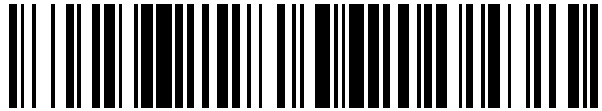


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 792**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/26** (2006.01)

**A61L 27/56** (2006.01)

**A61L 27/38** (2006.01)

**A61L 27/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2015 PCT/EP2015/074610**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2016 WO16062862**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2015 E 15784393 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3209341**

54 Título: **Estructura de biomaterial para regenerar la mucosa oral**

30 Prioridad:

**24.10.2014 EP 14382417**

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

**22.07.2020**

73 Titular/es:

**HISTOCELL, S.L. (100.0%)  
Parque Tecnológico, Edificio 801, 2º  
48160 Derio, Bizkaia**

72 Inventor/es:

**CASTRO FEO, BEGOÑA y  
BAIGET ORTS, AMPARO**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones:**

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

ES 2 774 792 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

Estructura de biomaterial para regenerar la mucosa oral

### Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de la ingeniería de tejidos, y más particularmente a biomateriales adecuados para regenerar, reparar y/o reemplazar tejidos blandos.

### Antecedentes

10 A lo largo de los últimos años se ha desarrollado un nuevo campo de conocimiento, altamente prometedor, conocido como "ingeniería de tejidos" en la investigación médica y dental. Los principales objetivos de este campo innovador se dirigen a la regeneración, reparación o reemplazo bioartificial de tejidos y órganos reales del cuerpo humano que estaban dañados por diversos factores, tales como lesiones, quemaduras, por enfermedades adquiridas tales como

15 En el caso de los biomateriales, se usan en la producción de sistemas biológicos y se aplican en diversas ramas de la medicina. Entre otras características, estos materiales son biocompatibles debido a su contacto permanente con tejidos vivos. Por tanto, es esencial prevenir que se produzcan reacciones no deseadas en la superficie de contacto del tejido-material y mantener las propiedades del biomaterial durante todo el periodo de tiempo en el que lleva a cabo su función. Los estudios actuales se centran en la comprensión de las interacciones específicas entre las propiedades fisicoquímicas del material, las propiedades mecánicas, y en la observación del comportamiento celular, tal como la adhesión, activación y liberación de factores de crecimiento y citocinas. En la actualidad, hay una gran

20 cantidad de biomateriales diferentes que pueden clasificarse en biomateriales poliméricos sintéticos o naturales, metálicos o cerámicos según su composición.

En la ingeniería de tejidos, los biomateriales deben favorecer la función biológica y mecánica de las células, puesto que actúan como una matriz extracelular artificial. Como resultado, los biomateriales pueden dotar a las células de un espacio tridimensional para formar nuevos tejidos con estructura y función adecuadas.

25 Entre las deficiencias de tejidos blandos, la reparación de la mucosa oral representa una misión desafiante y necesaria debido a la compleja estructura de este tejido. La pérdida de la mucosa oral como resultado de diversos procedimientos quirúrgicos, lesiones u otros estados clínicos es un problema real en vista de la necesidad de obtener una cobertura adecuada que repare de manera eficaz el defecto creado. Las soluciones actuales adoptadas con respecto a esta necesidad implican la aplicación de injertos de orígenes y sitios de donante diferentes. Sin embargo, estos injertos presentan complicaciones tales como rechazo (aloinjertos, xenoinjertos), morbilidad en el sitio del donante (autoinjertos), mantenimiento de las características tisulares originales, provisión de propiedades

30 estructurales suficientes para permitir el desarrollo de tejido nuevo mientras se previene el colapso mediante tejidos circundantes, funciones limitadas y son poco atractivos estéticamente. Estas implicaciones hacen necesario generar sustitutos biológicos funcionales que sean anatómica y estéticamente similares al sitio del receptor. En la actualidad, muchos grupos de investigación centran su investigación en el desarrollo de biomateriales nuevos que proporcionen una organización histológica similar a la del tejido nativo que, al trasplantarse, se integren eficazmente en dicho tejido nativo, reemplazando el tejido dañado del sitio afectado con el tejido funcional. La creación de tales biomateriales se considera actualmente la mejor alternativa para resolver estos problemas que implican rechazo y la cantidad limitada de tejido.

40 Los biomateriales para la regeneración de la mucosa oral deben tener propiedades mecánicas y estructurales tales como permeabilidad, estabilidad, elasticidad, flexibilidad y plasticidad y deben adaptarse a las diferentes formas deseadas, es decir, en láminas, como geles o estructuras sólidas tridimensionales. De manera ideal, también deben inducir la formación de tejido nuevo promoviendo que los factores de crecimiento y las células circundantes se alojen en el sitio lesionado mientras se degrada el material a medida que progresa la remodelación tisular.

45 El documento WO 03/007873 da a conocer una matriz porosa biocompatible liofilizada que comprende fibrina que está reticulada a partir de fibrinógeno en presencia de trombina, factor XIII y cloruro de calcio. La matriz puede incluir adicionalmente un componente auxiliar, tal como un polisacárido, y puede usarse como implante.

### Breve descripción de la invención

50 El alcance de esta invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

55 Los autores de la presente invención han desarrollado un nuevo biomaterial caracterizado por tener una estructura macroporosa que dota a dicho material de una alta resistencia, pudiéndose manejar fácilmente en su estado hinchado y teniendo estabilidad, elasticidad, flexibilidad y plasticidad, ya que puede recuperar su forma tras aplicar

una fuerza de deformación. Además, el biomaterial de la invención ha demostrado resistir un procedimiento de sutura en su estado hinchado sin romperse ni destruirse, lo que garantiza la correcta fijación al tejido dañado.

5 Las pruebas biológicas también han señalado la correcta interacción del biomaterial con las células, en particular con fibroblastos, queratinocitos, células madre humanas y otros tipos celulares relacionados con la reparación de tejidos blandos y mucosa, así como una falta de citotoxicidad para dichas células.

10 Adicionalmente, el biomaterial de la invención se ha sometido a prueba en un modelo *in vivo*. Los resultados confirman la ausencia de acontecimientos tóxicos y una tasa de capacidad de degradación favorable a lo largo del tiempo. Además, el biomaterial proporciona signos evidentes de neovascularización en los estadios tempranos tras la implantación, y muestra una interacción adecuada con el tejido circundante, que puede colonizar el biomaterial de la presente invención.

Este biomaterial se sintetiza mediante la liofilización de un hidrogel que comprende una red de fibrina y una red de polisacárido.

Por tanto, el primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento (de ahora en adelante procedimiento 1) para producir una estructura de biomaterial, comprendiendo dicho método:

- 15
- a) proporcionar un hidrogel que comprende una red de fibrina y una red de polisacárido;
  - b) someter el hidrogel de la etapa a) a un procedimiento de congelación-descongelación para reticular físicamente el hidrogel; y
  - c) someter el hidrogel reticulado físicamente obtenido tras realizar la etapa b), a una liofilización.

20 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una estructura de biomaterial que puede obtenerse mediante el procedimiento 1 tal como se definió anteriormente.

El hidrogel que resulta de la etapa b) del procedimiento de la invención confiere al biomaterial de la invención propiedades mecánicas mejoradas como resultado de la reticulación física que se deriva de la aplicación de un procedimiento de congelación-descongelación. Esta etapa de congelación-descongelación proporciona un hidrogel que tiene una red interpenetrada.

25 Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento (de ahora en adelante procedimiento 2) para preparar un hidrogel reticulado físicamente que tiene una red de interpenetración, comprendiendo dicho procedimiento:

- a) proporcionar un hidrogel que comprende una red de fibrina y una red de polisacárido; y
- b) someter el hidrogel de la etapa a) a un procedimiento de congelación-descongelación.

30 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un hidrogel reticulado físicamente que tiene una red de interpenetración que puede obtenerse mediante el procedimiento 2 tal como se definió anteriormente.

Otro aspecto de la invención se refiere a una estructura de biomaterial tal como se definió anteriormente para su uso en medicina.

35 Un cuarto aspecto de la invención se refiere a una estructura de biomaterial tal como se definió anteriormente para su uso para aumentar, restablecer o reemplazar parcial o completamente la actividad funcional de un tejido blando enfermo o dañado.

En una realización particular, el tejido blando es la mucosa oral.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la estructura de biomaterial tal como se definió anteriormente.

40 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición cosmética que comprende la estructura de biomaterial tal como se definió anteriormente.

45 La invención también se refiere a un método para aumentar, restablecer o reemplazar parcial o completamente la actividad funcional de un tejido blando enfermo o dañado, comprendiendo dicho método la administración a un ser humano o animal de una cantidad terapéuticamente eficaz de una estructura de biomaterial tal como se definió anteriormente.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una estructura de biomaterial tal como se definió anteriormente en medicina.

La invención también se refiere al uso de una estructura de biomaterial tal como se definió anteriormente para aumentar, restablecer o reemplazar parcial o completamente la actividad funcional de un tejido blando enfermo o

dañado.

### Breve descripción de las figuras

5 Figura 1. Micrografías de microscopía electrónica de barrido de geles de fibrina y agarosa con diferente concentración de agarosa: a) 0,2%; b) 0,4%; c) 0,6%. Los subíndices 1, 2 y 3 corresponden a escalas diferentes 50X, 150x y 1500X, respectivamente.

Figura 2. Micrografías de microscopía electrónica de barrido que muestran en más detalle la estructura del material con diferentes composiciones de agarosa. Fila superior: 1.500X. Fila inferior: 20.000X. a) agarosa al 0,2%; b) agarosa al 0,4%; c) agarosa al 0,6%.

10 Figura 3. Detalle del hidrogel de la invención obtenido: (a) según la etapa a) del procedimiento 1 de la invención; (b) según las etapas a) y b) del procedimiento 1 ó 2 de la invención.

Figura 4. Detalle del biomaterial hinchado y su manejo.

Figura 5. Detalle del biomaterial tras suturar sus extremos.

15 Figura 6. Microfotografías de fluorescencia verde/roja de fibroblastos humanos cultivados en el biomaterial de la invención (agarosa al 0,2%). A, B y C: tras cultivar durante 24, 48 y 72 horas, respectivamente. A, B y C corresponden a una ampliación superior de las micrografías que a, b y c. La barra de escala corresponde a 200 micrómetros.

20 Figura 7. Microfotografías de fluorescencia verde/roja de fibroblastos humanos cultivados en el biomaterial de la invención (agarosa al 0,4%). A, B y C: tras cultivar durante 24, 48 y 72 horas, respectivamente. A, B y C corresponden a una ampliación superior de las micrografías que a, b y c. La barra de escala corresponde a 200 micrómetros.

