán sulfato: queratán sulfato (CHEMOS, Ref: 7295); para la heparina: sal sódica de heparina (SIGMA, Ref: H8537) y para el heparán sulfato: sal sódica de heparán sulfato (SIGMA, Ref 51541).

Los valores de cuantificación de los GAG presentes en la muestra se obtuvieron basándose en los resultados obtenidos de cada patrón de GAG utilizado.

10 Para llevar a cabo la digestión enzimática de los GAG, se procedió según el procedimiento descrito en la bibliografía (Mahoney et al., 2001). Para ello se utilizaron las enzimas específicas para la digestión de cada GAG.

15 Para el ácido Hialurónico se utilizó hialuronidasa (SIGMA, Ref: H3506), para el condroitín sulfato se utilizó condroitinasa (SIGMA, Ref: C2780), para el dermatán sulfato se utilizó condroitinasa B (SIGMA, Ref: C8058), para la heparina se utilizó heparinasa I (SIGMA, Ref: H2519), para el heparán sulfato se utilizó heparinasa I (SIGMA, Ref: H2519), para el queratán sulfato se utilizó queratanasa (K2876).

20 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 H<sub>2</sub>O.

25 El tampón de digestión enzimática con una concentración de enzima de 160 U/ml se preparó de la siguiente manera: a 7,5 ml de tampón de digestión, se añadieron 4,5 ml de enzima (2000 U), 1,5 ml de NaCl 1M, 0,333 ml de acetato de sodio 3M pH = 5,2 y 5,67 ml de H<sub>2</sub>O. La preparación de las muestras y de los patrones para someterlos a la digestión enzimática fue la siguiente: se añadieron 500 µl de tampón de digestión (80 U de enzima) a 500 µl de patrón de cada GAG a una concentración de 2 mg/ml, de tal manera que la solución final del patrón estaba un concentración de 1 mg/ml. Con la muestra de GAG se procedió de la misma manera: a 500 µl de la muestra de los GAG, se añadieron 500 µl de tampón de digestión (80 U de enzima).

30 Las muestras se digirieron a 37 °C durante 1 h, tras lo cual la enzima se inactivó mediante desnaturalización térmica a 60 °C durante 5 min.

35 Una vez realizadas las digestiones, las muestras y los patrones se analizaron mediante espectrometría de masas. La espectrometría de masas es una metodología experimental utilizada para determinar la relación entre masa y carga de determinados iones presentes en la muestra a analizar. El espectrómetro de masas consiste en 3 componentes básicos: fuente de iones, analizador de masas y detector. La muestra a analizar se ioniza mediante la fuente de iones, se separa en el analizador de masas y se detectan para producir un espectro de masas, donde los valores de masa con respecto a carga se muestran en comparación con la abundancia relativa de una especie iónica en concreto.

40 Concretamente, en este ejemplo la inyección de muestras en el espectrómetro de masas se llevó a cabo de la siguiente manera: 20 µl de las muestras se inyectaron a un caudal de 0,2 ml/min directamente en el detector de masas/masas (modelo Thermo LCQ). Se utilizó el método de ionización por electropulverización negativa (IEP -) y el tiempo del cromatograma se estableció 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 se mantuvieron presentes tanto en la muestra de los GAG patrón como en la muestra a analizar, de tal manera que la presencia de cada GAG en la muestra se demostró de manera cualitativa. Para garantizar la reproducibilidad de los resultados, las muestras y los patrones se inyectaron por duplicado.

50 Para la cuantificación de los distintos GAG, se realizó una línea patrón del patrón de cada GAG a 1 mg/ml. La línea patrón realizada consistió en las siguientes concentraciones de cada uno de los GAG patrón (ácido hialurónico, condroitín sulfato, dermatán sulfato, heparina, heparán sulfato y queratán sulfato) utilizados para crear la línea patrón: 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 100 µg/ml, 0 µg/ml. Las diluciones de la línea patrón se llevaron a cabo con H<sub>2</sub>O y como blanco de la línea se utilizó una mezcla que contenía las mismas proporciones de tampón de digestión enzimática y de H<sub>2</sub>O.

55 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 conlleva la existencia de pequeñas variaciones en su composición (Fig. 1):

- 60 ácido hialurónico 70 %  
 queratán sulfato 10 %  
 condroitín-6-sulfato 7 %

heparán sulfato 5 %

condroitín-4-sulfato 4 %

5

dermatán sulfato 3 %

heparina 1 %

10 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 origen natural. Este origen natural potencia su efecto regenerador y su efecto sobre la actividad celular, puesto que las estructuras de los GAG y las interacciones entre los mismos son similares a como se encuentran en la matriz extracelular en condiciones fisiológicas.

15

El cordón umbilical es un tipo de tejido muy poco inmunogénico, de hecho, en numerosos trabajos, se plantea el uso heterólogo de las células madre incluidas en la GW en los tratamientos. Asimismo, existen trabajos en los que se desarrollan sistemas de arterias o venas a partir de la vasculatura del cordón umbilical también para un uso heterólogo.

