

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2016/079366 A1**

(43) Fecha de publicación internacional  
26 de mayo de 2016 (26.05.2016) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C12N 5/00 (2006.01) A61F 2/00 (2006.01)  
C12N 5/07 (2010.01) A61F 2/02 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070836

(22) Fecha de presentación internacional:

21 de noviembre de 2015 (21.11.2015)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201400958

21 de noviembre de 2014 (21.11.2014)

ES

(71) Solicitantes: **UNIVERSIDAD DE GRANADA** [ES/ES]; Hospital Real, Avda. Del Hospicio S/n, E-18071 Granada (ES). **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avda. de la Constitución, 18, E-41071 Sevilla (ES). **UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA** [AR/AR]; Av. Haya de la Torre, s/n, Córdoba, 5000 (AR).

(72) Inventores: **LÓPEZ LÓPEZ, Modesto Torcuato**; Otri - Universidad De Granada, Centro de Transferencia Tecnológica, 3ª planta, Gran Vía de Colón, 48, E-18071 Granada (ES). **GARCÍA LÓPEZ-DURÁN, Juan de Dios**; Otri - Universidad De Granada, Centro de Transferencia Tecnológica, 3ª planta, Gran Vía de Colón, 48, E-18071

Granada (ES). **ALAMINOS MINGORANCE, Miguel**; Otri - Universidad De Granada, Centro de Transferencia Tecnológica, 3ª planta, Gran Vía de Colón, 48, E-18071 Granada (ES). **RODRÍGUEZ, Ismael Ángel**; Facultad de Odontología - Universidad Nacional de Córdoba, Av. Haya de la Torre s/n, Córdoba, 5000 (AR). **SCIONTI, Giuseppe**; Fibao, Avda. Fuerzas Armadas, 2, E-18014 Granada (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: PRODUCTION OF ARTIFICIAL TISSUES COMPRISING MAGNETIC PARTICLES

(54) Título : ELABORACIÓN DE TEJIDOS ARTIFICIALES QUE COMPRENEN PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

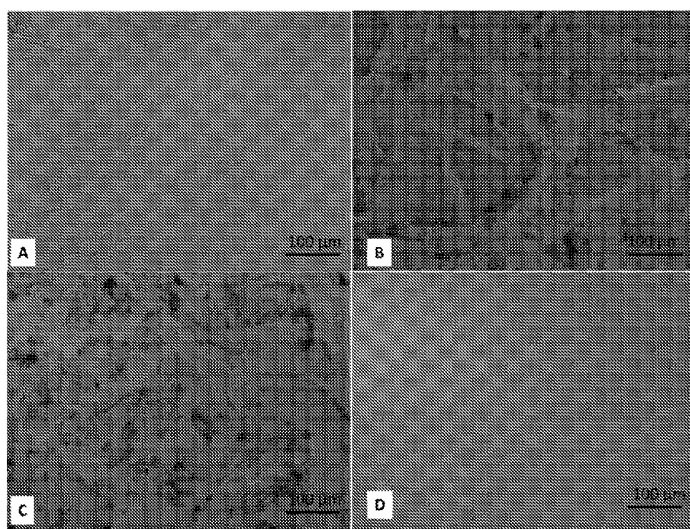


Fig. 1

(57) Abstract: The invention pertains to the field of biomedicine, and more specifically, of tissue engineering. The invention specifically relates to the use of multiple magnetic domain particles that have a mean diameter of more than 2 nm, to compositions and biomaterials comprising same, and to an *in vitro* method for producing an artificial tissue with the magnetic particles, to the artificial tissue that can be produced by said method, and to the use of said artificial tissue for increasing, restoring or partially or entirely substituting the functional activity of a damaged organ or tissue.

(57) Resumen: La presente invención se encuadra en el campo de la biomedicina y, más específicamente, de la ingeniería tisular. Específicamente, se refiere al uso de partículas con multidominio magnético que poseen un diámetro medio mayor de 2 nm, composiciones y biomateriales que las comprenden, así como un método *in vitro* de preparación de un tejido artificial con las partículas magnéticas, al tejido artificial obtenible por dicho método y al uso de este tejido artificial para incrementar,

restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano dañado.

WO 2016/079366 A1

**WO 2016/079366 A1**



---

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, **Publicada:**  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, — *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*  
TG).

## ELABORACIÓN DE TEJIDOS ARTIFICIALES QUE COMPRENDEN PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

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

### ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

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

La ingeniería tisular es un campo interdisciplinar que aplica los principios de la biología y la ingeniería para el desarrollo de estrategias encaminadas al reemplazo, reparación, mantenimiento y/o mejora de los tejidos biológicos [Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science 260 (5110), 920-926 (1993)]. Se diferencian tres enfoques diferentes dentro de la ingeniería tisular: (i) uso exclusivo de células; (ii) uso exclusivo de matrices poliméricas; y (iii) combinación de células y matrices poliméricas [Baddour JA, y cols. Birth Defects Res. Part C-Embryo Today-Rev. 96, 1-29 (2012); Khademhosseini A, y cols. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 2480–2487 (2006)].

La matriz extracelular (matriz polimérica en un biomaterial artificial) juega también un papel esencial ya que proporciona el soporte necesario para la proliferación de las células y el mantenimiento de sus funciones. Una matriz polimérica ideal debe cumplir

las siguientes características [Hutmacher DW. *Biomaterials* 21, 2529-2543 (2000)]: (i) debe ser tridimensional y altamente porosa, con poros interconectados para facilitar el crecimiento celular y el transporte de nutrientes; (ii) debe tener propiedades químicas superficiales adecuadas para permitir la adhesión, proliferación y diferenciación celular; (iii) debe tener propiedades biomecánicas adecuadas al tejido nativo que se pretenda sustituir. Esta última característica es especialmente importante en el caso de tejidos que soporten carga, como son los del sistema músculo-esquelético, tales como el cartílago y el hueso. A modo de ejemplo, téngase en cuenta que en el cartílago sólo el 3-5% del volumen se corresponde con células (condrocitos), que por otra parte tienen módulos de rigidez mecánica varios órdenes de magnitud inferiores a los de la matriz extracelular, por lo que no contribuyen de forma apreciable a las propiedades mecánicas del cartílago en su conjunto [Han L, y cols. *Ann. Rev. Mater. Res.* 41, 133-168 (2011)].

Los materiales que se utilizan en ingeniería tisular para la generación de la matriz polimérica se pueden dividir en naturales y sintéticos. Entre los naturales se encuentran el colágeno, la fibrina, el alginato, la agarosa, el quitosán y el ácido hialurónico. Tienen la ventaja de ser biocompatibles y biodegradables, y de proporcionar unas condiciones fisiológicas adecuadas para la adhesión y proliferación celular [Pabbruwe MB, y cols. *Biomaterials* 30, 4277–4286 (2009)]. Sin embargo, todos ellos presentan la desventaja de ser mecánicamente débiles, de modo que las matrices celulares generadas mediante estos polímeros no poseen las propiedades biomecánicas adecuadas para su uso eficiente en la mayoría de las posibles aplicaciones en ingeniería tisular. Por el contrario, los materiales sintéticos, como los basados en los alfa-hidroxiácidos, tienen propiedades mecánicas fácilmente moldeables, pero presentan la importante desventaja de no poseer sitios naturales para la adhesión celular.