Figura 8. Viabilidad celular de los fibroblastos humanos cultivados en el biomaterial de la invención (agarosa al 0,2% y al 0,4%). Los valores representan el porcentaje de viabilidad celular en relación con el control (100%). La línea discontinua marca el límite de citotoxicidad según la norma ISO 10993:5.

25 Figura 9. Porcentajes de viabilidad en control positivo (irritante), control negativo (viabilidad de referencia) y muestras (Biom 1 y Biom 2) según la invención. La línea discontinua representa el límite usado en este modelo de irritación. Los valores por encima de la línea se consideran NO IRRITANTES mientras que los valores por debajo de esta línea se consideran IRRITANTES.

Figura 10. Diagrama del sitio de implantación de los materiales en ratas e imágenes de explantes de biomaterial a diferentes tiempos: a) 7 días; b) 14 días; c) 30 días y d) 60 días.

30 Figura 11. Imagen macroscópica de explantes de biomaterial durante todo el tiempo de pruebas: a) 7 días; b) 14 días; c) 30 días y d) 60 días.

Figura 12. Imágenes histológicas de los explantes durante todo el tiempo de pruebas (7, 14, 30 y 60 días).

35 Figura 13. Prueba de concepto *in vivo* en un defecto en la mucosa oral en un modelo de cerdo enano: a) Defecto en la mucosa oral tras la extracción de un diente. b) Implantación del biomaterial de la invención dentro del defecto de la mucosa. c) Cierre del defecto tras la implantación del biomaterial con sutura absorbible. d) Ejemplo de exploración de modelos moldeados de alginato de mandíbula animal y análisis de imagen a través del programa informático de análisis de imagen *OrthoViewer*.

### Descripción detallada de la invención

40 El término "biomaterial" tal como se usa en el presente documento se refiere a un material biocompatible natural o sintético que es adecuado para implantarse en tejidos vivos y que realiza, aumenta o reemplaza una función natural en un paciente o sujeto. El biomaterial según la presente invención es particularmente adecuado para regenerar, reemplazar y/o reparar defectos o lesiones de tejido blando regenerando el tejido una vez que se ha implantado en el sitio de la lesión.

45 Mediante el término "estructura" se entiende una estructura tridimensional altamente porosa constituida por una red formada por asociación de macromoléculas. Esta asociación entre las macromoléculas se proporciona químicamente mediante interacciones fuertes o débiles (tales como enlaces covalentes). Esta asociación da como resultado una red de reticulación química. Como resultado de la realización de la etapa b) del procedimiento 1, la asociación entre las macromoléculas también se proporciona físicamente, dando como resultado una red de reticulación física y química.

50 Por tanto, en la presente invención la estructura de biomaterial se refiere a un biomaterial tal como se definió anteriormente con una estructura tridimensional.

Tal como se mencionó anteriormente, el procedimiento 1 de la invención para la producción de una estructura de biomaterial comprende:

- a) proporcionar un hidrogel que comprende una red de fibrina y una red de polisacárido;
- 5 b) someter el hidrogel de la etapa a) a un procedimiento de congelación-descongelación para reticular físicamente el hidrogel; y
- c) someter el hidrogel reticulado físicamente obtenido tras realizar la etapa b), a una liofilización.

La primera etapa del procedimiento 1 de la presente invención implica proporcionar un hidrogel que comprende una red de fibrina y una red de polisacárido.

10 El término "hidrogel" se conoce bien en la técnica, y se entiende como un gel que tiene agua como la fase líquida atrapada en lo que se conoce comúnmente como la fase sólida. La fase sólida constituye una red que atrapa la fase líquida y evita que fluya.

15 El hidrogel proporcionado en la primera etapa del procedimiento de la invención comprende una red de fibrina. Los términos "red de fibrina", "matriz de fibrina", "biomatriz de fibrina", "estructura basado en fibrina", "estructura de fibrina", "gel de fibrina", "adhesivo de fibrina" y "sellante de fibrina" se usan a menudo de manera intercambiable en la técnica para referirse a una red tridimensional que resulta del producto de polimerización de fibrinógeno en presencia de un factor de coagulación y una fuente de  $Ca^{++}$ . Una matriz de fibrina de este tipo se proporciona de manera natural por el organismo tras una lesión, pero también puede obtenerse mediante ingeniería como sustituto tisular.

20 Por tanto, en una realización particular, la red de fibrina se obtiene mediante la polimerización de un material que contiene fibrinógeno en presencia de al menos un factor de coagulación y una fuente de calcio.

En una realización preferida, el material que contiene fibrinógeno es de origen alogénico o xenogénico. No obstante, también puede ser de origen autólogo.

25 El fibrinógeno es una proteína de alto peso molecular presente en el plasma sanguíneo. Por tanto, el material que contiene fibrinógeno usado como material de partida para la generación de la red de fibrina puede ser el plasma sanguíneo o un derivado de plasma, tal como, por ejemplo, pero sin limitarse a un crioprecipitado o un concentrado de fibrinógeno. En este caso, el factor de coagulación también está presente en el plasma, en particular, el factor de coagulación es trombina.

30 La trombina es una enzima proteolítica que produce la ruptura de la molécula de fibrinógeno en polipéptidos de bajo peso molecular y monómeros de fibrina. Dichos monómeros polimerizan dando lugar a dímeros y posteriormente se unen entre sí por medio de enlaces covalentes a través de la acción del factor XIII, activado previamente por la trombina, y en presencia de iones calcio.

La concentración de fibrinógeno usada para preparar la red de fibrina puede variar e incluye concentraciones que oscilan entre 1 mg/ml y hasta aproximadamente 200 mg/ml (concentración final en el hidrogel). En una realización preferida, el fibrinógeno se añade a concentraciones de aproximadamente 1 a 5 mg/ml.

35 Además, el fibrinógeno puede combinarse con cualquier concentración apropiada del factor de coagulación. Preferiblemente, el factor de coagulación es trombina.

La trombina se añade en diversas concentraciones que oscilan entre aproximadamente 0,1 UI/ml y aproximadamente 300 UI/ml.

40 Preferiblemente, la razón de trombina con respecto a fibrinógeno oscila entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 100, más preferiblemente entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 10, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1.

En una realización particular, el hidrogel comprende fibrinógeno a una concentración final de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 100 mg/ml y trombina a una concentración final de desde aproximadamente 0,5 UI/ml y aproximadamente 250 UI/ml.

45 En una realización particular, la polimerización del material que contiene fibrinógeno también se lleva a cabo en presencia de otros factores de coagulación.

50 El término "factor de coagulación" se refiere a un componente, habitualmente una proteína presente en el plasma sanguíneo e implicada en la reacción en cadena que permite la coagulación. Los factores de coagulación adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, factor III (factor tisular o tromboplastina); factor IV; factor V (proacelerina o factor lábil); factor VI, factor VII (factor estable o proconvertina); factor VIII: (factor antihemofílico A o factor de von Willebrand); factor IX (factor antihemofílico B o factor de Christmas), factor X (factor de Stuart-Prower), factor XI (antecedente de tromboplastina plasmática): factor XII (factor de Hageman), factor XIII

(factor estabilizador de fibrina), factor de von Willebrand, cininógeno de alto peso molecular (HMWK o factor de Fitzgerald) y similares.

5 Por tanto, en el caso de usar plasma sanguíneo o un derivado de plasma como material que contiene fibrinógeno, todas las moléculas necesarias para la polimerización de fibrinógeno están contenidas en el mismo y la red de fibrina puede formarse a partir del plasma mediante la adición de una fuente de calcio.

10 En una realización preferida, la fuente de calcio es una sal de calcio, tal como, sin limitación, cloruro de calcio, gluconato de calcio o una combinación de los mismos. La concentración de sal de calcio debe ser suficiente para inducir la polimerización de fibrinógeno. En una realización más preferida, la sal de calcio es cloruro de calcio. En una realización más preferida, la concentración de cloruro de calcio es de entre 0,1 y 3 g/l. Sin embargo, también pueden usarse concentraciones inferiores o superiores. En una realización particular, el material que contiene fibrinógeno se diluye en primer lugar en agua o en una solución salina, tal como PBS.

15 El polímero de fibrina puede degradarse a través de un procedimiento denominado fibrinólisis. Durante la fibrinólisis, el plasminógeno se convierte en la enzima activa plasmina mediante el activador de plasminógeno tisular (tPA). La plasmina se une a la superficie de fibrina a través de sus sitios de unión dando como resultado la degradación de la fibrina. Para evitar la fibrinólisis del hidrogel, la polimerización del fibrinógeno puede llevarse a cabo en presencia de un agente antifibrinolítico tal como, sin limitación, ácido épsilon-aminocaproico, ácido tranexámico o aprotinina. En una realización preferida, el agente antifibrinolítico es ácido tranexámico.

20 El ácido tranexámico es un derivado sintético del aminoácido lisina con alta afinidad por los sitios de unión a lisina en el plasminógeno, pudiendo bloquear estos sitios y evitando la unión del activador de plasminógeno a la superficie de la fibrina, ejerciendo un efecto antifibrinolítico. El ácido tranexámico es ventajoso con respecto a otros agentes antifibrinolíticos de origen animal porque no transmite enfermedades. En una realización preferida, la concentración de ácido tranexámico en el hidrogel es de entre 0,5 y 2 g/l, preferiblemente de 1 a 2 g/l. Sin embargo, también podrían usarse concentraciones inferiores o superiores.

25 Las redes de fibrina son muy versátiles, por lo que se han usado para el desarrollo de diferentes tejidos artificiales. Sin embargo, el uso clínico de éstos se ha limitado debido principalmente al hecho de baja consistencia, su difícil manejo y su gran fragilidad. Por este motivo, el hidrogel proporcionado en la etapa (a) del procedimiento de la invención comprende además una red de polisacárido. En general, el polisacárido se usa para proporcionar resistencia y consistencia del tejido y debe ser soluble en él.

30 El término "red de polisacárido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una red tridimensional que resulta de la gelificación física de un polisacárido. Las redes de polisacárido habitualmente forman geles físicos, es decir geles que no se estabilizan mediante enlaces químicos entre los componentes sino más bien mediante enlaces de baja energía (enlaces de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, enlaces polares, enlaces iónicos, etc.).