20

Sin embargo, para garantizar que el biomaterial de la invención está desprovisto de células y de restos celulares, posibles causantes de reacciones inflamatorias o de rechazo de un implante, se han realizado tinciones histológicas con hematoxilina y eosina, azul alcíán y verde de metilo pironina (Fig. 2).

25

Hematoxilina y eosina: es la tinción histoquímica más utilizada a nivel histopatológico. Permite observar células y componentes celulares. La hematoxilina presenta afinidad por los componentes ácidos de la célula, en especial los 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 los GAG (Fig. 2 B) y como control positivo se utilizaron extensiones de células (Fig. 2 A).

30

El procedimiento que se llevó a cabo para realizar la tinción con hematoxilina y eosina fue el siguiente: con un hisopo estéril, se extendió una muestra de GAG en un portaobjetos y se dejó secar la extensión un mínimo de 24 horas. Una vez secos los portaobjetos, se fijaron las extensiones con metanol al 70 % durante 5 min. Transcurrido este tiempo, el fijador se eliminó lavando con H<sub>2</sub>O. Los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina durante 3 minutos (solución de hematoxilina de Harris DC, PANREAC). Transcurrido este tiempo, el exceso de colorante se eliminó lavando con H<sub>2</sub>O. Todos los portaobjetos se pasaron por H<sub>2</sub>O con HCl al 0,5 % para eliminar enlaces inespecíficos del colorante. Los portaobjetos se lavaron con H<sub>2</sub>O y se tiñeron con eosina (0,5 en H<sub>2</sub>O) durante 30 segundos. Los portaobjetos se lavaron con H<sub>2</sub>O para eliminar el exceso de eosina. A las preparaciones se añadieron varias gotas de medio de montaje Fluoromount-G (SOUTHERN BIOTECH, Ref: 0100-01), se cubrieron con un cubreobjetos y se observaron al microscopio.

40

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

45

Azul alcíán: El azul alcíán 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 de sulfato, fosfato o carbonato, que forman parte de los proteoglicanos. Estas uniones electroestáticas dependen del pH del medio; a un pH neutro, el colorante se une a proteoglicanos con radicales neutros; a un pH ácido se une a proteoglicanos sulfatados; y a un pH básico se une a proteoglicanos fosfatados. A pH=1, el azul alcíán se une a proteoglicanos débil y fuertemente sulfatados, que contienen condroitín sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato y queratán sulfato que forman parte de los GAG de la gelatina de Warthon. Se tiñeron preparaciones de la muestra de los GAG (Fig. 2 F) y como control se utilizaron extensiones de células (Fig. 2 E).

50

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

55

Con un hisopo estéril, se extendió una muestra de GAG en un portaobjetos y se dejó secar la extensión un mínimo de 24 horas. Una vez secos los portaobjetos, las extensiones se fijaron con metanol al 70 % durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, el fijador se eliminó lavando con PBS 1X. Los portaobjetos se sumergieron en HCl 0,1N pH=1 durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo, se tiñeron con azul alcíán al 1 % en HCl 0,1N, pH=1 durante 2h. Los portaobjetos se sumergieron en HCl 0,1 N durante 5 minutos y acto seguido se lavaron con H<sub>2</sub>O para eliminar el exceso de colorante. A las preparaciones se añadieron varias gotas de medio de montaje Fluoromount-G (SOUTHERN BIOTECH, Ref: 0100-01), se cubrieron con un cubreobjetos y se observaron al microscopio.

60

Los resultados de la tinción con azul alcian (Figura 2, imágenes E y F) indican la presencia de GAG en la muestra de biomaterial analizada.

Verde de metilo pironina: Esta tinción se utiliza para la investigación histológica del ácido nucleico contenido en los tejidos, así como para demostrar la presencia de células linfáticas y plasmáticas. También es útil en la identificación de células plasmáticas y ARN en secciones de tejidos y preparaciones citológicas. La pironina tiñe de rojo el citoplasma de las células plasmáticas y gran parte de los nucléolos. El verde de metilo tiñe el ADN de un color verde azulado (violáceo). Se tiñeron preparaciones de la muestra de los GAG (Fig. 2 D) y como control se utilizaron extensiones de células (Fig. 2 C).

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

Con un hisopo estéril, se extendió una muestra de cada GAG en un portaobjetos y se dejó secar la extensión un mínimo de 24 horas. Una vez secos los portaobjetos, las extensiones se fijaron con metanol al 70 % durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, el fijador se eliminó lavando con H<sub>2</sub>O. Los portaobjetos se sumergieron en HCl 0,1N pH=1 durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo, se tiñeron con verde de metilo pironina durante 5 min (verde de metilo al 0,012 % en H<sub>2</sub>O, pironina al 0,01 % en H<sub>2</sub>O, metanol al 0,75 %) y acto seguido se lavaron con H<sub>2</sub>O para eliminar el exceso de colorante. Sobre las preparaciones se añadieron unas gotas de medio de montaje Fluoromount-G (SOUTHERN BIOTECH, Ref: 0100-01), se cubrieron con un cubreobjetos y se observaron al 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 de GAG analizados.

Como se puede observar en las imágenes de la Figura 4, en el material de la invención, no se observan células ni restos de ácidos nucleicos. Sin embargo, mediante la tinción con azul alcian se puede observar la presencia de los GAG en el biomaterial desarrollado.