Una alternativa al uso de materiales naturales o sintéticos es el uso de compuestos de estos tipos de materiales. Por ejemplo, Kon E, y cols. [*Injury* 41, 693-701 (2010)] prepararon una matriz polimérica artificial a partir de fibras de colágeno y nanopartículas de hidroxiapatita con el objetivo de reproducir partes del cartílago. En la misma dirección, distintos autores han propuesto muy recientemente el uso de nanopartículas magnéticas en combinación con polímeros para la preparación de matrices poliméricas magnéticas para sustitutos de tejidos [Bock N, y cols. *Acta Biomater.* 6, 786–796 (2010); Das B, y cols. *Biomed. Mater.* 8, 035003 (2013); Hu H, y

cols. RSC Adv. 3, 879-886 (2013); Li Y, y cols. Adv. Funct. Mater. 23, 660-672 (2013); Zhu Y, y cols. J. Mater. Chem. B 1, 1279-1288 (2013)].

Muchos de los tejidos artificiales preparados mediante ingeniería tisular, y en particular aquellos preparados mediante fibrina y agarosa, presentan propiedades mecánicas (módulos viscoelásticos) demasiado débiles para ser implantados como sustitutivos de la mayoría de los tejidos humanos nativos. La introducción de partículas magnéticas en tejidos artificiales permitiría aumentar su resistencia mecánica. Sin embargo, las matrices magnéticas referenciadas en trabajos anteriores no poseen propiedades mecánicas dependientes de la intensidad de un posible campo magnético aplicado.

Además, las partículas magnéticas empleadas en trabajos anteriores son de un tamaño del orden de los 10 nm y, por tanto, presentan inconvenientes, ya que pueden ser endocitadas y teniendo, por tanto, un mayor riesgo de toxicidad, mientras que partículas de mayor tamaño sólo pueden ser fagocitadas, y por tanto, solo afectarían a los macrófagos. Dichas partículas son monodominio desde el punto de vista magnético. Ello conlleva que la fuerza de interacción entre ellas sea muy débil, inferior a la fuerza elástica de la matriz polimérica y al movimiento browniano, de modo que la aplicación de un campo magnético no modifica la estructura interna del biomaterial

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

## 25 COMPENDIO DE LA INVENCION

Un **primer aspecto** de la invención se refiere a una partícula con multidominio magnético con un diámetro medio mayor de 25 nm, de ahora en adelante "partícula magnética de la invención" o "partícula magnética".

Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a la partícula magnética de la invención para su uso como medicamento, o alternativamente, al uso de la partícula magnética de la invención en la elaboración de un medicamento.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a la partícula magnética de la invención para su uso para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado, o alternativamente, al uso de la partícula magnética de la invención en la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado.

Un **segundo** aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante "composición de la invención", que comprende la partícula de la invención.

Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a la composición de la invención para su uso como medicamento, o alternativamente, al uso de la composición de la invención en la elaboración de un medicamento.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a la composición de la invención para su uso para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado, o alternativamente, al uso de la composición de la invención en la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a un biomaterial, de ahora en adelante "biomaterial de la invención", que comprende al menos una partícula magnética de la invención o la composición de la invención.

Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al biomaterial de la invención para su uso como medicamento, o alternativamente, al uso del biomaterial de la invención en la elaboración de un medicamento.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al biomaterial de la invención para su uso para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado, o alternativamente, al uso del biomaterial de la invención en la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a un tejido artificial, de ahora en adelante "tejido artificial de la invención", obtenible por un método de obtención del tejido artificial de la invención que comprende:

- 5
- a) añadir una composición que comprende fibrinógeno a una muestra de células aisladas,
  - b) añadir un agente antifibrinolítico al producto resultante del paso (a),
  - c) añadir, al menos, un factor de coagulación, una fuente de calcio, trombina, o cualquier combinación de los anteriores al producto resultante del paso (b),
  - 10 d) añadir al menos una partícula magnética de la invención o una composición que comprende al menos una partícula magnética de la invención al producto resultante del paso (c).
  - e) añadir una composición de un polisacárido al producto resultante del paso (d),
  - 15 f) cultivar células aisladas en o sobre el producto resultante del paso (e), y
  - g) inducir la nanoestructuración del producto resultante del paso (f).

Un **quinto aspecto** de la presente invención, se refiere a un tejido artificial obtenible por el método de la invención anteriormente descrito (de ahora en adelante, "tejido artificial de la invención").  
20

Un **sexto aspecto** de la invención se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la evaluación de un producto farmacológico y/o químico.

Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad  
25 funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado.

También se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento.

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

En una realización preferida de este octavo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para  
5 incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado.

Un **noveno aspecto** de la invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante "kit o dispositivo de la invención", que comprende:

- 10 a) las partículas con multidominio magnético, la composición, el biomaterial o el tejido artificial de la invención, y
- b) un elemento capaz de generar un campo magnético.

#### BREVE EXPLICACIÓN DE LAS FIGURAS

15 **Figura 1.** Imagen de microscopia de contraste de fases de fibroblastos humanos en solución líquida. **A)** Control positivo de células, con forma fusiforme típica de los fibroblastos. **B y C)** Células cultivadas en presencia de nanopartículas de MagNP-OH en concentraciones de 0.5 y 1 vol. %, respectivamente. Las células mostraron una forma fusiforme, similar a la de las células de control positivo. **D)** Células de control negativo, caracterizadas por su forma redondeada. Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

20 **Figura 2.** Resultados del ensayo de proliferación celular WST-1. Se muestran los valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar de 6 experimentos independientes para cada grupo experimental. \* $p=0.000$ , comparado con el resto de grupos experimentales.

25 **Figura 3.** Resultados de la cuantificación de AND libre. Se muestran los valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar de la media. Se realizaron 6 experimentos independientes para cada grupo experimental. \* $p < 0.05$ , comparado con el resto de grupos experimentales.

30 **Figura 4.** Microscopia óptica de las muestra. **A)** Muestra de control (no magnética) gelificada en ausencia de un campo magnético aplicado (Ctrl-MF0). **B)** Muestra magnética gelificada en ausencia de un campo magnético aplicado (Ctrl-MF0). **C)**



Muestra magnética gelificada bajo aplicación de 32 kA/m (M-MF32). Las flechas indican la presencia de algunas células en el biomaterial.

**Figura 5.** Microscopia de barrido de las muestras. A) Muestra de control (no magnética) gelificada en ausencia de un campo magnético aplicado (Ctrl-MF0). **B)** 5 Muestra magnética gelificada en ausencia de un campo magnético aplicado (M-MF0). **C)** Muestra magnética gelificada bajo la aplicación de un campo magnético de 48 kA/m (M-MF48).

**Figura 6.** Ensayos de viabilidad Live & Dead – porcentual de células viables. Se muestran, por cada grupo experimental, los valores medios  $\pm$  desviación estándar de 10 6 experimentos independientes.

**Figura 7.** Resultados de la cuantificación de ADN en los biomateriales. Se muestran, por cada grupo experimental, los valores medios  $\pm$  desviación estándar de 6 experimentos independientes.