35 El polisacárido puede ser cualquier polisacárido que pueda formar un gel, preferiblemente mediante un cambio de temperatura, y puede seleccionarse del grupo que consiste en agarosa, agar, celulosa, dextrano, almidón, quitosano, konjac, curdlano, carragenano, pectina, goma gellan y alginato. Tal como entenderá el experto, un polisacárido gelificado de este tipo comprende ventajosamente un polisacárido, pero la presente invención también abarca una mezcla de dos o más polisacáridos. En una realización ventajosa del presente método, el polisacárido es agarosa.

40 Los expertos en la técnica apreciarán que las condiciones adecuadas para la gelificación del polisacárido y la formación de la red de polisacárido dependerán de su naturaleza. Por tanto, en el caso preferido del uso de agarosa como polisacárido, es suficiente reducir la temperatura por debajo de la temperatura de gelificación de la concentración de agarosa. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente esta temperatura a partir de tablas que correlacionan la temperatura de gelificación de la concentración de agarosa en la muestra (por ejemplo, la tabla disponible en [http://www.lonzabio.com/uploads/tx\\_mwaxmarketingmaterial/Lonza\\_BenchGuides\\_SourceBook\\_Appendix\\_B\\_-\\_Agarose\\_Physical\\_Chemistry.pdf](http://www.lonzabio.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_BenchGuides_SourceBook_Appendix_B_-_Agarose_Physical_Chemistry.pdf)

45 En otras realizaciones, la invención contempla el uso de agarosas modificadas incluyendo, sin limitación, metilagarosa, hidroxietilagarosa, hidroxipropilagarosa, alilagarosa, acetilagarosa y similares.

50 En una realización preferida, la agarosa es una agarosa de bajo punto de fusión. La agarosa de bajo punto de fusión está disponible comercialmente tal como agarosa Ultra Pure® (Invitrogen), agarosa NuSieve® GTG® (Lopza), agarosa LM y agarosa y LM Sieve (Pronadisa), agarosa SERVA Premium (Serva) y similares. En el caso de que la red de polisacárido esté formada por agarosa, la formación de la red de polisacárido se lleva a cabo a una temperatura de la mezcla de hasta 10-37°C, preferiblemente 15-25°C, lo más preferiblemente 20-25°C.

55 En una realización preferida, la red de polisacárido está formada por agarosa. En otra realización preferida, la concentración de agarosa en el hidrogel es aproximadamente del 0,05 al 1% y, preferiblemente, desde el 0,2 hasta el 0,6%.

- El hidrogel proporcionado en la etapa (a) del procedimiento de la invención se obtiene por tanto realizando una reacción de reticulación de fibrinógeno dando lugar a fibrina e induciendo la gelificación del polisacárido. El experto entenderá que ambas reacciones pueden llevarse a cabo simultáneamente o en cualquier orden, es decir puede llevarse a cabo en primer lugar la polimerización del fibrinógeno dando lugar a fibrina e ir seguida por la gelificación del polisacárido o puede llevarse a cabo primero la gelificación del polisacárido e ir seguida por la polimerización del fibrinógeno dando lugar a la red de fibrina.
- En una realización particular, se forma en primer lugar la red de fibrina colocando un material que contiene fibrinógeno en condiciones adecuadas para la formación de una red de fibrina y luego se forma la matriz de polisacárido poniendo en contacto la primera red con una disolución que contiene el polisacárido y colocando la mezcla en condiciones adecuadas para la formación de la red de polisacárido. En el caso particular de que la red de polisacárido esté formada por agarosa, la formación de la red de agarosa puede lograrse colocando la mezcla a una temperatura por debajo del punto de fusión de la agarosa. El experto puede determinar tal temperatura sin experimentación adicional consultando el perfil de fusión del tipo de agarosa particular que está usándose.
- Sin embargo, en una realización preferida, el hidrogel que comprende la red de fibrina y la red de polisacárido se forma mezclando primero un material que contiene fibrinógeno, un factor de coagulación, una solución salina tamponada, preferiblemente PBS, y, opcionalmente un agente antifibrinolítico. A esta mezcla, se le añaden simultáneamente el polisacárido y la fuente de calcio, de modo que la red de fibrina y la red de polisacárido se forman simultáneamente sometiendo la mezcla resultante a condiciones adecuadas para la gelificación del polisacárido, por ejemplo a una temperatura por debajo del punto de fusión del polisacárido.
- En una realización más preferida, el material que contiene fibrinógeno es plasma sanguíneo, el factor de coagulación es trombina que está incluida en plasma sanguíneo, el polisacárido es agarosa y la fuente de calcio es cloruro de calcio.
- La segunda etapa (etapa b) del procedimiento 1 de la invención comprende someter el hidrogel de la etapa a) a un procedimiento de congelación-descongelación.
- Este procedimiento de congelación-descongelación induce la reticulación física del hidrogel, y como consecuencia de esto, el hidrogel mejora sus propiedades mecánicas, en particular, dota al hidrogel de una resistencia superior, pudiéndose también manejar fácilmente.
- La técnica de congelación-descongelación incluye al menos un ciclo de congelación y descongelación del hidrogel, pero preferiblemente la reticulación física del hidrogel se logra usando una serie de ciclos de congelación-descongelación.
- Como resultado de la congelación, el almacenamiento opcional en estado congelado y la posterior descongelación del hidrogel, se forma un criogel. Este criogel se caracteriza por tener una estructura macroporosa. Durante la congelación, se forma la cristalización de la masa principal del disolvente (agua). Tras la descongelación, se forman criogeles o crioestructuras. La alineación forzada de las cadenas poliméricas a medida que aumenta la concentración de polímero mediante la conversión de agua en hielo puede proporcionar un mecanismo para la formación de asociaciones una al lado de otra, que luego permanecen intactas en la descongelación, como las zonas de unión del gel.
- La estructura tridimensional del gel reticulado físicamente se estabiliza principalmente mediante múltiples enlaces de hidrógeno entre cadenas en las zonas de unión de la red polimérica.
- Variando el régimen del tratamiento criogénico, tal como la temperatura y la duración de la congelación, la tasa de descongelación, el número de ciclos de refrigeración, es posible regular y modular las propiedades del gel final y sus macroestructuras y microestructuras. Particularmente, la estabilidad y las propiedades mecánicas del criogel aumentan con el aumento del tiempo de congelación y los ciclos de congelación-descongelación.
- En una realización particular, el hidrogel obtenido en la etapa a) del procedimiento de la invención se somete a una etapa de congelación congelándolo a una temperatura comprendida entre  $-30^{\circ}\text{C}$  y  $-15^{\circ}\text{C}$ , más preferiblemente a aproximadamente  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante al menos 6 horas, más preferiblemente durante al menos 12 horas. Posteriormente, se descongela el hidrogel congelado a temperatura ambiente, normalmente entre  $20$  y  $25^{\circ}\text{C}$ , desde 2 hasta 6 horas, más preferiblemente durante aproximadamente 3 horas.
- Aunque un solo ciclo de congelación-descongelación es suficiente para proporcionar la reticulación física al hidrogel, se recomienda realizar varios ciclos de congelación-descongelación, preferiblemente desde 2 hasta 5 ciclos.
- En una realización particular, el procedimiento 1 de la invención comprende adicionalmente lavar el hidrogel reticulado físicamente que resulta de la etapa b) del procedimiento 1 de la invención.
- El hidrogel que resulta de la etapa b) tras llevar a cabo el procedimiento de congelación-descongelación, puede lavarse simplemente con agua con el fin de eliminar cualquier compuesto o sustancia que no forme parte de la estructura tridimensional del material resultante. Por ejemplo, en el caso de usar plasma como material que contiene

fibrinógeno, esta etapa de lavado conduce a la eliminación de aquellas sustancias presentes en el plasma que no están asociadas física o químicamente a la estructura del biomaterial.

Tras la etapa de lavado, el hidrogel resultante es blanco e inodoro.

5 La etapa c) del procedimiento 1 de la invención se refiere a la liofilización del hidrogel reticulado físicamente que resulta de la etapa b), para obtener la estructura de biomaterial de la presente invención.

Desde un punto de vista farmacéutico, es importante tener el biomaterial disponible en forma liofilizada ya que esto mejora su estabilidad durante el almacenamiento.

10 Además, la liofilización permite dotar al biomaterial de una porosidad controlada, alta resistencia, pudiéndose manejar fácilmente en su estado hinchado y teniendo estabilidad, elasticidad, flexibilidad y plasticidad, ya que puede recuperar su forma tras aplicar una fuerza de deformación. Además, el biomaterial de la invención ha demostrado resistir un procedimiento de sutura en su estado hinchado sin romperse ni destruirse, lo que garantiza la correcta fijación al tejido dañado.

15 El hidrogel puede liofilizarse mediante cualquier método conocido por un experto, por ejemplo, en presencia de un agente crioprotector, tal como glucosa, sacarosa o trehalosa, a una concentración del 5%. De hecho, el biomaterial de la invención tiene la ventaja adicional de que puede liofilizarse y resuspenderse sin alteración en las características del mismo.

Sin embargo, el método de congelación para la liofilización afecta al tamaño de poro del biomaterial. El tamaño de poro es mucho más grande en los liofilizados con congelación gradual, tal como  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y más pequeño en los liofilizados que se congelan rápidamente (por ejemplo, directamente desde temperatura ambiente hasta  $-80^{\circ}\text{C}$ ).

20 Para el mismo método de congelación para la liofilización, se observa que los geles con alta concentración de agarosa, tal como el 0,4 y el 0,6%, tienen una estructura más similar, mientras que los liofilizados con concentración de agarosa inferior, tal como el 0,2%, tienen un tamaño de poro significativamente más grande.

25 Para la misma concentración de agarosa y diferente método de congelación, se observa que una congelación gradual lenta en la liofilización proporciona un biomaterial con una distribución uniforme de poros y un mejor aspecto visual. De hecho, la razón de los poros por área unitaria es diferente, correspondiendo a una razón de 1:2 (congelación lenta:congelación rápida). Esto se traduce en el hecho de que los liofilizados que se congelan rápidamente tienen el doble de poros por área unitaria en comparación con los liofilizados que se congelan gradualmente. El poro es por tanto más pequeño en los liofilizados que se congelan rápidamente.

30 Por tanto, en una realización preferida, el procedimiento de liofilización se lleva a cabo sometiendo el hidrogel a una tasa de congelación gradual de entre  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

El biomaterial liofilizado resultante también puede someterse posteriormente a un procedimiento de esterilización sin afectar a su estabilidad. Dicho procedimiento incluye, por ejemplo, la aplicación de radiación gamma al producto liofilizado.