#### Ejemplo 8. Toxicidad de diversos tipos de células sobre el biomaterial de la invención.

El principal requisito para que un biomaterial pueda utilizarse para su implantación o como matriz en ingeniería tisular, es la ausencia total de citotoxicidad.

Para comprobar que el biomaterial de la invención no producía efectos tóxicos, la citotoxicidad se determinó mediante el método de MTT (Roche Diagnostics), validado por el Centro Europeo de validación de métodos alternativos (ECVAM, *European Centre for the Validation of Alternative Methods*), en las células dispuestas sobre el biomaterial de la invención. Los tipos de células utilizados están relacionados con las patologías a las que va dirigido el biomaterial, tales como, queratinocitos y fibroblastos de la piel, osteoblastos del hueso, condrocitos del cartílago y células madre mesenquimáticas derivadas de tejido adiposo, así como la línea celular que marca la ISO10993 para los ensayos de toxicidad L929.

El ensayo con 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 existentes en el cultivo.

En concreto, en este análisis mitocondrial, Kit I de Proliferación Celular (MTT) Cat. Nº 1 465 007 Roche, se determina la transformación llevada a cabo por las succinato deshidrogenasas mitocondriales celulares de la sal de tetrazolio (de color amarillo), a cristales de formazán insolubles (de color azul). Posteriormente, las células se permeabilizaron y los cristales formados se solubilizaron, dando lugar a una solución coloreada que puede cuantificarse midiendo su absorbancia en un lector de microplacas ELISA a una longitud de onda de 550 nm. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.

A continuación se indica el procedimiento que se siguió:

1. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos antiadherentes con 50 µl de biomaterial en cada pocillo, a una densidad de 2000-5000 células/pocillo, dependiendo del tipo de célula. Previamente se había determinado la concentración celular apropiada para cada tipo de célula. Los fibroblastos, osteoblastos, condrocitos y células madre mesenquimáticas derivadas de tejido adiposo, todos ellos procedentes de un cultivo primario de origen humano, se sembraron a una concentración de 4000 células por pocillo, la línea de fibroblastos de ratón L929 se sembró a una concentración de 200 células por pocillo y los queratinocitos obtenidos de piel humana en cultivo primario, se sembraron a una concentración de 5000 células por pocillo.
2. Antes de iniciar los ensayos de citotoxicidad, el cultivo se dejó estabilizar a 37 °C y con CO<sub>2</sub> al 5% durante 24

horas. En este ensayo se incluyeron controles positivos (células + medio + material conocido que induce citotoxicidad, en este caso se utilizó policloruro de polivinilo o PVC), control (células + medio de cultivo patrón), y células en contacto con el biomaterial de la invención.

3. Se dejaron incubando a 37 °C en la incubadora durante el periodo de tiempo indicado en el protocolo hasta la realización de las determinaciones, que en este caso fueron a las 24, 48 y 72 horas de contacto.

4. Finalizado el periodo de incubación, al cultivo se añadieron 10 µl de la solución de MTT (0,5 mg/ml) en cada pocillo, por cada 100 µl de medio, y se incubó durante 4 horas a 37 °C en la incubadora.

5. Finalizado el periodo de incubación, los cristales de formazán se pueden observar en el interior de las células. A cada cultivo o pocillo se añadieron 100 µl de la solución solubilizadora y se incubó durante toda la noche a 37 °C en la incubadora. De esta manera, las células se permeabilizan y los cristales se solubilizan con los 100 µl de la solución solubilizadora, como se ha indicado, dando lugar a una solución coloreada fácilmente cuantificable.

6. Una vez solubilizados los cristales, la placa de cultivo se lee directamente con un lector ELISA a 550 nm. Antes de la lectura es conveniente limpiar la superficie inferior de la placa con etanol.

Como se puede observar en la Figura 4, el biomaterial de la invención no produjo efectos tóxicos sobre ninguna de las líneas celulares analizadas, no existiendo diferencias significativas con respecto al control.

#### Ejemplo 9. Utilización del biomaterial de la invención en su forma inyectable para el tratamiento de la artrosis.

Para la evaluación *in vivo* del efecto terapéutico del biomaterial de la invención en la A, se utilizó el hidrogel obtenido en el Ejemplo 3 y se resuspendió en 8 ml de una solución de suero fisiológico inyectable para dar una viscosidad de 200 cS. Como modelo experimental se utilizaron conejos a los que se les había realizado una resección del ligamento cruzado anterior en una de sus rodillas. Esta resección del ligamento se llevó a cabo mediante una artrotomía lateral. Seguidamente, con el fin de desestabilizar la rodilla, se esperó un periodo de semanas a meses, tiempo en el cual se produjeron erosiones en el cartílago, similares a la artrosis. Por otro lado, como grupo control, se utilizaron animales sin artrotomía en la rodilla.