**Figura 8.** Magnetización en función de la intensidad de campo magnético aplicado para distintas muestras de tejido magnético. Cuadrados rellenos: M-MF0; círculos 15 huecos: M-MF16; triángulos huecos: M-MF32; triángulos rellenos: M-MF48.

**Figura 9.** **A)** Módulo elástico en función de la amplitud de la deformación por cizalla en ensayo de oscilometría a la frecuencia de 1 Hz. **B)** Esfuerzo de cizalla en función de deformación obtenido en ensayos en estado estacionario. Medidas realizadas en 20 ausencia de campo magnético.

**Figura 10.** Módulo elástico normalizado,  $\frac{G' - G'_{control}}{\phi_{MagNP-OH} \cdot G'_{control}}$ , en función de la amplitud de la deformación por cizalla para las muestras de tejidos magnéticos que se indican.

**Figura 11.** **A)** Módulo elástico en función de la amplitud de la deformación por cizalla para la muestra M-MF32 bajo la acción de los campos magnéticos cuya intensidad, H, 25 se indica. **B)** Esfuerzo de cizalla vs. deformación para la muestra M-MF16 obtenidas en ensayos en estado estacionario bajo aplicación de los campos magnéticos cuya intensidad se indica.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DELA INVENCION

La presente invención se refiere al uso de partículas con multidominio magnético de un tamaño medio superior a 25 nm, preferiblemente de aproximadamente 100 nm, para la elaboración de un medicamento útil en la regeneración tisular, o a un biomaterial que comprende dichas partículas de la invención para su uso en la elaboración de un biomaterial para la regeneración tisular. Por tanto, proporciona un método *in vitro* de preparación de un tejido artificial, al tejido artificial obtenible por dicho método y al uso de este tejido artificial para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano dañado. La introducción de partículas magnéticas en tejidos artificiales permite aumentar su resistencia mecánica y, además, permite controlar sus propiedades biomecánicas de una forma no invasiva mediante fuerzas magnéticas de acción a distancia, que no requieren contacto directo con el tejido generado. Ello da una mayor versatilidad y mejor adaptación de los tejidos magnéticos respecto de los no magnéticos. Además, la fijación de los tejidos magnéticos podría realizarse mediante fuerzas magnéticas ejercidas desde el exterior del tejido. De esto modo, se podrían evitar o minimizar las suturas quirúrgicas y sus efectos adversos.

#### *PARTÍCULAS Y COMPOSICIONES DE LA INVENCION*

Un **primer aspecto** de la invención se refiere a una partícula con multidominio magnético que posee un diámetro medio mayor de 25 nm, de ahora en adelante "partícula magnética de la invención". Más preferiblemente, el diámetro medio de las partículas es de entre 25 y 5000 nm, aún más preferiblemente es de entre 50 y 1000 nm, aún mucho más preferiblemente de entre 75 y 200 nm, y particularmente de aproximadamente 100 nm.

En otra realización preferida, las partículas magnéticas de la invención son de un material ferro- o ferrimagnético, preferentemente de hierro o aleaciones del mismo con otros metales, y más preferentemente aún de óxidos de hierro. En una realización preferente, las partículas serán de maghemita o de la una ferrita, y entre estas últimas preferentemente de magnetita.

En otra realización preferida, las partículas magnéticas de la invención están recubiertas de un material polimérico, preferiblemente biocompatible y/o

biodegradable. El material polimérico se selecciona de entre ácido poliláctico, ácido poliglicólico, quitosano, poli( $\epsilon$ -caprolactona), PLGA, un polímero de mismetacrilato, poli(alquilcianocrilato), polietilenimina (PEI), poli(L-lisina) (PLL), poli(2-dimetil-amino)etilmacrilato (pDMAEMA), polipéptidos derivados de la histidina, poli(D,L-lactida) (PLA), poli(glicolida) (PGA), PLGA, poli( $\epsilon$ -caprolactona), PEG, poli(N-(2-hidroxiopropil)metacrilamida) (PHPMA), o un derivado o una sal de los mismos, o cualquiera de sus mezclas. Más preferiblemente es poli(alquilcianocrilato), o un derivado o una sal de los mismos, o cualquiera de sus mezclas. En otra realización más preferida, El material polimérico se selecciona de entre un polímero de metacrilato, polietilenimina (PEI), poli(L-lisina) (PLL), poli(2-dimetil-amino)etilmacrilato (pDMAEMA), polipéptidos derivados de la histidina, poli(D,L-lactida) (PLA), poli(glicolida) (PGA), PLGA, poli( $\epsilon$ -caprolactona), PEG, poli(N-(2-hidroxiopropil)metacrilamida) (PHPMA), o cualquiera de sus combinaciones.

15 En el ámbito de la presente invención, el término "sales" incluye, pero sin limitarnos, p.e. nitrato, fosfato, sulfato, clorhidrato, glutamato, lactato o acetato. El término derivado incluye, pero sin limitarnos, ésteres, éteres, derivados por unión de grupos acilo, alquilo, hidroxilo, etc). En otra realización preferida de la invención, los derivados se seleccionan de entre alquil éteres de metacrilato y acil ésteres de metacrilato.

20 En otra realización más preferida, partículas están constituidas por un núcleo de magnetita ( $\gamma$ -Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) y recubiertas por una matriz polimérica de metil metacrilato-co.hidroxi etil metacrilato-co-etilen glycol dimetacrilato (MMA-co-HEMA-co-EGDMA).

25 El "tamaño medio" o el "diámetro medio" de estos sistemas se puede medir mediante procedimientos estándar conocidos por el experto en la materia, y que se describen, por ejemplo, en la parte experimental más abajo.

30 Por "diámetro medio" se entiende el diámetro promedio de la población de partículas dispersa en un medio acuoso. El diámetro medio de estos sistemas se puede medir por procedimientos estándar conocidos del experto en la materia y que se describen, por ejemplo, en los ejemplos más abajo.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a la partícula magnética de la invención para su uso como medicamento, o alternativamente, al uso de la partícula magnética de la invención en la elaboración de un medicamento.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a la partícula magnética de la invención para su uso para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado, o alternativamente, al uso de la partícula magnética de la invención en la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado.

Un **segundo** aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende la partícula de la invención. En una realización más preferida, la composición de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. Más preferiblemente, la composición de la invención es una composición farmacéutica. Más preferiblemente, la composición de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización aún más preferida, la composición de la invención además comprende otro principio activo.

Como se emplea a la largo de la presente memoria, el término "principio activo", tiene el mismo significado que "substancia activa", "substancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" o "ingrediente farmacéuticamente activo", y se refiere a cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a la composición de la invención para su uso como medicamento, o alternativamente, al uso de la composición de la invención en la elaboración de un medicamento.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a la composición de la invención para su uso para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado, o alternativamente, al uso de la composición de la invención en la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado.

*BIOMATERIAL Y TEJIDO ARTIFICIAL DE LA INVENCION*

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a un biomaterial, de ahora en adelante "biomaterial de la invención", que comprende al menos una partícula magnética de la  
5 invención o la composición de la invención.

El término "biomaterial" empleado en la presente invención hace referencia a materiales aptos para entrar en contacto con los tejidos de un sujeto con propósitos terapéuticos específicos, de diagnóstico, o con propósitos preventivos. Estos materiales deben ser biocompatibles, es decir, no deben causar ninguna respuesta  
10 adversa significativa del organismo vivo tras la interacción del biomaterial con los tejidos y fluidos corporales y, en ocasiones, debe biodegradarse, ya sea química o físicamente, o por una combinación de ambos procesos, para dar origen a componentes no tóxicos. El biomaterial de acuerdo a la presente invención comprende las partículas magnéticas de la invención.