35 Los expertos en la técnica conocen bien los procedimientos de esterilización y se realizan con el objetivo de poder usar el biomaterial en aplicaciones que requieren productos esterilizados como en el caso de la presente invención.

El procedimiento descrito en el presente documento proporciona un biomaterial que muestra propiedades ventajosas con respecto a otros biomateriales usados para regenerar tejidos blandos, en particular, con respecto a biomateriales compactados obtenidos siguiendo procedimientos tales como los descritos en los documentos WO2011/023843 y WO2013/072409.

40 Particularmente, los biomateriales muestran una estructura altamente porosa con una interconexión o reticulación adecuada para garantizar el suministro de nutrientes y la eliminación de los desechos celulares.

45 Además, el biomaterial resultante puede hincharse fácilmente, pudiendo absorber líquido en proporciones entre 10 y 30 veces su peso seco, dependiendo de su composición inicial. En su estado hinchado, es altamente resistente, tiene memoria (recupera su forma tras aplicarle una fuerza de deformación) y puede manejarse fácilmente, facilitando también la manipulación quirúrgica, facilitando por tanto la sutura al lecho del receptor y la implantación *in vivo*. Por tanto, el material hinchado puede comprimirse y plegarse sin perder sus propiedades, recuperando su forma inicial tras la deformación.

Adicionalmente, se mejoran las propiedades mecánicas del biomaterial debido a la reticulación física derivada de la etapa de congelación-descongelación.

50 Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento (procedimiento 2 de la invención) para preparar un hidrogel reticulado físicamente que tiene una red de interpenetración, comprendiendo dicho procedimiento:

- a) proporcionar un hidrogel que comprende una red de fibrina y una red de polisacárido; y



b) someter el hidrogel de la etapa a) a un procedimiento de congelación-descongelación.

Las etapas a) y b) del procedimiento 2 pueden llevarse a cabo siguiendo los mismos procedimientos que los mencionados anteriormente en esta memoria descriptiva para el caso del procedimiento 1 de la invención.

5 Tal como se mencionó anteriormente, el hidrogel resultante tras realizar el procedimiento 2 de la invención es un hidrogel reticulado físicamente que tiene una red de interpenetración. La reticulación física proporciona un hidrogel con propiedades mecánicas mejoradas.

#### Biomaterial de la invención

10 El procedimiento 1 de la invención tal como se definió anteriormente permite la producción de un biomaterial con propiedades mejoradas y que puede usarse para regenerar la mucosa oral. Por tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un biomaterial que puede obtenerse mediante el procedimiento 1 tal como se definió anteriormente.

En otro aspecto, la invención se refiere a una estructura de biomaterial poroso que comprende una red de fibrina y una red de polisacárido.

15 La estructura de biomaterial de la invención es altamente porosa con una interconexión adecuada de las cadenas poliméricas para garantizar el suministro de nutrientes y la eliminación de los desechos celulares.

En una realización particular, la estructura de biomaterial de la invención tiene un tamaño de poro que oscila entre 1 y 500 micrómetros, preferiblemente desde 50 hasta 200 micrómetros, más preferiblemente desde 50 hasta 100 micrómetros.

20 La estructura interna del biomaterial de la invención se ha analizado por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM). Las figuras 1-2 corresponden a las micrografías que muestran en detalle la estructura interna del biomaterial a diferentes escalas usando diferentes concentraciones de polisacárido.

Generalmente, se observa una estructura porosa ovalada con una baja interconexión entre poros. No se considera que los poros tengan una clara orientación por todo el material aunque de hecho están orientados por microáreas.

25 Tal como se mencionó anteriormente, la estructura de biomaterial de la invención puede hincharse fácilmente, pudiendo absorber líquido en proporciones de entre 10 y 30 veces su peso seco dependiendo de su composición inicial. En su estado hinchado, es altamente resistente, tiene memoria (recupera su forma tras aplicarle una fuerza de deformación) y puede manejarse fácilmente, facilitando también la manipulación quirúrgica, facilitando por tanto la sutura al lecho del receptor y la implantación *in vivo*. Por tanto, el material hinchado puede comprimirse y plegarse sin perder sus propiedades, recuperando su forma inicial tras la deformación.

30 En una realización preferida, la estructura de biomaterial poroso se obtiene reticulando primero un material que contiene fibrinógeno en presencia de un polisacárido en condiciones adecuadas para la gelificación del polisacárido. Aún en otra realización preferida, la reticulación del material que contiene fibrinógeno se realiza en presencia de al menos un factor de coagulación, una fuente de calcio y, opcionalmente, un agente antifibrinolítico. En una realización preferida, tras la gelificación, el hidrogel resultante se somete a un método de congelación-descongelación tal como el descrito anteriormente, antes de someterse a la etapa de liofilización.

35 En otra realización preferida, la estructura de biomaterial poroso se obtiene mediante la formación simultánea de la red de fibrina y la red de polisacárido sometiendo una mezcla que resulta de mezclar un material que contiene fibrinógeno, un factor de coagulación, una solución salina tamponada, preferiblemente PBS, y, opcionalmente un agente antifibrinolítico, con un polisacárido y una fuente de calcio, a condiciones adecuadas para la gelificación del polisacárido, por ejemplo a una temperatura por debajo del punto de fusión del polisacárido. Tras la gelificación, el hidrogel resultante se somete a un método de congelación-descongelación tal como el descrito anteriormente, antes de someterse a la etapa de liofilización.

40 La estructura de biomaterial que resulta de estas realizaciones preferidas, en las que el hidrogel se somete a un procedimiento de congelación-descongelación, también se caracteriza porque muestra una resistencia mejorada debido al hecho de que el hidrogel de partida se reticula físicamente como consecuencia de haberse sometido a un procedimiento de congelación-descongelación.

En ambas realizaciones preferidas, el material que contiene fibrinógeno es preferiblemente plasma sanguíneo.

45 También en ambas realizaciones preferidas, el factor de coagulación es preferiblemente trombina. Aún en otra realización preferida, la fuente de calcio es una sal de calcio y, lo más preferiblemente, cloruro de calcio. Aún en otra realización preferida, el agente antifibrinolítico es ácido tranexámico.

50 En otra realización preferida, el polisacárido es agarosa. En una realización todavía más preferida, la agarosa es agarosa de bajo punto de fusión. Aún en otra realización preferida, la concentración de agarosa en el biomaterial es aproximadamente del 0,05 al 1% y más preferiblemente, desde el 0,2 hasta el 0,6%.

Tal como se muestra en los ejemplos facilitados en el presente documento, la estructura de biomaterial poroso de la invención se caracteriza por ser altamente resistente, poderse manejar fácilmente y por tener memoria ya que recupera su forma tras aplicar una fuerza de deformación. Además, el biomaterial de la invención ha demostrado resistir, en su estado hinchado, una sutura sin romperse, lo que garantiza la correcta fijación al tejido dañado.

- 5 Las pruebas biológicas también han señalado la interacción correcta del biomaterial con las células, en particular fibroblastos humanos, así como una falta de citotoxicidad para dichas células.

La estructura de biomaterial poroso según la invención puede contener opcionalmente uno o más principios activos tales como uno o más factores de crecimiento (por ejemplo, en una cantidad que oscila entre el 0,0000001 y el 1 ó el 5 por ciento en peso de la composición de la matriz) para facilitar la regeneración de la mucosa oral. Los ejemplos de principios activos adecuados incluyen, pero no se limitan a, fibronectina, fibrina, laminina, factores de crecimiento de fibroblastos ácidos y básicos, testosterona, gangliósido GM-1, catalasa, factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento neuronal, galectina-1, y combinaciones de los mismos. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.506.727 concedida a Hansson *et al.* y la patente estadounidense n.º 6.890.531 concedida a Horie *et al.* Tal como se usa en el presente documento, los “factores de crecimiento” incluyen moléculas que promueven la regeneración, el crecimiento y la supervivencia del tejido de la mucosa. Los factores de crecimiento que se usan en algunas realizaciones de la presente invención pueden ser aquéllos que se encuentran de manera natural en extractos de queratina, o pueden estar en forma de un aditivo, añadido a los extractos de queratina o formando matrices de queratina. Los ejemplos de factores de crecimiento incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO), miostatina (GDF-8), factor de diferenciación de crecimiento-9 (GDF9), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF o FGF2), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Hay muchas proteínas relacionadas estructural y evolutivamente que constituyen grandes familias de factores de crecimiento.

- 25 Además, la estructura de biomaterial poroso según la invención puede comprender opcionalmente uno o más compuestos inmunomoduladores o bioactivos. Tal como se usa en el presente documento un “agente inmunosupresor o inmunomodulador” es un agente que suprime o modula general o específicamente una respuesta inmunitaria de mamífero.

Tal como se usa en el presente documento, el término “inmunomodulador” incluye citocinas, linfocinas, monocinas, factores de crecimiento de células madre, linfoquinas, factores hematopoyéticos, factores estimuladores de colonias (CSF), interferones (IFN), hormona paratiroidea, tiroxina, insulina, proinsulina, relaxina, prorelaxina, hormona estimuladora del folículo (FSH), hormona estimuladora del tiroides (TSH), hormona luteinizante (LH), factor de crecimiento hepático, prostaglandina, factor de crecimiento de fibroblastos, prolactina, lactógeno placentario, proteína OB, factor de crecimiento transformante (TGF), TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), eritropoyetina, trombopoyetina, factor de necrosis tumoral (TNF), TNF- $\alpha$ , TNF-beta, sustancia inhibidora mulleriana, péptido asociado a gonadotropina de ratón, inhibina, activina, factor de crecimiento endotelial vascular, integrina, interleucina (IL), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón- $\alpha$ , interferón-beta, interferón- $\gamma$ , factor SI, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 IL-21, IL-25, LIF, ligando de kit, FLT-3, angioestatina, trombospondina, endostatina, LT y similares.

En otra realización particular, la estructura de biomaterial comprende adicionalmente una sustancia osteoconductora, tal como colágeno, hidroxapatita, bisfosfonatos o carbonatos calcio. La incorporación de esta sustancia es de particular relevancia ya que guía la regeneración ósea cuando se usa la estructura de biomaterial para la reconstrucción de tejido duro.

- 45 En una realización particular de la invención, la estructura de biomaterial comprende adicionalmente células incorporadas en la estructura tridimensional o en la superficie de la misma. La incorporación de las células potencia la actividad regeneradora del biomaterial y el procedimiento de reparación tisular en aquellos tejidos altamente dañados o sin posibilidad de contribución celular *in situ* por parte del paciente, puesto que este biomaterial contiene células sanas del mismo tipo que las presentes en el tejido dañado.