La superficie articular lesionada se preparó mediante lavado y desbridamiento por cirugía artroscópica y las lesiones se recubrieron con el biomaterial inyectable de la invención. Cuatro semanas después de depositarse el biomaterial, los animales se sacrificaron y se extirpó su cartílago. El cartílago obtenido se fijó en paraformaldehído al 4 % para su posterior procesamiento histológico. Para la obtención de cortes histológicos, la muestra se incluyó en parafina, para lo cual se mantuvo durante 5 minutos en alcoholes al 50, 70, 90 y 100 %. Posteriormente, las muestras se introdujeron en citrosol durante 5 minutos y se incluyeron en parafina hasta obtener un bloque sólido y con un micrótopo se obtuvieron cortes histológicos de 5 µm en los que se llevaron a cabo las tinciones histológicas y el inmunomarcaje.

En los cortes histológicos se analizaron diferentes marcadores de la matriz extracelular del cartílago mediante técnicas inmunohistoquímicas. Las moléculas específicas de la matriz extracelular del cartílago y los marcadores moleculares estudiados fueron colágeno de tipo II, queratán sulfato, condroitín-4-sulfato y condroitín-6-sulfato. El inmunomarcaje se realizó utilizando anticuerpos monoclonales. La técnica utilizada para el marcaje de la sección tisular fue inmunomarcaje directo, utilizando anticuerpos monoclonales marcados con un fluorocromo. La visualización del marcaje se efectuó utilizando microscopía confocal.

Los resultados obtenidos demostraron que el biomaterial indujo la regeneración del cartílago lesionado ya que:

- El biomaterial inyectable no produjo toxicidad una vez implantado, es decir, no se observaron fenómenos de inflamación a nivel macroscópico ni microscópico en los cortes histológicos.
- El biomaterial se ajustó a la geometría y tamaño de la lesión a reparar y se mantuvo en la zona de la implantación.
- No se observaron alteraciones en el fenotipo de las células del tejido sano cercano a la zona del implante.
- La presencia de moléculas de la matriz extracelular, específicas de 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.
- Se observó la presencia de condrocitos en la zona del implante, lo que indicó la estimulación de la migración, adhesión y proliferación celular.
- Estos hechos demuestran que el biomaterial de la invención promueve la regeneración del defecto condral, a diferencia de lo que ocurrió en los animales de control que no presentaron ningún signo de reparación del cartílago.

#### Ejemplo 10. Utilización del biomaterial tridimensional

El biomaterial sólido de la invención obtenido en el Ejemplo 5 posee 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* utilizando ratones albinos suizos a los que se les ha producido una abrasión térmica de unos 3 cm<sup>2</sup> en la zona dorsal. Como grupo control se utilizaron animales a los que se produjo el mismo tipo de lesión pero que se trataron con un gel de ácido hialurónico comercial.

Para la aplicación del biomaterial de la invención, la superficie de la herida inducida se preparó mediante lavado, desinfección y desbridamiento quirúrgico, y las lesiones se cubrieron y rellenaron tanto en profundidad como en superficie, con el biomaterial sólido moldeable de la invención. Quince días después de colocar el biomaterial, los animales se sacrificaron y la zona de la herida se extirpó y se fijó en paraformaldehído al 4 % para su posterior examen histológico. Para el procesado, la muestra se incluyó en parafina, para lo cual se mantuvo durante 5 minutos en alcoholes al 50, 70, 90 y 100%. Posteriormente las muestras se introdujeron en citrosol durante 5 minutos y se incluyeron en parafina hasta obtener un bloque sólido. Utilizando un microtomo se obtuvieron cortes histológicos de 5 µm en los que se llevaron a cabo las tinciones histológicas.

En los cortes histológicos y mediante técnicas inmunohistoquímicas, se analizaron diferentes marcadores fenotípicos epidérmicos, tales como queratina 5 y 10, marcadores de diferenciación, tales como involucrina y loricrina, el marcador dérmico vimentina y componentes de la matriz, tal como laminina. La técnica utilizada para el marcaje de la sección del tejido fue mediante inmunomarcaje directo, utilizando anticuerpos monoclonales marcados con un fluorocromo. La visualización del marcaje se realizó utilizando microscopía confocal.

Los resultados obtenidos demostraron que el biomaterial era efectivo en la regeneración de la úlcera ya que:

- El biomaterial aplicado en la herida era inmunológicamente inerte y no se presentaron signos de toxicidad.
- El biomaterial se ajustó a la geometría y al tamaño de la lesión a reparar, cubriendo completamente la zona afectada tanto a nivel superficial como en profundidad.
- El biomaterial promovió el fenómeno hemostático, lo que indica el inicio del proceso de cicatrización.
- Conforme avanza el proceso de cicatrización, se produce la degradación del biomaterial y su sustitución con componentes dermoepiteliales.
- Los cortes histológicos mostraron que el biomaterial indujo la migración y proliferación de fibroblastos y queratinocitos, los cuales permanecieron viables en el mismo.
- El biomaterial de la invención indujo la cicatrización de la herida con una efectividad dos veces mayor con respecto a los animales control y además la calidad del nuevo tejido cicatricial fue significativamente superior en comparación con los animales a los que no se aplicó el biomaterial de la invención.

#### BIBLIOGRAFÍA

- 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.