15 Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al biomaterial de la invención para su uso como medicamento, o alternativamente, al uso del biomaterial de la invención en la elaboración de un medicamento.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al biomaterial de la invención para su uso para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la  
20 actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado, o alternativamente, al uso del biomaterial de la invención en la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a un tejido artificial, de ahora en adelante "tejido artificial de la invención", obtenible por un método de obtención del tejido  
25 artificial de la invención que comprende:

- a) añadir una composición que comprende fibrinógeno a una muestra de células aisladas,
- b) añadir un agente antifibrinolítico al producto resultante del paso (a),

- 5
- c) añadir, al menos, un factor de coagulación, una fuente de calcio, trombina, o cualquier combinación de los anteriores al producto resultante del paso (b),
- d) añadir al menos una partícula magnética de la invención o una composición que comprende al menos una partícula magnética de la invención al producto resultante del paso (c).
- e) añadir una composición de un polisacárido al producto resultante del paso (d),
- 10 f) cultivar células aisladas en o sobre el producto resultante del paso (e), y
- g) inducir la nanoestructuración del producto resultante del paso (f).

Las partículas magnéticas que se añaden en el paso (c), en presencia del campo magnético forman columnas, y refuerzan la estructura. Es decir, tras el paso (e) se puede aplicar un campo magnético para formar las estructuras y reforzar de forma adicional la elasticidad del tejido. No es necesario aplicar el campo, pero si se hace se mejora la elasticidad.

15

Por lo tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, después del paso (e) se aplica un campo magnético. Preferiblemente, el campo magnético aplicado es menor de 500 kA/m, más preferiblemente menor de 100 kA/m, y aún más preferiblemente está comprendido entre 10 y 50 kA/m. Aún mucho más preferentemente, está comprendido entre 16 a 48 kA/m.

20

Dicho campo magnético se generará preferentemente en la región donde se sitúa el tejido que contiene partículas magnéticas y se puede producir mediante bobinas por las que circula una corriente eléctrica continua. Preferentemente será un campo magnético uniforme en el espacio en el tejido que contiene partículas magnéticas.

25

En el paso (a) del método de la invención se añade una composición que comprende fibrinógeno a células aisladas, preferiblemente, de un mamífero. Dichas células pueden obtenerse mediante diferentes procedimientos descritos en el estado de la técnica, que pueden depender del tipo celular particular del que se trate. Algunos de estos procedimientos son, por ejemplo, pero sin limitarse, biopsia, procesamiento mecánico, tratamiento enzimático (por ejemplo, pero sin limitarse, con tripsina o

30

colagenasa de tipo I), centrifugación, lisis eritrocitaria, filtración, cultivo en soportes o medios que favorezcan la proliferación selectiva de dicho tipo celular o inmunocitometría. Algunos de estos procedimientos se describen en detalle en los Ejemplos de esta memoria.

- 5 Las células del paso (a) pueden ser células diferenciadas como, por ejemplo, pero sin limitarse, fibroblastos, queratocitos o células musculares lisas, o células no diferenciadas con la capacidad para diferenciarse en dichas células como, por ejemplo, células madre adultas.

En una realización preferida del método de la invención, las células del paso (a) son  
10 fibroblastos o células no diferenciadas con la capacidad para diferenciarse en fibroblastos. Los fibroblastos pueden obtenerse a partir de cualquier tejido u órgano, sin embargo, preferiblemente, los fibroblastos del paso (a) proceden del tejido o del órgano en el que va a emplearse como sustituto el tejido artificial.

La posibilidad de que todos los componentes del tejido artificial sean de origen  
15 autólogo permite que el trasplante de dicho tejido pueda realizarse sin que sea necesaria la inmunosupresión del sujeto transplantado. Sin embargo, los componentes del tejido artificial también puedan ser de origen alogénico, es decir, pueden proceder de un individuo diferente a aquel al que se le va a transplantar el tejido artificial. Incluso la especie de la cual proceden dichos componentes, puede ser diferente;  
20 cuyo caso se dice que su origen es xenogénico. Esto abre la posibilidad de que el tejido artificial esté preparado de antemano cuando se necesite con urgencia, aunque en este caso sí sería recomendable proceder a la inmunosupresión del sujeto al que se trasplante el tejido artificial.

Por lo tanto, en una realización preferida, las células del paso (a) de la invención son  
25 de origen autólogo. No obstante, las células del paso (a) también pueden ser de origen alogénico o xenogénico.

Mediante la adición a las células del paso (a) de los diferentes componentes descritos en los pasos (a)-(d) del método de la invención, y tras dejar reposar el producto resultante del paso (e) en un soporte, se produce la formación de una matriz que  
30 comprende fibrina, el polisacárido y, en el caso correspondiente, la proteína añadida en el paso (d2) si se ha aplicado dicho paso, en la que quedan embebidas dichas

células y sobre la cual y/o en cuyo interior éstas pueden crecer. Preferiblemente, las células del paso (a) crecen en el interior de dicha matriz.

- La formación de una matriz de fibrina tiene lugar por la polimerización del fibrinógeno inducida por trombina. El fibrinógeno es una proteína de elevado peso molecular que se encuentra presente en el plasma sanguíneo. La trombina es una enzima proteolítica que provoca la ruptura de la molécula de fibrinógeno en polipéptidos de bajo peso molecular y en monómeros de fibrina. Dichos monómeros polimerizan en dímeros y posteriormente se unen entre sí mediante enlaces covalentes, por acción del factor XIII, previamente activado por la trombina, y en presencia de iones de calcio.
- 5
- 10 La composición que comprende fibrinógeno del paso (a) puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, plasma sanguíneo. La composición del paso (a) puede asimismo prepararse a partir de un derivado plasmático, como, por ejemplo, pero sin limitarse un crioprecipitado o un concentrado de fibrinógeno. Además de fibrinógeno, la composición del paso (a) puede contener otros factores de coagulación.
- 15 En una realización preferida, la concentración de fibrinógeno en el producto resultante del paso (c) es de entre 0,5 y 10 g/L, opcionalmente entre 1 y 10 g/L. En una realización más preferida, la concentración en el producto resultante del paso (e) es de entre 1 y 4 g/L, opcionalmente entre 2 y 4 g/L. No obstante, una concentración menor o mayor también podría emplearse.
- 20 En una realización preferida, el fibrinógeno de la composición del paso (a) o la composición que comprende fibrinógeno del paso (a) es de origen autólogo. No obstante, el fibrinógeno de la composición del paso (a) o la composición que comprende fibrinógeno del paso (a) también puede ser de origen alogénico o xenogénico.
- 25 En una realización preferida de este primer aspecto de la invención, la composición que contiene fibrinógeno del paso (a) es plasma sanguíneo. En este caso, la polimerización del fibrinógeno puede inducirse mediante la adición en el paso (c) de una fuente de calcio.
- 30 En una realización más preferida de este primer aspecto de la invención, la fuente de calcio del paso (c) es una sal de calcio como, por ejemplo, pero sin limitarse, cloruro cálcico, gluconato cálcico o una combinación de ambas. La concentración de la sal de



calcio deberá ser suficiente para inducir la polimerización del fibrinógeno. En una realización más preferida, la sal de calcio es cloruro cálcico. En una realización aún más preferida, la concentración de cloruro de calcio en el producto resultante del paso (f) es de entre 0,25 y 3 g/L, opcionalmente entre 0,5 y 4 g/L. No obstante, una  
5 concentración menor o mayor también podría emplearse.