50 Preferiblemente, las células incorporadas en el hidrogel se seleccionan del grupo que consiste en fibroblastos, queratinocitos, miocitos, adipocitos, células endoteliales, células madre mesequimatosas no diferenciadas o células madre mesenquimatosas diferenciadas dando lugar a otra variedad celular y/o células madre hematopoyéticas no diferenciadas o células madre hematopoyéticas diferenciadas dando lugar a otra variedad celular, células oculares, células de la córnea, células de la retina, células epiteliales, células del sistema leucocitario, células del sistema hematopoyético, condrocitos, condroblastos, osteoblastos, osteocitos, neuronas u otras células del sistema nervioso periférico y central, células del sistema sanguíneo blanco y macrófagos.

#### Uso terapéutico

Otro aspecto de la invención se refiere a una estructura de biomaterial poroso tal como se definió anteriormente para

su uso en medicina.

En otro aspecto, la invención se refiere a una estructura de biomaterial poroso tal como se definió anteriormente para su uso para aumentar, restablecer o reemplazar parcial o completamente la actividad funcional de tejidos blandos en seres humanos y animales.

- 5 En una realización preferida, la invención se refiere a una estructura de biomaterial poroso tal como se definió anteriormente para su uso para aumentar, restablecer o reemplazar parcial o completamente la actividad funcional de un tejido blando enfermo o dañado como resultado de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una caustización, una malformación congénita, una pérdida de sustancia, enfermedades de la mucosa oral o periodontales.

10 En una realización más preferida, la invención se refiere a una estructura de biomaterial poroso tal como se definió anteriormente para su uso para aumentar, restablecer o reemplazar parcial o completamente la actividad funcional de la mucosa oral. Más particularmente, la estructura de biomaterial poroso se usa para el tratamiento de gingivitis, periodontitis y para reparar el ligamento periodontal.

- 15 En otra realización particular, la invención se refiere a una estructura de biomaterial poroso tal como se definió anteriormente para su uso en el tratamiento o la cicatrización de heridas, quemaduras, úlceras, escaldaduras, fistulas u otras heridas crónicas o necróticas.

En otra realización particular, la invención se refiere a una estructura de biomaterial poroso tal como se definió anteriormente para su uso en el tratamiento de lesiones musculoesqueléticas.

- 20 En otra realización particular, la invención se refiere a una estructura de biomaterial poroso tal como se definió anteriormente para su uso en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

En otra realización particular, la invención se refiere a una estructura de biomaterial poroso tal como se definió anteriormente para su uso en el tratamiento de enfermedades oftalmológicas, tales como lesiones corneales o lesiones retinianas.

- 25 En otra realización particular, la estructura de biomaterial poroso tal como se definió anteriormente se usa para reparar el sistema osteoarticular, más particularmente para reparar enfermedades de discos intervertebrales o cartílagos, y para el tratamiento de osteoartritis, periartrosis o artrosis.

En otra realización particular, la estructura de biomaterial poroso tal como se definió anteriormente se usa para la regeneración de tejido duro, particularmente para la regeneración de tejidos periodontales.

- 30 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una estructura de biomaterial tal como se definió anteriormente en medicina.

La invención también se refiere al uso de una estructura de biomaterial tal como se definió anteriormente para aumentar, restablecer o reemplazar parcial o completamente la actividad funcional de un tejido blando enfermo o dañado tal como se definió anteriormente.

- 35 Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la estructura de biomaterial poroso de la invención.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende la estructura de biomaterial poroso de la invención y también un portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, la composición farmacéutica comprende la estructura de biomaterial poroso de la invención y también un principio activo. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende la estructura de biomaterial poroso de la invención y también un principio activo junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

- 40 Tal como se usa en el presente documento, el término "principio activo" significa cualquier componente que proporciona potencialmente una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, curación, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o la función del cuerpo humano o el cuerpo animal.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse en un método de tratamiento de una manera aislada o junto con otras composiciones o compuestos farmacéuticos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición cosmética que comprende la estructura de biomaterial poroso de la invención.

- 50 La composición cosmética incluye cualquier composición que comprende la estructura de biomaterial poroso de la invención y que está en forma de gel, crema, pomada o bálsamo para su administración tópica. Dichas composiciones se caracterizan porque tienen propiedades emolientes, protectoras y regeneradoras incluso cuando

no tienen ninguna molécula cosméticamente activa asociada.

En una variante de la invención, la composición cosmética también puede incorporar moléculas activas, que aunque no tienen ningún efecto terapéutico, tienen propiedades como agente cosmético. Entre las moléculas activas que pueden incorporarse en la composición antioxidante, pueden citarse, entre otros agentes emolientes, conservantes, sustancias de fragancia, agentes antiacné, agentes antifúngicos, antioxidantes, desodorantes, antitranspirantes, agentes anticasma, despigmentadores, agentes antiseborreicos, colorantes, lociones bronceadoras, absorbentes de luz UV, enzimas, sustancias de fragancia.

La composición cosmética puede comprender además agentes de control del pH, tales como, por ejemplo, agentes tamponantes, que evitan que el pH de la composición se reduzca hasta valores por debajo de 5, así como conservantes que evitan cambios estructurales importantes en la composición. Un experto en la técnica puede determinar qué componentes adicionales pueden usarse y si son necesarios, siendo muchos de ellos de uso común en las composiciones cosméticas.

Ahora se describirá adicionalmente la invención a modo de referencia a los siguientes ejemplos que se facilitan para el fin de ilustración únicamente y que no deben considerarse limitativos de la invención.

## 15 Ejemplos

### Ejemplo 1. Preparación de la estructura de biomaterial

Se preparó una disolución que contenía una mezcla de plasma sanguíneo humano (76 ml), PBS 1x (16,5 ml) y Amchafibrin (1,5 ml). Se añadieron agarosa al 4% (5 ml) y cloruro de calcio al 10% (1 ml) a dicha disolución al mismo tiempo. Se midieron las proporciones en v/v con respecto al volumen total de la mezcla resultante.

20 Se mezcló meticulosamente la mezcla resultante y se añadió a un molde. Se dejó que la mezcla gelificara. La figura 3(a) muestra el hidrogel resultante antes de someterse a liofilización.

Se lavó suavemente el hidrogel formado con agua y se liofilizó. Para ese fin, se congelaron los hidrogeles a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se sublimó el agua después a 0,024 mbar y  $-48^{\circ}\text{C}$ .

### Ejemplo 2. Preparación de la estructura de biomaterial y caracterización física del mismo

25 Se preparó una disolución que contenía una mezcla de plasma sanguíneo humano (76 ml), PBS 1x (16,5 ml) y Amchafibrin (1,5 ml). Se añadieron agarosa al 4% (5 ml) y cloruro de calcio al 10% (1 ml) a dicha disolución al mismo tiempo. Se midieron las proporciones en v/v con respecto al volumen total de la mezcla resultante.

Se mezcló meticulosamente la mezcla resultante y se añadió a un molde. Se dejó que la mezcla gelificara.

30 Entonces se sometió el hidrogel formado a un procedimiento de congelación-descongelación congelando el hidrogel a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas y posteriormente se descongeló el hidrogel congelado a temperatura ambiente durante 3 horas.

La figura 3 (b) muestra el hidrogel resultante antes de someterse a liofilización.

Tras esto, se lavó suavemente el hidrogel resultante con agua y se liofilizó. Para ese fin, se congelaron los hidrogeles a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se sublimó el agua después a 0,024 mbar y  $-48^{\circ}\text{C}$ .

35 Se siguió el mismo procedimiento pero variando la concentración de agarosa hasta el 0,2%, el 0,4% y el 0,6%.

La figura 1 muestra en detalle la estructura interna de la estructura de biomaterial para las diferentes concentraciones de polisacárido. Las ampliaciones a 1.500X y 20.000X (figura 2) permiten visualizar en más detalle las redes de fibrina que llenan los poros de la estructura así como las fibras de fibrina cubiertas más probablemente con agarosa que forma la pared de dichos poros.

40 Generalmente, se observa una estructura porosa ovalada con una baja interconexión entre los poros. Los poros no parecen tener una clara orientación por todo el material aunque de hecho están orientados por microáreas.

Los geles con concentración de agarosa superior, tal como el 0,4 y el 0,6%, tienen una estructura más similar, mientras que la concentración de agarosa inferior da como resultado geles con un tamaño de poro significativamente más grande.

45 También se evaluó el material para determinar su manejabilidad. Se realizaron pruebas de manejo básicas en el laboratorio, evaluando visualmente el rendimiento. Cuando se hincha, el biomaterial es resistente, tiene memoria (recupera su forma tras aplicarle una fuerza de deformación) y puede manejarse fácilmente (véase la figura 4).

50 Adicionalmente, se realizaron pruebas de sutura con el fin de prever el comportamiento del biomaterial durante una intervención quirúrgica. Se observó que el biomaterial resiste dicha sutura sin romperse, garantizando la correcta fijación al tejido (véase la figura 5).

Para evaluar la cantidad y el volumen de líquido que puede absorberse y almacenarse por el biomaterial, se sumergieron en agua muestras que tenían diferentes composiciones de agarosa.

- 5 El resultado muestra que el biomaterial puede absorber entre 10 y 30 veces su peso seco dependiendo de su composición inicial. El biomaterial se hincha fundamentalmente en las primeras 24 horas, aumentando este hinchamiento ligeramente después.

Ejemplo 3. Caracterización biológica del biomaterial.

*Estado vivo/muerto*

Se cultivaron células de fibroblastos humanos durante 24, 48 y 72 horas en un biomaterial preparado tal como se describe en el ejemplo 2 con una concentración de agarosa del 0,2%.

- 10 Se realizó un ensayo de estado vivo/muerto para evaluar la viabilidad celular. Este ensayo permite distinguir células vivas de células muertas por medio de un método colorimétrico. Las células vivas emiten fluorescencia verde debido a su actividad esterasa. Las células muertas, sin embargo, carecen de esta actividad y no emiten fluorescencia verde. Para visualizar la existencia de células muertas, el kit contiene un homodímero de etidio, un compuesto que sólo penetra en las células con membrana dañada.
- 15 Las figuras 6 y 7 muestran los resultados de fluorescencia de los materiales evaluados en diferentes tiempos. Las células invaden ampliamente la estructura tridimensional y aumentan en el cultivo a lo largo del tiempo. No se observan células muertas (color rojo) en ningún caso.

Este resultado se traduce en una interacción positiva del biomaterial con fibroblastos humanos.