- 5 - 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.
- 10 - 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.
- 15 - 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.
- 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.
- 20 - Laurent T. C, Fraser J. R. E. 1992. "Hyaluronan". The FASEB Journal, 6: 2397-2404
- 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.
- 25 - 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.
- 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.
- 30 - 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", Biomaterials, 20: 847-858.
- 35 - Rabenstein D. L. 2002. "Heparin and heparin sulfate: structure and function". Natural products reports, 19: 312-331.
- 40 - 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.
- 45 - Sobolewski K, Małkowski A, Bańkowski E, Jaworski S. 2005. "Wharton's jelly as a reservoir of peptide growth factors." Placenta, 26, 747- 752.
- Toole B. P. 2004. "Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue". Nature Cancer Reviews, 4, 528-539.
- 50 - 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.
- Trowbridge J. M, Gallo R. 2002. "Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan". Glycobiology, 12: 117-125.
- 55 - 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.
- 60 - 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.

**REIVINDICACIONES**

1. Un biomaterial en forma de un hidrogel, que consiste en un extracto acuoso de gelatina de Wharton de cordón umbilical humano, **caracterizado porque**:
- 5 -dicho extracto consiste en una mezcla de glucosaminoglucanos (GAG), que consiste en ácido hialurónico, queratán sulfato, condroitín-6-sulfato, heparán sulfato, condroitín-4-sulfato, dermatán sulfato y heparina en una solución acuosa, y
- 10 - **porque** dicho extracto carece de membrana de cordón umbilical humano, de vasos sanguíneos y de células que originalmente están presentes en la gelatina de Wharton.
2. El biomaterial según la reivindicación 1, **caracterizado porque** comprende ácido hialurónico al 65-75 % de la mezcla total de glucosaminoglucanos (GAG).
- 15 3. El biomaterial según la reivindicación 1, **caracterizado porque** comprende queratán sulfato al 5-15 % de la mezcla total de glucosaminoglucanos (GAG).
4. El biomaterial según la reivindicación 1, **caracterizado porque** comprende condroitín-6-sulfato al 6-8 % de la mezcla total de glucosaminoglucanos (GAG).
- 20 5. El biomaterial según la reivindicación 1, **caracterizado porque** comprende heparán sulfato al 3-7 % de la mezcla total de glucosaminoglucanos (GAG).
6. El biomaterial según la reivindicación 1, **caracterizado porque** comprende condroitín-4-sulfato al 2-6 % de la mezcla total de glucosaminoglucanos (GAG).
- 25 7. El biomaterial según la reivindicación 1, **caracterizado porque** comprende dermatán sulfato al 1-5 % de la mezcla total de glucosaminoglucanos (GAG).
- 30 8. El biomaterial según la reivindicación 1, **caracterizado porque** comprende heparina al 0,1-2 % de la mezcla total de glucosaminoglucanos (GAG).
9. Un biomaterial según la reivindicación 1, **caracterizado porque** contiene: ácido hialurónico (70 %), queratán sulfato (10 %), condroitín-6-sulfato (7 %), heparán sulfato (5 %), condroitín-4-sulfato (4 %), dermatán sulfato (3 %) y heparina (1 %).
- 35 10. El biomaterial según las reivindicaciones 1-9, **caracterizado porque** el hidrogel tiene una viscosidad de 10 a 15.000 cS.
- 40 11. El biomaterial según la reivindicación 10, **caracterizado porque** tiene una viscosidad entre 10 y 2.000 cS.
12. Un biomaterial que consiste en el extracto acuoso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, resuspendido en un suero fisiológico inyectable.
- 45 13. Un biomaterial estructurado tridimensional que comprende un biomaterial de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 11, que está reticulado.
14. El biomaterial estructurado tridimensional según la reivindicación 13, **caracterizado porque** tiene una viscosidad superior a 15.000 cS.
- 50 15. El biomaterial estructurado tridimensional según la reivindicación 14, **caracterizado porque** tiene una estructura sustancialmente porosa con un diámetro de poro de 0,5-1.000 µm.
16. El biomaterial estructurado tridimensional según la reivindicación 15, **caracterizado porque** el diámetro del poro es 0,5-500 µm.
- 55 17. El biomaterial estructurado tridimensional según las reivindicaciones 13-16, **caracterizado porque** adicionalmente comprende células distintas a las originalmente presentes en la Gelatina de Wharton.
- 60 18. El biomaterial de acuerdo con reivindicación 17, **caracterizado porque** dichas células se seleccionan del grupo que consiste en células madre mesenquimales indiferenciadas o diferenciadas en otra estirpe celular y/o células madre hematopoyéticas indiferenciadas o diferenciadas en otra estirpe celular y/o condrocitos y/o condroblastos y/u osteoblastos y y/u 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 leucocitario y/o células corneales y/o células endoteliales y/o

células epiteliales.