El término "factor de coagulación", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un componente, generalmente, una proteína, presente en el plasma sanguíneo y que interviene en la reacción en cadena que hace posible la coagulación. Son trece los factores de coagulación, nombrados con números romanos: I:  
10 fibrinógeno; II: protrombina; III: factor tisular o tromboplastina; IV: calcio; V: proacelerina; VI: factor inactivo o cimógeno; VII: proconvertina; VIII: factor antihemofílico A o factor von Willebrand; IX: factor antihemofílico B o factor de Christmas; X: factor de Stuart-Prower; XI: factor antihemofílico C; XII: Factor Hageman; XIII: Factor estabilizante de la fibrina; XIV: Fitzgerald; XV: Fletcher; XVI:  
15 plaquetas; y XVII: Somocurcio. Preferiblemente, el otro factor de coagulación añadido en el paso (c) del método de la presente invención es el factor XIII.

El polímero de fibrina puede degradarse mediante el proceso denominado fibrinólisis. Durante la fibrinólisis, el plasminógeno es convertido en la enzima activa plasmina, por el activador tisular del plasminógeno; la plasmina se une a la superficie de la fibrina a  
20 través de sus sitios de unión, para producir la degradación del polímero de fibrina. Para evitar la fibrinólisis de la matriz de fibrina, en el paso (b) de la presente invención se añade un agente antifibrinolítico como, por ejemplo, pero sin limitarse, ácido épsilon aminocaproico, ácido tranexámico o aprotinina.

El ácido tranexámico es un producto sintético derivado del aminoácido lisina con gran  
25 afinidad por los sitios de unión de lisina del plasminógeno; bloquea estos sitios y previene la unión del plasminógeno activado a la superficie de fibrina, ejerciendo un efecto antifibrinolítico. El ácido tranexámico tiene la ventaja, frente a otros agentes antifibrinolíticos de origen animal, de que no transmite enfermedades. Por tanto, en una realización preferida, el agente antifibrinolítico es el ácido tranexámico. En una  
30 realización aún más preferida, la concentración de ácido tranexámico en el producto resultante del paso (e) es de entre 0,5 y 2 g/L, preferiblemente entre 1 y 2 g/L. No obstante, una concentración menor o mayor también podría emplearse.

Las matrices de fibrina son muy versátiles, por lo que se han empleado para la elaboración de diferentes tejidos artificiales, sin embargo, la utilización clínica de las mismas se ha visto limitada debido al hecho, fundamentalmente, de su escasa consistencia, su difícil manipulación y su enorme fragilidad. Por ese motivo, en el paso 5 (e) del método de la invención se añade un polisacárido. En general, dicho polisacárido se emplea para aportar resistencia y consistencia al tejido, y es conveniente que sea soluble en el mismo. Ejemplos de polisacáridos que pueden emplearse en el paso (e) del método de la presente invención son pero, sin limitarse, agar-agar, agarosa, alginato, quitosano o carragenatos, o cualquier combinación de los anteriores.

La agarosa es un polisacárido formado por galactosas alfa y beta que se extrae de algas de géneros como *Gellidium* o *Gracillaria*. La agarosa, frente a otros polisacáridos que pueden ser empleados en el paso (e) de la presente invención, tiene la ventaja de que forma una matriz inerte desde el punto de vista inmunológico. Por tanto, en una realización preferida, el polisacárido del paso (e) del método de la invención es agarosa. Existen diferentes tipos de agarosa que varían en sus propiedades físicas y químicas como, por ejemplo, la temperatura de gelificación, la fuerza del gel y/o la porosidad. Preferiblemente, la agarosa del paso (e) del método de la invención es una agarosa con un punto de fusión bajo, es decir, una agarosa que se repolimerice y solidifique a una temperatura, preferiblemente, menor de 65 °C y, más preferiblemente, menor de 40°C; de esta manera puede emplearse para preparar el tejido a temperaturas muy bajas, minimizando la probabilidad de muerte celular. En una realización más preferida, la agarosa empleada en el paso (e) del método de la invención es de tipo VII. En una realización aún más preferida, la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, en el producto resultante del paso (e) está a una concentración, ventajosamente, de entre 0,1 y 6 g/L, opcionalmente entre 0,2 y 6 g/L, preferiblemente, de entre 0,15 y 3 g/L, opcionalmente entre 0,3 y 3 g/L y más preferiblemente, de entre 0,25 y 2 g/L, opcionalmente entre 0,5 y 2 g/L. No obstante, una concentración menor o mayor también podría emplearse.

En una realización preferida, el método de la invención comprende un paso adicional entre el paso (b) y el paso (c) (paso (b2)) en el que se añade una proteína. Ejemplos de proteínas que pueden emplearse en el paso (b2) del método de la presente invención son pero, sin limitarse, fibronectina, laminina, colágeno tipo VII o entactina, o cualquier combinación de los anteriores. Estas proteínas forman parte de la matriz

extracelular del tejido conjuntivo de manera natural en los tejidos, por lo que las células embebidas en un tejido artificial obtenido mediante el método de la invención, encuentran un micro-ambiente más parecido al fisiológico, mejorando la adhesión, la diferenciación y/o la supervivencia de dichas células.

5 En una forma preferida de realización, la proteína que se añade en el paso (b2) es la fibronectina. La fibronectina es una glicoproteína presente en la matriz extracelular (MEC) de la mayoría de los tejidos celulares animales desempeñando un importante papel en la adhesión de las células a la matriz. En una realización más preferida, la proteína añadida entre el paso (b) y el paso (c) del método de la invención es  
10 fibronectina. El objeto de esta adición es la de favorecer la adhesión de las células del paso (f) al producto resultante del paso (e). Por ejemplo, cuando el método de la invención se emplea para preparar un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial, la adición de fibronectina minimiza el desprendimiento de las células del epitelio corneal añadidas en el paso (f) lo que supone una importante ventaja con respecto a  
15 otros métodos descritos en el estado de la técnica. En una realización aún más preferida, la concentración de fibronectina en el producto resultante del paso (e) es de entre 0,25 y 1g/L, opcionalmente entre 0,5 y 1 g/L. No obstante, una concentración menor o mayor también podría emplearse.

En una forma preferida de realización, el método de la invención comprende un paso  
20 adicional (paso e2) entre los pasos (e) y (f) que comprende la adición de una composición que comprende una proteína al producto resultante del paso (e). Ejemplos de proteínas que pueden emplearse en el paso (f) del método de la presente invención son pero, sin limitarse, colágeno, reticulina o elastina. La adición de una proteína entre el paso (e) y el paso (f) da lugar a tejidos que presentan una mayor  
25 densidad fibrilar a nivel del estroma, un mejor comportamiento viscolástico y un esfuerzo umbral creciente. En una forma de realización aún más preferida, la proteína que se añade en el paso (e2) es colágeno.