*Citotoxicidad*

- 20 Se evaluó la citotoxicidad del biomaterial preparado siguiendo el ejemplo 2 según la norma ISO 10993-5 (Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Cytotoxicity Assay *in vitro*).

Se realizó el ensayo con fibroblastos FA0506007 en fase 3 con una densidad de siembra de 4000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos.

Se usaron en el ensayo triplicados de dos composiciones diferentes, que tenían agarosa al 0,2 y al 0,4%.

- 25 El resultado de citotoxicidad 24 horas tras el cultivo muestra que ninguno de los materiales es citotóxico para las células evaluadas (véase la figura 8).

*Hemocompatibilidad*

- 30 También se evaluó la hemocompatibilidad según la norma ISO 10993-4:2002 (Biological Evaluation of Medical Devices. Part 4: Selection of Tests for Interactions with Blood). La cuantificación de los efectos hemolíticos se considera una determinación específica debido al alto nivel de hemoglobina plasmática en la sangre y determina la fragilidad de la membrana de los eritrocitos en contacto con los biomateriales.

*Prueba de irritación*

- 35 Para analizar la posibilidad de que el biomaterial sea irritante, se analizaron dos composiciones según el ejemplo 2 (agarosa al 0,2% y al 0,4%). En ambos casos se analizó el material por triplicado. El biomaterial no es irritante para ninguna de las composiciones analizadas (véase la figura 9).

Ejemplo 3. Prueba de principio *in vivo*

- 40 En un primer enfoque, se implantó por vía subcutánea un biomaterial sintetizado según el ejemplo 2 en un modelo de rata con el fin de evaluar la respuesta del tejido circundante al biomaterial implantado en lo que se refiere a posibles acontecimientos de toxicidad y a la capacidad de degradación. Se usaron ratas Wistar AG de más de 8 semanas de edad en este estudio tras el alojamiento y el tratamiento según las normas del comité ético.

En cada animal, se practicaron dos incisiones a ambos lados de la parte inferior del lomo y se introdujo 1 cm<sup>2</sup> de biomaterial por vía subcutánea a través de una de las incisiones (véase la figura 10), dejando la otra como control (solución salina fisiológica). A los 7, 14, 30 y 60 días tras implantar el biomaterial, se sacrificaron las ratas y se obtuvieron el biomaterial y los tejidos circundantes para su evaluación histológica.

- 45 No se observaron signos de inflamación externa macroscópica, eritema ni edema en ningún momento del experimento en los tejidos adyacentes. Se observaron signos de neovascularización tanto en el día 7 como en el 14. Se observó una resorción significativa del biomaterial de la invención tras 30 días desde la implantación que continúa de manera progresiva hasta el final del ensayo en el día 60.

Tabla 2. Progresión del tamaño del biomaterial de la invención durante todo el tiempo de pruebas (60 días)

Días	Área (cm <sup>2</sup> )			
	7	14	30	60
Media	1,366	0,909	0,789	0,241
Desviación	0,107	0,207	0,034	0,035

El análisis de la progresión del tamaño del implante muestra un ligero aumento inicial en el tamaño del biomaterial de la invención debido probablemente a la capacidad del biomaterial de la invención para absorber fluidos tisulares, recuperando su tamaño inicial entre los días 7 y 14. A partir de este momento, su tamaño disminuyó progresivamente a lo largo del tiempo, demostrando su capacidad de resorción a lo largo del tiempo sin ninguna reacción del tejido circundante. De todas formas, no se observó colapso evidente del biomaterial, por lo que la matriz continúa mostrando una estructura tridimensional.

La evaluación histológica muestra que en comparación con las lesiones control, el biomaterial en sus estadios iniciales (7 días) se rodea por una cápsula fibrótica típica y reclutamiento de células inmunitarias que se produce en todos los casos cuando se implanta material exógeno. Los resultados a los 30 días ya muestran una resolución total de esta respuesta inicial, mientras que continúa la formación de nuevas redes vasculares y puede observarse una matriz extracelular regular en contacto con el biomaterial de la invención.

La figura 11 muestra una imagen macroscópica de los explantes de biomaterial durante todo el tiempo de pruebas (7, 14, 30 y 60 días), mientras que la figura 12 muestra imágenes histológicas de los explantes durante todo dicho tipo de pruebas.

#### Ejemplo 4. Prueba de concepto *in vivo*

Se realiza la funcionalidad del biomaterial mediante la evaluación del aumento de volumen gingival tras la implantación de biomaterial en un modelo de defecto en la mucosa oral en cerdo enano.

Se realizó el estudio en un cerdo enano según el reglamento europeo que regula el cuidado y el tratamiento de animales de laboratorio y se aprobó por el comité de uso y cuidado animal de la *Universitat Autònoma de Barcelona*. Se seleccionó un cerdo enano macho de 35 kg de peso corporal y se mantuvo con una dieta blanda durante todo el estudio.

Se realizó la extracción de los incisivos 3 y premolares 2 en cada lado de la mandíbula inferior. Tras un periodo de curación de dos meses, se obtuvieron impresiones de alginato y exploración en 3D de cada lado de la mandíbula inferior y se realizó una nueva cirugía para la implantación del biomaterial. Se originaron cuatro incisiones laterales y colgajos de envoltura (1,5 x 2 cm) en la mucosa gingival lateral de cada extracción de diente y se rellenaron con biomaterial (1x1 cm). Adicionalmente, en ambos lados, se realizó otra incisión en el espacio natural entre P1 y el canino. Se cerró completamente la incisión con una sutura de monofilamento absorbible. En los días 15, 45 y 90 tras la implantación de biomaterial, se realizaron impresiones de alginato en 3D y finalmente se sedó al animal y se procedió a la eutanasia. Se obtuvieron biopsias (2x1 cm) para cada zona de mucosa gingival y se fijaron de manera rutinaria secciones seriadas de 2 mm en formalina tamponada neutra al 10%, incrustada en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se realizó la evaluación macroscópica de curación de tejido y el control de ingesta de alimento a lo largo del experimento. Además, se fabricaron moldes principales por medio de impresiones de alginato, se exploraron los modelos moldeados y se procesaron con un programa informático de análisis de imagen (OrthoViewer 2014 de 3Shape S/L) que permite la superposición de diferentes modelos de tiempo, la selección de secciones longitudinales y transversales y la detección de diferencias principales. Se calcularon las medias y desviaciones estándar y se analizaron las diferencias de volumen.

No se observaron signos de toxicidad de biomaterial ni ningún acontecimiento adverso durante el estudio en cerdo enano. Las biopsias mostraron un buen tejido dérmico y epidérmico y no se observó inflamación o reacción en el huésped debido a la aplicación de biomaterial. Se produjo una regeneración epitelial completa con presencia de un epitelio queratinizado, maduro y de múltiples capas. La submucosa mostró un tejido conjuntivo bien organizado, con colágeno maduro compuesto por fibras gruesas, densas y bien organizadas. El biomaterial desapareció casi completamente.

El análisis de volumen de modelos moldeados mostró una ganancia de volumen en lesiones cuando se había implantado biomaterial, tal como se indica en la tabla 3.

Tabla 3. Aumento en el volumen de mucosa gingival producido por defectos de la mucosa oral por la implantación de biomaterial.

Zona	Aumento de volumen final (mm)
Incisión 1	1,07
Incisión 2	0,88
Incisión 3	1,98

Incisión 4	1,37
Media $\pm$ DE	1,33 $\pm$ 0,5

La implantación de biomaterial produjo un incremento de volumen gingival importante que es muy similar a la ganancia de volumen obtenida cuando se aplica un injerto de tejido conjuntivo subepitelial autólogo (injerto de un sitio donante de tejido del propio paciente).

**REIVINDICACIONES**

1. Método para producir una estructura de biomaterial, comprendiendo dicho método:
  - a) proporcionar un hidrogel que comprende una red de fibrina y una red de polisacárido;
  - 5 b) someter el hidrogel de la etapa a) a un procedimiento de congelación-descongelación para reticular físicamente el hidrogel; y
  - c) someter el hidrogel reticulado físicamente obtenido tras realizar la etapa b), a una liofilización
2. Método según la reivindicación 1, en el que la red de fibrina se obtiene polimerizando un material que contiene fibrinógeno.
3. Método según la reivindicación 2, en el que el material que contiene fibrinógeno es plasma sanguíneo.
- 10 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en el que la polimerización del material que contiene fibrinógeno se lleva a cabo en presencia de un agente de coagulación, una fuente de calcio y, opcionalmente, en presencia de un agente antifibrinolítico.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la red de polisacárido se obtiene polimerizando un material que contiene polisacárido.
- 15 6. Método según la reivindicación 5, en el que el material que contiene polisacárido es agarosa.
7. Estructura de biomaterial que puede obtenerse mediante el procedimiento según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Estructura de biomaterial según la reivindicación 7, en la que dicha estructura de biomaterial comprende células incorporadas en la estructura o en la superficie del mismo.
- 20 9. Procedimiento para preparar un hidrogel reticulado físicamente que tiene una red de interpenetración, comprendiendo dicho procedimiento:
  - a) proporcionar un hidrogel que comprende una red de fibrina y una red de polisacárido; y
  - b) someter el hidrogel de la etapa a) a un procedimiento de congelación-descongelación.
- 25 10. Hidrogel reticulado que tiene una red de interpenetración que puede obtenerse mediante el procedimiento según la reivindicación 9.
11. Estructura de biomaterial según se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 ó 8, para su uso en medicina.
12. Estructura de biomaterial según se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 ó 8, para su uso para aumentar, restablecer o reemplazar parcial o completamente la actividad funcional de un tejido blando enfermo o dañado.
- 30 13. Estructura de biomaterial para su uso según la reivindicación 12, en la que el tejido blando está dañado o enfermo como resultado de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una caustización, una malformación congénita, una pérdida de sustancia y una enfermedad periodontal.
- 35 14. Biomaterial para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, en el que el tejido blando es mucosa oral.
15. Composición farmacéutica que comprende la estructura de biomaterial según se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 ó 8.
- 40 16. Composición cosmética que comprende la estructura de biomaterial según se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 ó 8.



Figura 1.