19. Un procedimiento para la obtención del biomaterial de hidrogel según las reivindicaciones 1-11, **caracterizado porque** comprende las siguientes etapas:

- 5
- a) Obtención de un cordón umbilical humano;
  - b) Tratamiento del cordón umbilical con una solución salina y antibióticos;
  - c) Eliminación de toda la sangre de la superficie del cordón;
  - d) Fragmentación del cordón en secciones de 1-2 cm;
- 10
- e) Limpieza de toda la sangre retenida en el interior;
  - f) Eliminación de la membrana y de los vasos sanguíneos del cordón umbilical;
  - g) Separación de la sustancia gelatinosa que comprende la gelatina de Wharton;
  - h) Digestión enzimática de la sustancia gelatinosa obtenida; y
- 15
- i) Precipitación y aislamiento de los GAG; y resuspensión del precipitado sólido en agua purificada para obtener un extracto acuoso que consiste en una mezcla de glucosaminoglucanos (GAG) que consiste en ácido hialurónico, queratán sulfato, condroitín-6-sulfato, heparán sulfato, condroitín-4-sulfato, dermatán sulfato y heparina, en una solución acuosa exenta de membrana de cordón umbilical humano, de vasos sanguíneos y de células que originalmente están presentes en la Gelatina de Wharton.

20. El proceso de obtención del biomaterial estructurado tridimensional según las reivindicaciones 13 - 18, **caracterizado porque** dicho proceso comprende

- a) Obtención de un cordón umbilical humano;
  - b) Tratamiento del cordón umbilical con una solución salina y antibióticos;
- 25
- c) Eliminación de toda la sangre de la superficie del cordón;
  - d) Fragmentación del cordón en secciones de 1-2 cm;
  - e) Limpieza de toda la sangre retenida en el interior;
  - f) Eliminación de la membrana y de los vasos sanguíneos del cordón umbilical;
- 30
- g) Separación de la sustancia gelatinosa que comprende gelatina de Wharton;
  - h) Digestión enzimática de la sustancia gelatinosa obtenida; y
  - i) Precipitación y aislamiento de los glucosaminoglucanos (GAG) y resuspensión del precipitado sólido en agua purificada para obtener un extracto que consiste en una mezcla de glucosaminoglucanos (GAG) que consiste en ácido hialurónico, queratán sulfato, condroitín-6-sulfato, heparán sulfato, condroitín-4-sulfato, dermatán sulfato y heparina, en una solución acuosa, exenta de membrana de cordón umbilical humano, de vasos sanguíneos y de células que originalmente están presentes en la Gelatina de Wharton,
- 35
- j) Reticulación del extracto acuoso de la mezcla de glucosaminoglucanos (GAG) obtenida en la etapa i).

21. El proceso según la reivindicación 20, **caracterizado porque** la reticulación se lleva a cabo por cambios de temperatura, reacciones químicas o fotopolimerización.

40

22. Biomateriales según las reivindicaciones 1-18 para su uso en el remodelado, relleno o reconstrucción de tejidos blandos, el tratamiento de arrugas, pliegues y cicatrices, quemaduras, úlceras, aumento de tejidos blandos, lipoatrofia facial, discopatías intervertebrales, reparación de cartílago, lesiones musculoesqueléticas, artrosis y periartritis; tratamiento de tumores, enfermedades vaginales, lesiones cerebrales, reparación medular, trastornos neurodegenerativos, enfermedades cardiovasculares y procesos de lubricación, como analgésico y antiinflamatorio;

45

tratamiento de quemaduras, úlceras y defectos dermoepidérmicos, tratamiento de enfermedades oftalmológicas, tales como lesiones de la córnea, de la retina o cataratas; reparación del cartílago, tratamiento del sistema osteoarticular como en el caso de defectos osteocondrales, artrosis o defectos óseos y como adyuvante en la resolución de enfermedades vaginales, tratamiento de la gingivitis y la periodontitis; utilización en el desarrollo de

50

sistemas de cultivo celular.