Además, la adición de dichas proteínas en el paso (e2) del método de la invención mejora las propiedades físicas (reológicas, mecánicas o biomecánicas) del tejido  
30 artificial obtenido. En los ejemplos de esta memoria se demuestra que en tejidos artificiales que comprenden fibrina, agarosa y colágeno, empleando concentraciones crecientes de colágeno mejora el comportamiento viscoelástico, lo que se pone de

manifiesto por un aumento del esfuerzo umbral dependiente de la concentración de colágeno.

Las principales propiedades reológicas de un material sólido o semisólido son la viscosidad y la elasticidad. La viscosidad es la resistencia que ofrece un fluido a la deformación tangencial, y sería equivalente a la consistencia o la rigidez. La elasticidad es la propiedad mecánica de ciertos materiales de sufrir deformaciones reversibles cuando se encuentran sujetos a la acción de fuerzas exteriores, y de recuperar la forma original cuando cesan estas fuerzas exteriores. El análisis de estos parámetros se realiza mediante reometría, técnica física que utiliza instrumentos denominados reómetros.

El esfuerzo umbral es la fuerza mecánica necesaria para provocar una deformación irreversible en un sólido o un fluido. Normalmente, todos los materiales presentan una región elástica, en la que el esfuerzo aplicado provoca una deformación totalmente reversible cuando cesa el esfuerzo. Si ese esfuerzo supera un límite (límite elástico), la deformación pasa a ser irreversible, entrando en una región plástica. Finalmente, si el esfuerzo supera el módulo plástico, el material se rompe (punto de fractura).

El colágeno es una proteína de fácil disponibilidad en la naturaleza y que biológicamente se caracteriza por su baja inmunidad y elevada actividad tisular. El colágeno forma las fibras colágenas, que son flexibles, pero ofrecen gran resistencia a la tracción. Los tejidos artificiales de la presente invención, que pueden contener fibrina, agarosa y colágeno presentan una mayor densidad fibrilar a nivel del estroma, un mejor comportamiento viscolástico y presentarán un esfuerzo umbral creciente según se aumenta la concentración de colágeno, y más elevado que los tejidos artificiales de colágeno. Por tanto, en una realización preferida la proteína añadida en el paso (f) es colágeno.

En una realización preferida, el colágeno añadido en el paso (e2) se selecciona de la lista que comprende: colágeno tipo I, colágeno tipo II, colágeno tipo III, colágeno tipo IV, colágeno tipo V, colágeno tipo VI, colágeno tipo VII, colágeno tipo VIII, colágeno tipo IX, colágeno tipo X, colágeno tipo XI, colágeno tipo XII, colágeno tipo XIII o cualquier combinación de los anteriores. En una realización más preferida, el colágeno añadido en el paso (f) se selecciona de la lista que comprende: colágeno tipo I, colágeno tipo II, colágeno tipo III, colágeno tipo IV, colágeno tipo V, colágeno tipo IX o cualquier combinación de los anteriores. La selección de un tipo particular de colágeno

en el paso (f) del método de la invención depende del tejido artificial que se desee preparar y se realiza en función de las características de cada colágeno que son conocidas en el estado de la técnica.

5 Por ejemplo, la función principal del colágeno tipo I es la de resistencia al estiramiento, y se encuentra abundantemente en la dermis, el hueso, el tendón y la córnea. Así, en la presente invención se demuestra que la adición de colágeno tipo I en el paso (f) otorga excelentes propiedades al tejido artificial cuando se quiere preparar, por ejemplo, pero sin limitarnos un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial. Por tanto, en una realización preferida el colágeno es colágeno tipo I.

10 En una realización aún más preferida, el colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, en el producto resultante del paso (e) está a una concentración, ventajosamente, de entre 0,5 y 5 g/L, preferiblemente, de entre 1,8 y 3,7 g/L, y más preferiblemente, de entre 2,5 y 3 g/L. No obstante, una concentración menor o mayor también podría emplearse.

15 En una realización particular, el colágeno utilizado es un atelocolágeno, es decir un colágeno del cual se han eliminado las regiones terminales de estructura no helicoidal denominadas telopéptidos. Estos telopéptidos pueden hacer que el colágeno que sea insoluble y son portadores de los principales determinantes antigénicos del colágeno. El atelocolágeno se obtiene, por ejemplo, mediante tratamiento proteásico con pepsina.

20 Dependiendo de las concentraciones de fibrinógeno que se use en la etapa (a), de la concentración de polisacárido que se use en la etapa (e) y, en el caso de que es aplique un paso (e2), de la concentración de colágeno que se use en la etapa (e2), el tejido artificial resultante de la etapa (f) puede comprender concentraciones variables de los dos/tres componentes.

25 En una realización preferida, en el producto resultante del paso (f), la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,1 y 6 g/L. Si se ha incluido un paso (e2), la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 0,5 y 5 g/L.

30 En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (f), la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente,

agarosa de tipo VII, es de entre 0,15 y 3 g/L. Si se ha incluido un paso (e2), la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 0,5 y 5 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (f), la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente,  
5 agarosa de tipo VII, es de entre 0,25 y 2 g/L. Si se ha incluido un paso (e2), la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 0,5 y 5 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (e), la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,1 y 6 g/L. Si se ha incluido un paso  
10 (e2), la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 1,8 y 3,7 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (f), la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,15 y 3 g/L. Si se ha incluido un paso (e2), la  
15 concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 1,8 y 3,7 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (f), la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,25 y 2 g/L. Si se ha incluido un paso (e2), la  
concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 1,8 y 3,7 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (f), la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,1 y 6 g/L. Si se ha incluido un paso (e2), la  
20 concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 2,5 y 3 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (f), la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,15 y 3 g/L. Si se ha incluido un paso (e2), la  
25 concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 2,5 y 3 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (f), la concentración de fibrinógeno es de entre 0,5 y 10 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,25 y 2 g/L. Si se ha incluido un paso (e2), la  
30 concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 2,5 y 3 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (f), la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,1 y 6 g/L. Si se ha incluido un paso (e2), la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 0,5 y 5 g/L.

- 5 En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (f), la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,15 y 3 g/L. Si se ha incluido un paso (e2), la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 0,5 y 5 g/L.

- 10 En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (f), la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,25 y 2 g/L. Si se ha incluido un paso (e2), la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 0,5 y 5 g/L.

- 15 En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (f), la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,1 y 6 g/L. Si se ha incluido un paso (e2), la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 1,8 y 3,7 g/L.

- 20 En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (f), la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,15 y 3 g/L. Si se ha incluido un paso (e2), la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 1,8 y 3,7 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (f), la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,25 y 2 g/L. Si se ha incluido un paso (e2), la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 1,8 y 3,7 g/L.

- 25 En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (f), la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente, agarosa de tipo VII, es de entre 0,1 y 6 g/L. Si se ha incluido un paso (e2), la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 2,5 y 3 g/L.

- 30 En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (f), la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente,

agarosa de tipo VII, es de entre 0,15 y 3 g/L. Si se ha incluido un paso (e2), la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 2,5 y 3 g/L.