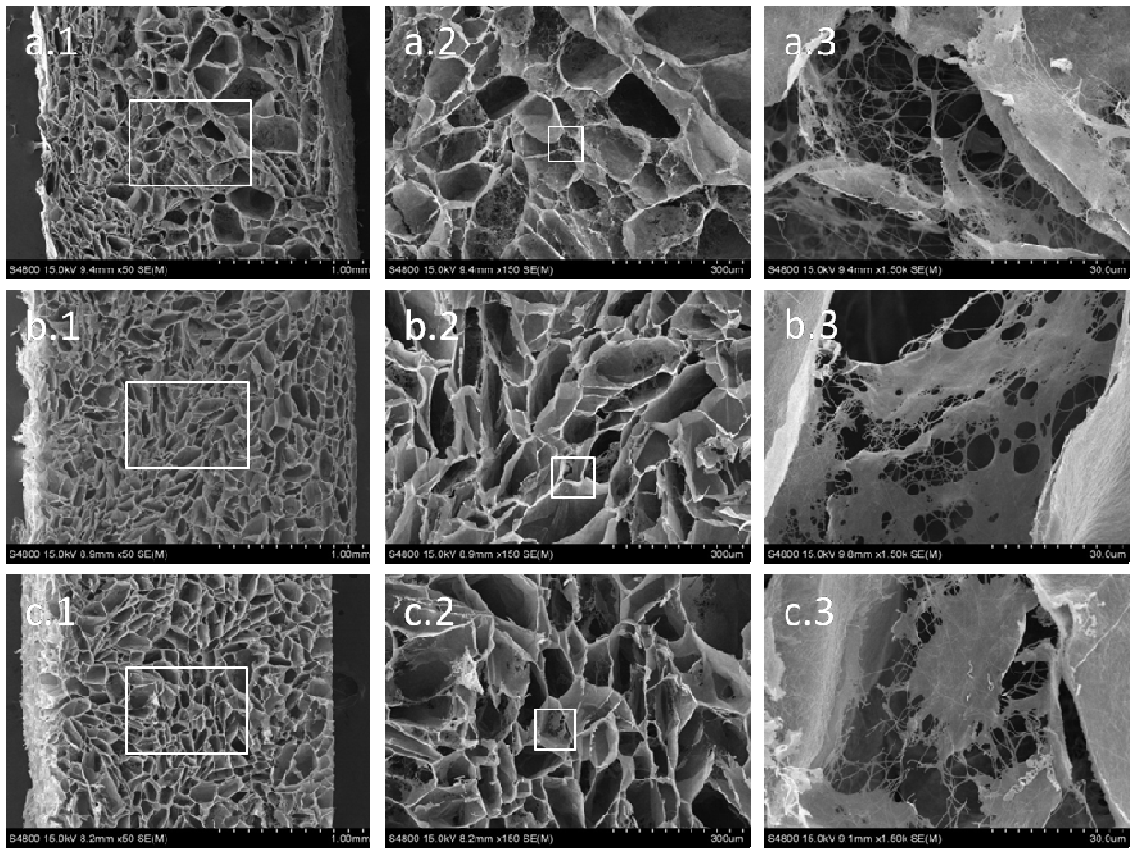


Figura 2.