FIGURA 1

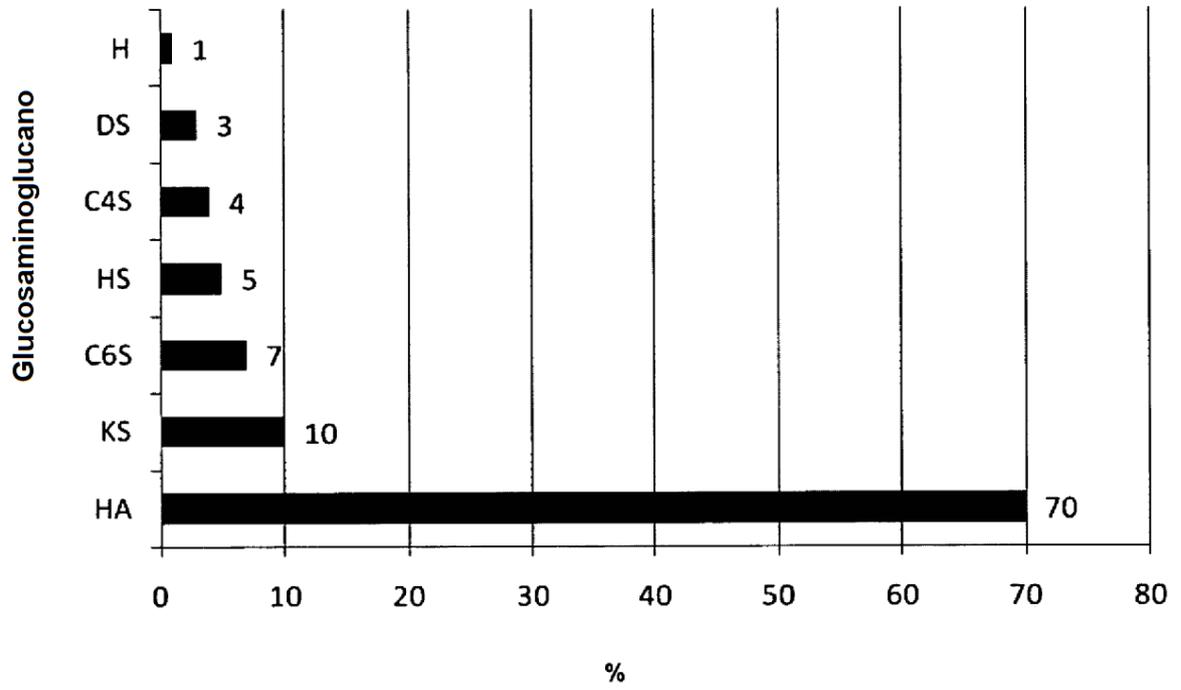


FIGURA 2

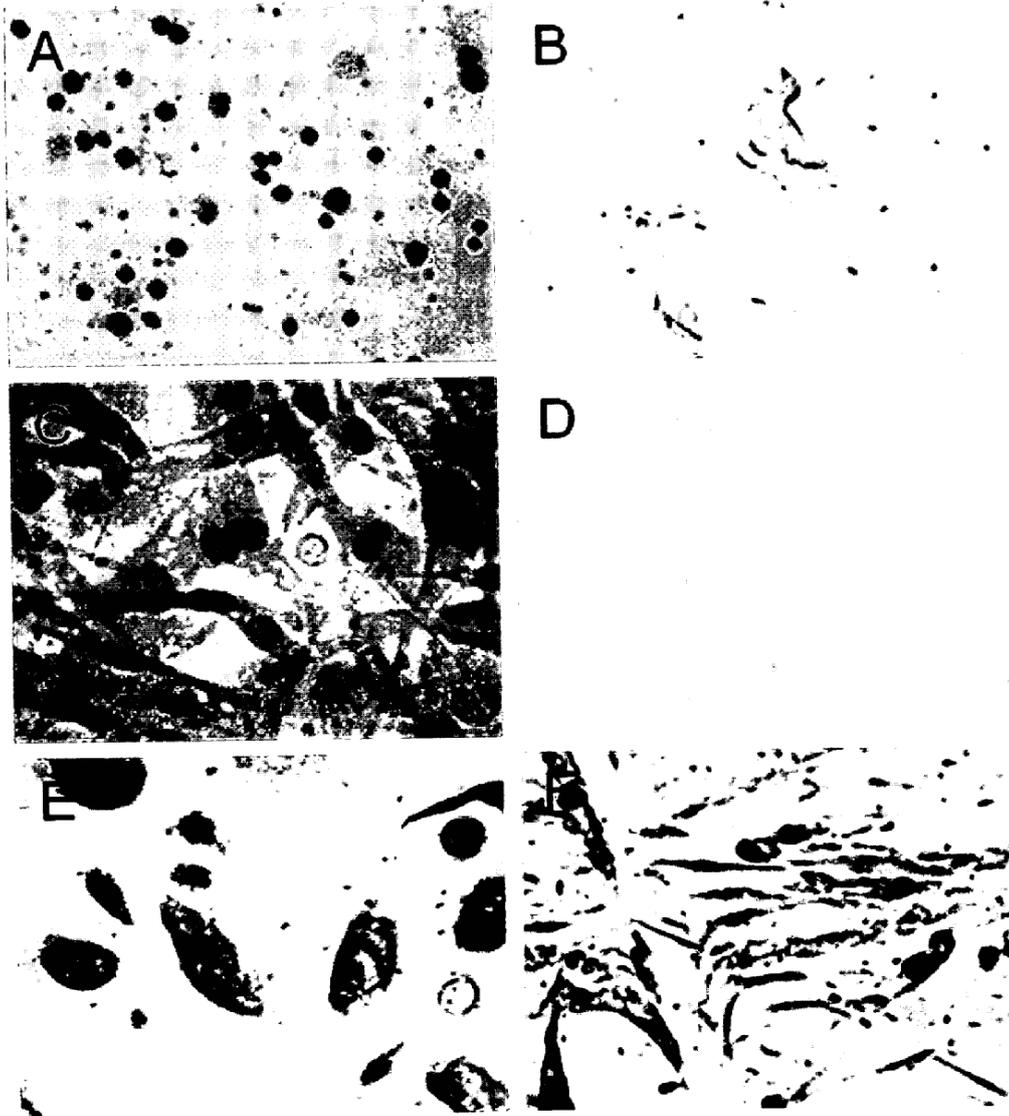


FIGURA 3