En otra realización preferida, en el producto resultante del paso (f), la concentración de fibrinógeno es de entre 1 y 4 g/L, la concentración de la agarosa, preferiblemente,  
5 agarosa de tipo VII, es de entre 0,25 y 2 g/L. Si se ha incluido un paso (e2), la concentración del colágeno, preferiblemente, colágeno tipo I, es de entre 2,5 y 3 g/L.

Mediante la adición a las células del paso (a) de los diferentes componentes descritos en los pasos (a)-(e) del método de la invención, y tras dejar reposar el producto resultante del paso (f) en un soporte, se produce la formación de una matriz que  
10 comprende fibrina, las partículas de la invención, el polisacárido y, en el caso de que se haya incluido la etapa (e2), la proteína añadida en dicho paso, en la que quedan embebidas dichas células y sobre la cual y/o en cuyo interior éstas pueden crecer. Preferiblemente, las células del paso (a) crecen en el interior de dicha matriz.

Una vez realizados los pasos (a)-(e) del método de la invención, el producto resultante del paso (e) se deja reposar en un soporte para que se produzca la formación de la  
15 matriz que comprende la fibrina, el polisacárido y, dependiendo de si se ha llevado a cabo un paso (b2), de la proteína añadida en dicho paso, y que tiene embebidas las células del paso (a). Soportes que pueden ser empleados son, por ejemplo, pero sin limitarse, placas de cultivo tisular o insertos porosos de cultivo celular.  
20 Preferiblemente, dichos soportes estarán en condiciones de esterilidad.

El paso (f) del método de la invención consiste en cultivar células aisladas, preferiblemente, de un mamífero, en o sobre el producto resultante del paso (f). Dichas células pueden obtenerse mediante diferentes procedimientos descritos en el estado de la técnica y que pueden depender del tipo celular particular del que se trate.  
25 Algunos de estos procedimientos son, por ejemplo, pero sin limitarse, biopsia, procesado mecánico, tratamiento enzimático (por ejemplo, pero sin limitarse, con tripsina o colagenasa de tipo I), centrifugación, lisis eritrocitaria, filtración, cultivo en soportes o medios que favorezcan la proliferación selectiva de dicho tipo celular o inmunocitometría. Algunos de estos procedimientos se describen en detalle en los  
30 Ejemplos de esta invención.



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

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

10 Preferiblemente, los células epiteliales del paso (f) proceden del tejido o del órgano en el que va a emplearse como sustituto el tejido artificial. Por ejemplo, cuando el método de la invención se emplea para preparar un tejido sustituto de piel o una piel artificial, las células epiteliales proceden, preferiblemente, de la epidermis de la piel, es decir, son queratinocitos; cuando se emplea para preparar una tejido sustituto de vejiga o una vejiga artificial, las células epiteliales proceden, preferiblemente, del epitelio de la vejiga o urotelio; cuando se emplea para preparar un tejido sustituto de uretra o una uretra artificial las células epiteliales proceden, preferiblemente, del epitelio de la uretra; cuando se emplea para preparar un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial preferiblemente, las células epiteliales son células del epitelio corneal; cuando se emplea para preparar un tejido sustituto de mucosa oral, preferiblemente, las células epiteliales proceden, preferiblemente, del epitelio de la  
20 mucosa oral.

Sin embargo, las células epiteliales del paso (f) también pueden obtenerse a partir de un tejido u órgano distinto del tejido o del órgano en el que va a emplearse como sustituto el tejido artificial. Por ejemplo, cuando el método de la invención se emplea para preparar un tejido sustituto de piel o una piel artificial, un tejido sustituto de vejiga o una vejiga artificial, un tejido sustituto de uretra o una uretra artificial, o un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial las células epiteliales del paso (f) pueden ser células del epitelio de la mucosa oral. O, por ejemplo, cuando el método de la invención se emplea para preparar un tejido sustituto de vejiga o una vejiga artificial, o cuando se emplea para preparar un tejido sustituto de uretra o una uretra artificial, las  
25 células epiteliales pueden ser queratinocitos.  
30

Uno de los problemas que se asocian a la generación de tejido artificial en laboratorio es la obtención de un número significativo de células diferenciadas, por lo que con frecuencia, se considera como una fuente alternativa el uso de células madre, con

capacidad para diferenciarse a dichas células. Se entiende por "célula madre" aquella que tiene una elevada capacidad para dividirse y diferenciarse morfológica y funcionalmente en distintos tipos de células más especializadas. Durante el proceso de diferenciación, una célula indiferenciada modifica su fenotipo y morfología para  
5 convertirse en una célula diferenciada, con una estructura y función especializada.

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

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

El cordón umbilical constituye una interesante fuente de células madre adultas, debido a que, a diferencia de las células madre adultas obtenidas de otras fuentes; (a) su  
25 método de obtención no es invasivo ni doloroso; y (b) su capacidad proliferativa y su potencial de diferenciación no disminuye como consecuencia del proceso de envejecimiento. Entre las diferentes fuentes de células madre del cordón umbilical destacan las llamadas células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical, por: (a) su gran capacidad de proliferación y a su rapidez de expansión en cultivo; y (b)  
30 la baja expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I y ausencia de expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II, lo que las convierte en buenas candidatas para la terapia celular alogénica.

Por tanto, en otra realización preferida, las células del paso (f) son células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical. Estas células expresan en su superficie diversos marcadores característicos de las células mesenquimales como, por ejemplo, SH2, SH3, CD10, CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105 o  
5 CD166, y son negativos para marcadores del linaje hematopoyético, como por ejemplo, CD31, CD34, CD38, CD40 o CD45. Las células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical pueden diferenciarse, por ejemplo, a condroblastos, osteoblastos, adipocitos, precursores neurales, cardiomiocitos, células del músculo esquelético, células endoteliales o hepatocitos.

10 Las células madre adultas pueden ser caracterizadas mediante la identificación de proteínas de superficie y/o intracelulares, genes, y/u otros marcadores indicativos de su estado indiferenciado, mediante diferentes procedimientos que son conocidos en el estado de la técnica como, por ejemplo, pero sin limitarse, inmunocitometría, análisis inmunocitoquímico, análisis por *northern blot*, RT-PCR, análisis de expresión génica  
15 en *microarrays*, estudios proteómicos o análisis por *differential display*.

Las células madre pueden ser inducidas a diferenciarse *in vitro* para dar lugar a células que expresen, al menos, una o más características propias de células diferenciadas. Ejemplos de células diferenciadas a las que pueden diferenciarse las células madre, pero sin limitarse, son fibroblasto, queratinocito, célula del urotelio,  
20 célula del epitelio de la uretra, célula del epitelio corneal, célula del epitelio de la mucosa oral, condroblasto, osteoblasto, adipocito o neurona. En una realización preferida de la invención, la célula diferenciada a partir de la célula madre multipotente de la invención expresa una o más características propias de una célula diferenciada seleccionada de la lista que comprende: fibroblasto, queratinocito, célula del urotelio,  
25 célula del epitelio de la uretra, célula del epitelio corneal, célula del epitelio de la mucosa oral, condroblasto, osteoblasto, adipocito o neurona.

Las células diferenciadas pueden ser caracterizadas mediante la identificación de proteínas de superficie y/o intracelulares, genes, y/u otros marcadores indicativos de su estado diferenciado, mediante diferentes procedimientos que son conocidos en el estado de la técnica como, por ejemplo, pero sin limitarse, inmunocitometría, análisis  
30 inmunocitoquímico, análisis por *northern blot*, RT-PCR, análisis de expresión génica en *microarrays*, estudios proteómicos o análisis por *differential display*.