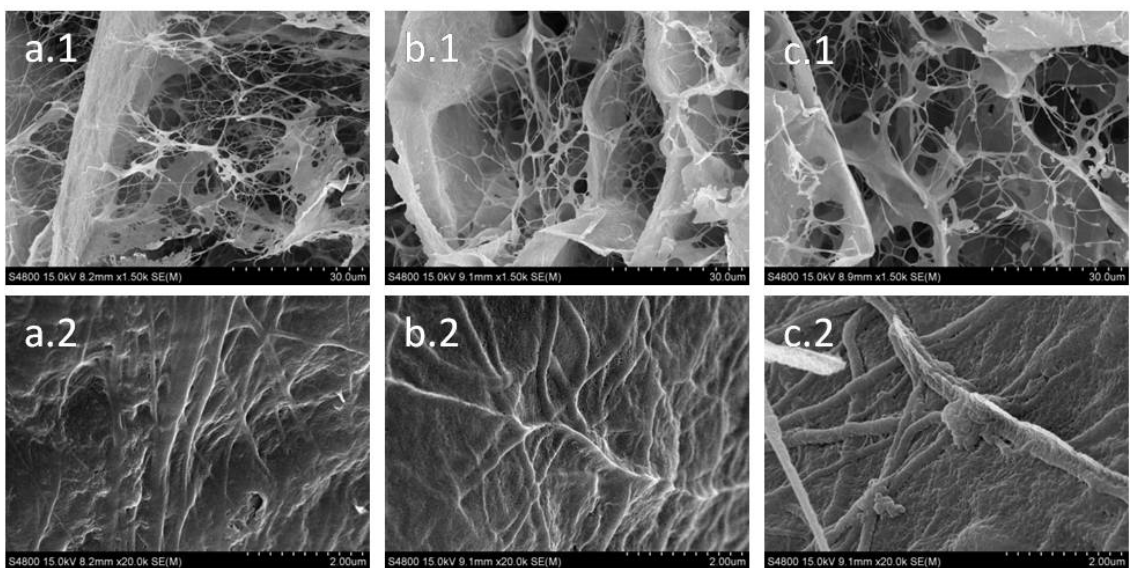


Figura 3

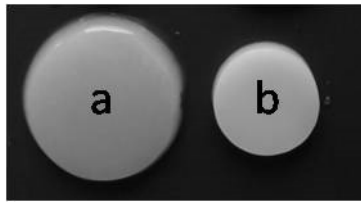


Figura 4

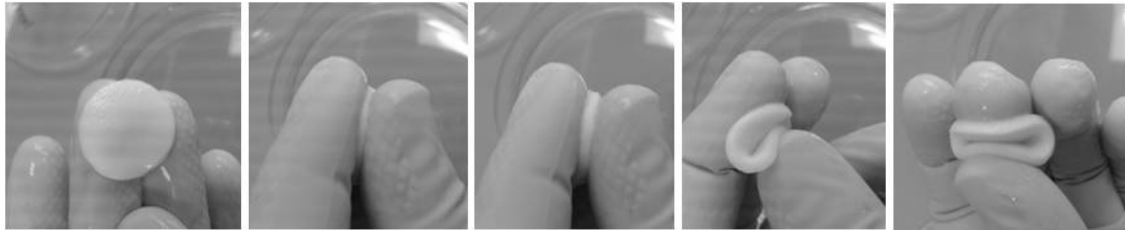


Figura 5

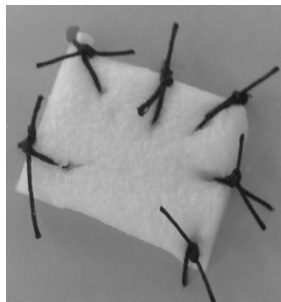


Figura 6

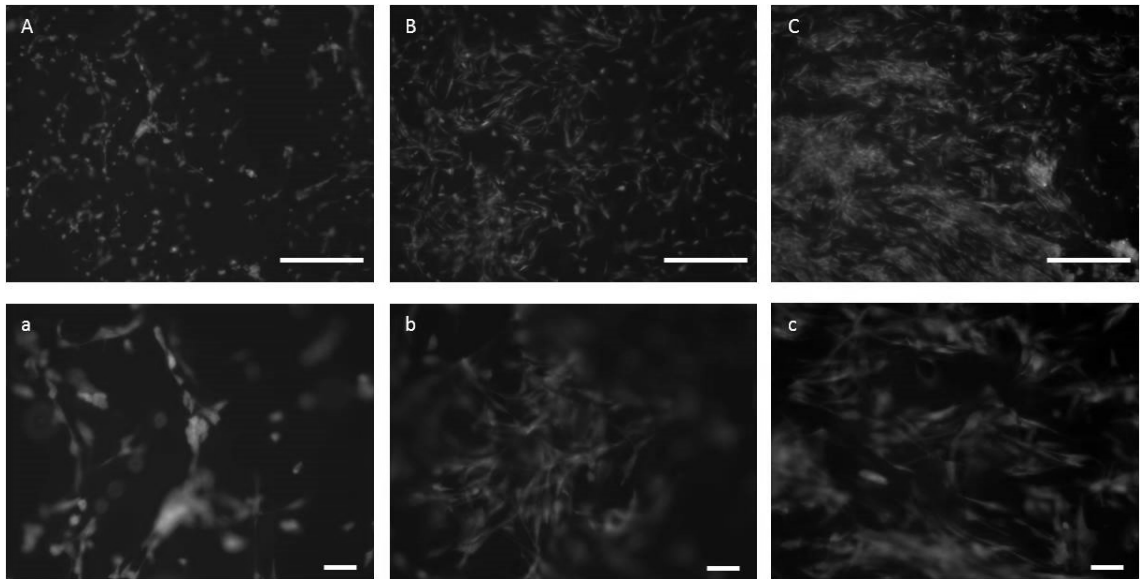


Figura 7

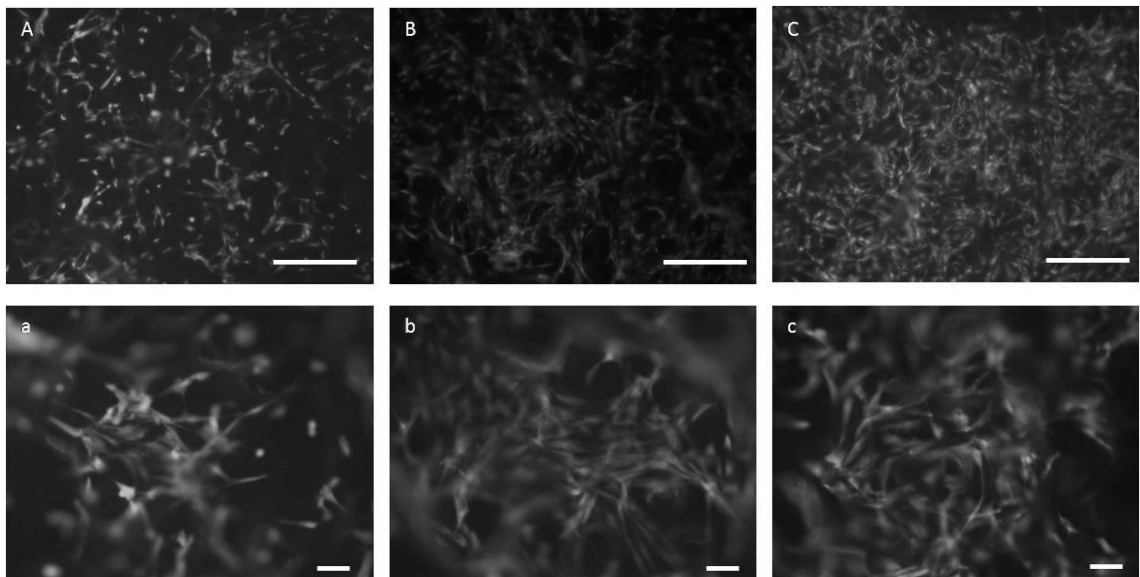


Figura 8

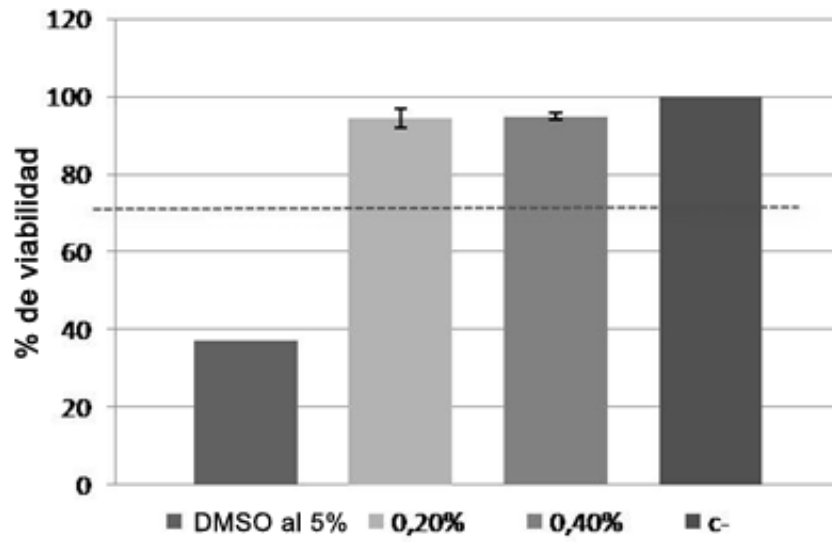


Figura 9.

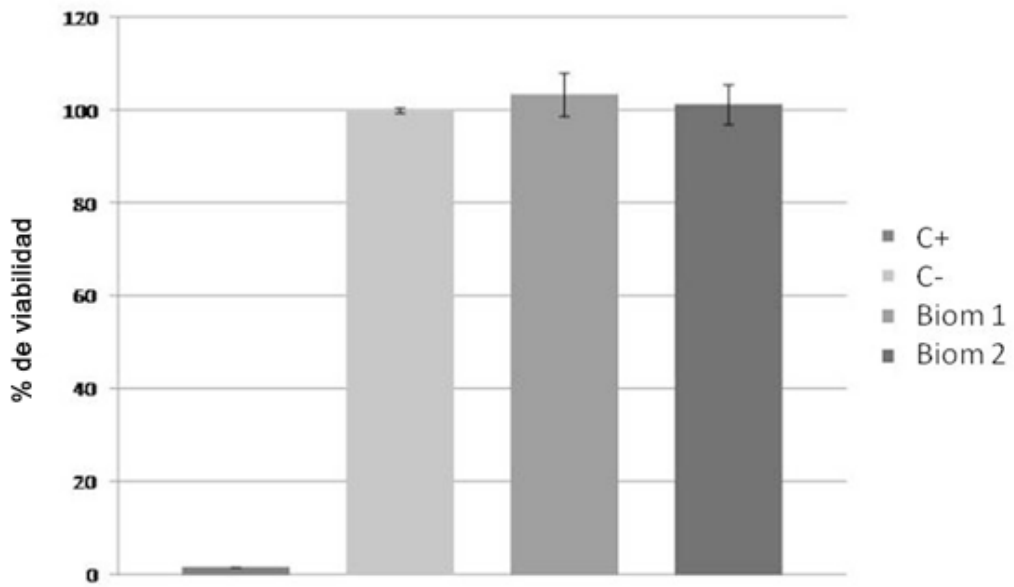


Figura 10

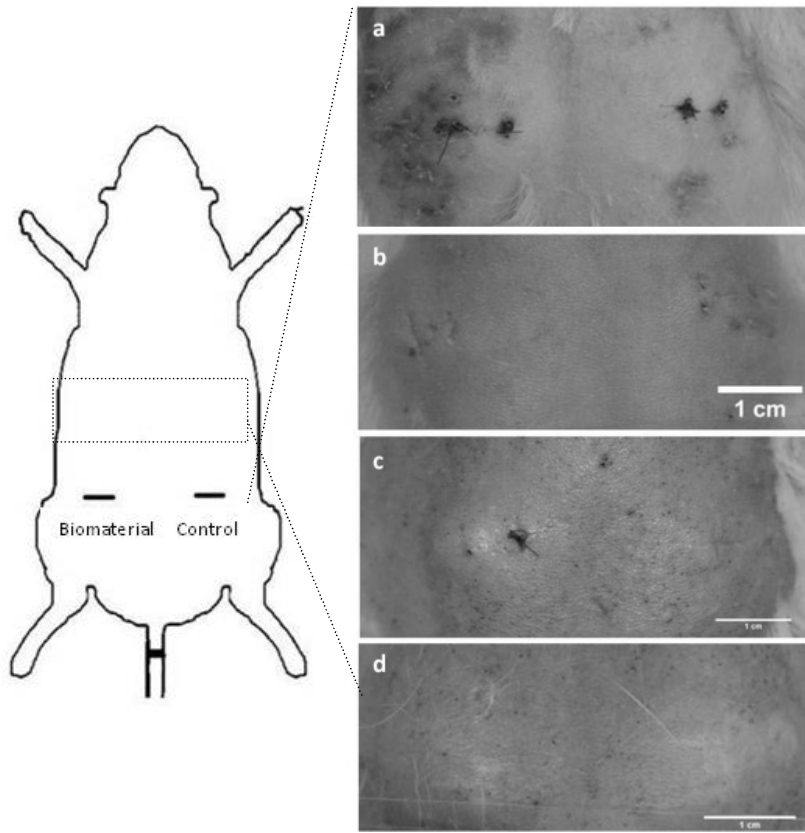


Figura 11

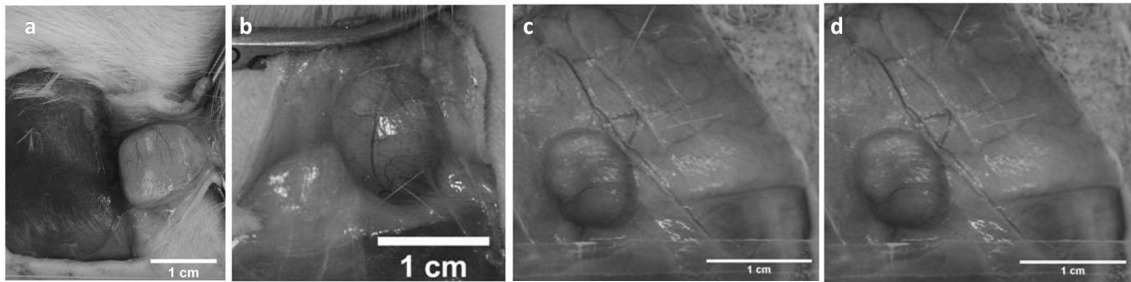


Figura 12

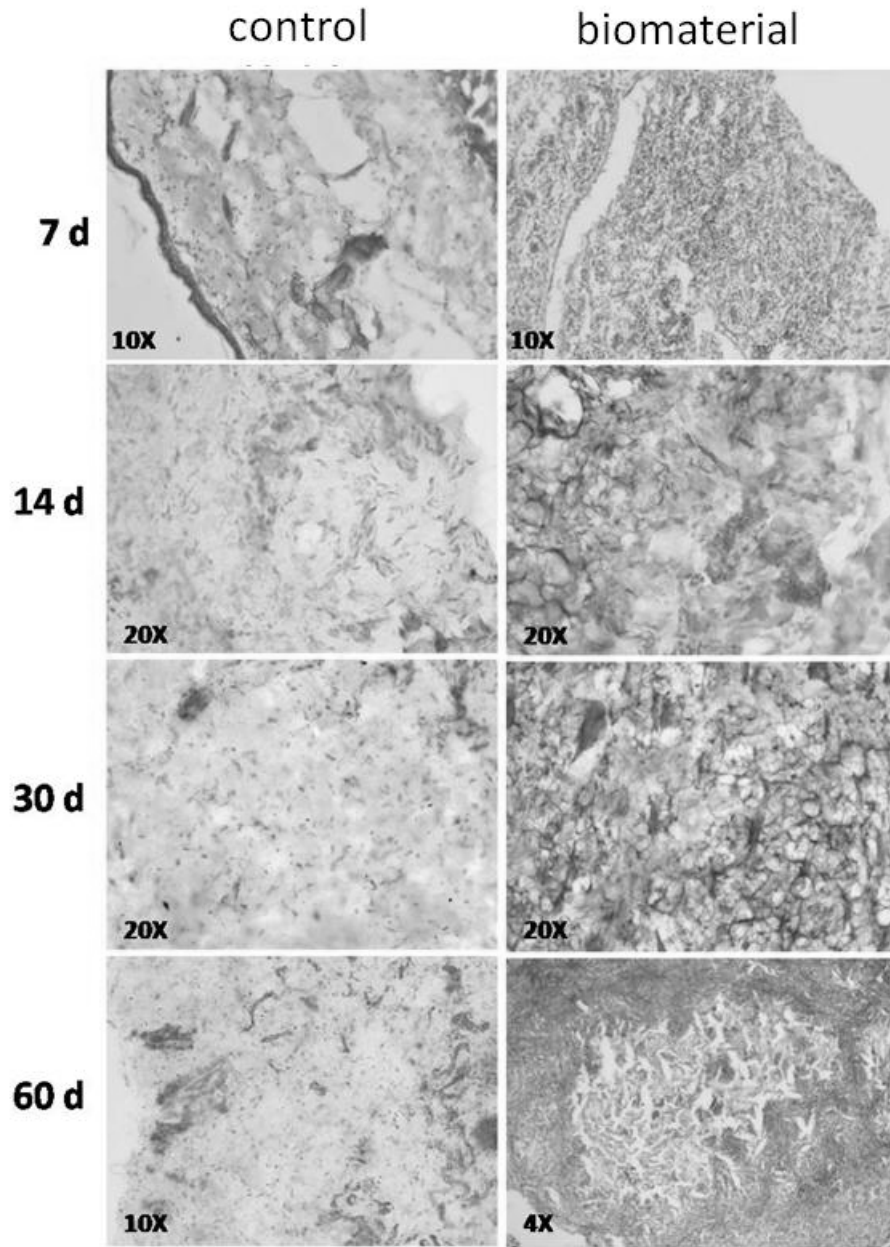


Figura 13