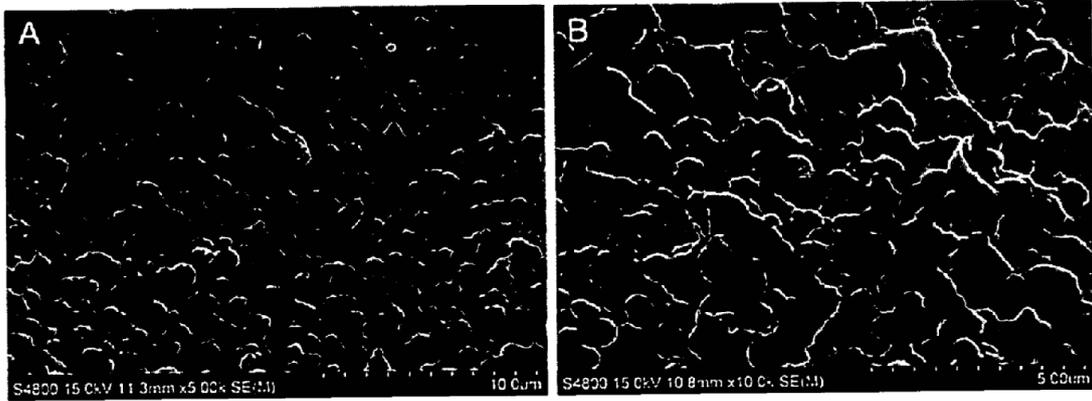
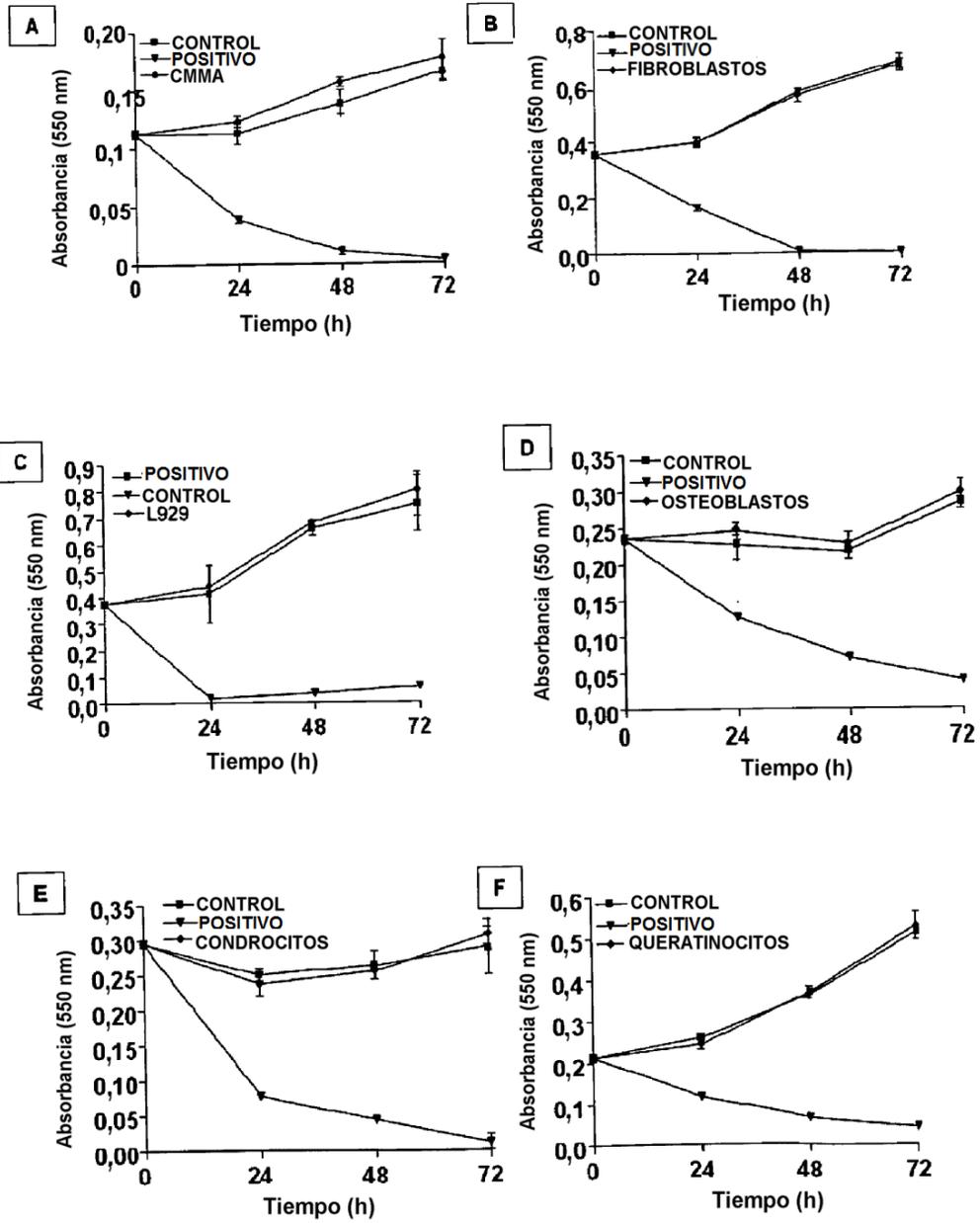


FIGURA 4



**Figura 5**