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

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

Las células del paso (f) se dejan proliferar hasta que alcanzan un número adecuado hasta que alcanzan, típicamente, al menos, un 70% de confluencia, ventajosamente, al menos, un 80% de confluencia, preferiblemente, al menos, un 90% de confluencia, 10 más preferiblemente, al menos, un 95% de confluencia y, aún más preferiblemente, al menos, un 100% de confluencia. Durante el tiempo que las células se mantienen en cultivo, el medio de cultivo en el que se encuentran puede ser parcial o totalmente reemplazado por medio nuevo para reemplazar ingredientes agotados y eliminar metabolitos y catabolitos potencialmente dañinos.

15 Para la correcta diferenciación de algunos tipos celulares puede ser necesario un paso adicional. Por ejemplo, en el caso de las células del epitelio de la mucosa oral, los queratinocitos o las células del epitelio corneal, puede ser necesario exponer la superficie epitelial al aire para promover la correcta estratificación y maduración del epitelio manteniendo la matriz que comprende las células del paso (a) sumergida en 20 medio de cultivo (técnica aire líquido).

Por tanto, en una realización preferida, el método de la invención, además de los pasos (a)-(g) descritos anteriormente comprende un paso adicional en el que el producto resultante del paso (f) se expone al aire. En general, el método de la invención incluye este paso cuando se emplea para obtener un tejido artificial que 25 sirva para reemplazar a un tejido natural cuyo epitelio se encuentra expuesto normalmente al contacto con el aire como, por ejemplo, pero sin limitarnos, la piel, la córnea, la mucosa oral, la uretra o la vagina. Preferiblemente, este paso se realiza cuando se prepara un tejido sustituto de piel o una piel artificial, o cuando se prepara un tejido sustituto de córnea o una córnea artificial, o cuando se prepara un tejido 30 sustituto de mucosa oral o una mucosa oral artificial.

Una de las innovaciones más importantes del método de la invención consiste en la existencia de un paso (g) en el que se induce la nanoestructuración del producto

resultante del paso (f). La expresión "nanoestructuración", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una modificación estructural consistente en la generación de enlaces de tamaño inferior a una micra entre las fibras de fibrina y entre éstas y las moléculas de agarosa. Este proceso de nanoestructuración permite obtener

5 tejidos artificiales que muestran de forma inesperada propiedades ventajosas con respecto a los biomateriales no estructurados. En concreto, los biomateriales sometidos a un proceso de nanoestructuración según la presente invención presentan (i) una mejora significativa de las propiedades biomecánicas del tejido, lo que permite la manipulación del tejido nanoestructurado y supone una mejora sustancial y no

10 esperada de las propiedades reológicas del biomaterial, caracterizada como una mayor resistencia y una mayor elasticidad; (ii) una mejora sustancial de la manipulabilidad del tejido nanoestructurado, lo cual permitió su manipulación quirúrgica, la sutura al lecho receptor y el implante en animales de experimentación, (iii) una mejora significativa de la transparencia de los tejidos sometidos a nanoestructuración, lo que

15 no es en absoluto previsible puesto que los tejidos nanoestructurados son más densos y más pobres en contenido de agua que los tejidos no nanoestructurados y (iv) una mejor resultado clínico una vez implantados en animales de laboratorio relacionado, por un lado, con la mayor eficacia del implante clínico debido a las adecuadas propiedades biomecánicas del biomaterial y, por otro lado, con el hecho de que los

20 biomateriales sometidos a nanoestructuración presentan una mayor densidad de fibras por  $\text{mm}^2$  y, por tanto, presentan más lenta remodelación por parte del organismo receptor.

En una realización preferida, la inducción de la nanoestructuración del paso (g) comprende la deshidratación y/o la compresión mecánica del producto resultante del

25 paso (f). El objetivo del paso (g) es generar una modificación estructural entre las fibras de fibrina y las moléculas de agarosa del tejido artificial para alcanzar niveles óptimos de consistencia y elasticidad, que no se obtienen mediante otros métodos descritos en el estado de la técnica. El resultado final es una modificación irreversible de las fibras que genera unas cualidades biomecánicas muy favorables para la

30 manipulación quirúrgica y el implante clínico.

El término "deshidratación" se refiere a una eliminación parcial y/o total del fluido intersticial del producto resultante del paso (f). Por ejemplo, la cantidad de fluido intersticial eliminado del producto resultante del paso (f) puede ser de, al menos, un 50%, al menos, un 60%, al menos, un 70%, al menos, un 80%, al menos, un 90% o, al

menos, un 99% del fluido intersticial contenido originalmente en el producto resultante del paso (f).

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

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

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

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

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

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

El tiempo requerido para la deshidratación dependerá del procedimiento o procedimientos empleados, y puede ser determinado con facilidad por un experto en la materia. La idoneidad del tejido artificial obtenido mediante la aplicación de un

determinado procedimiento de deshidratación durante un determinado periodo de tiempo puede comprobarse mediante diversos métodos de evaluación conocidos en el estado de la técnica como, por ejemplo, pero sin limitarse, los descritos en los ejemplos de esta memoria.

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

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

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

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

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

artificial tubular.

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

En la figura 1 de la presente memoria se muestra un esquema no limitativo de cómo  
10 puede realizarse la nanoestructuración del producto resultante del paso (f) mediante su deshidratación y compresión. En dicho esquema puede observarse como la nanoestructuración puede obtenerse situando el producto resultante del paso (f) entre dos papeles de filtro estéril, y colocando sobre el mismo un peso de aproximadamente 250 g (equivalente a aproximadamente  $2.000 \text{ N/m}^2$ ) sobre una  
15 superficie plana de vidrio estéril durante aproximadamente 10 minutos; entre el tejido y el papel de filtro sobre el que se coloca el peso se puede disponer un material poroso para evitar que el producto resultante del paso (f) se adhiriera al papel de filtro. El material empleado para evitar la adherencia debe ser poroso para permitir la salida de agua desde el tejido hacia el agente deshidratante: dicho material poroso  
20 empleado para evitar la adherencia puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, una membrana de policarbonato, nylon, vidrio, cerámica o metal perforado.

En una realización preferida, la compresión del producto resultante del paso (f) comprende la aplicación de una presión sobre el mismo. Preferiblemente, la magnitud de la presión es de entre  $1.000$  y  $5.000 \text{ N/m}^2$ , más preferiblemente, de entre  $1.500$  y  $2.500 \text{ N/m}^2$  y, aún más preferiblemente, de aproximadamente  $2.000 \text{ N/m}^2$ . La  
25 aplicación de dicha presión puede hacerse manual, automática o semi-automáticamente. El tiempo que se necesita ejercer la presión depende de la magnitud de la presión aplicada y puede ser determinado con facilidad por un experto en la materia. Resulta evidente que cuanto mayor sea la presión menor será el tiempo  
30 necesario para obtener un tejido artificial con las características apropiadas. La idoneidad del tejido artificial obtenido mediante la aplicación de una determinada magnitud de presión durante un determinado periodo de tiempo puede comprobarse



mediante diversos métodos de evaluación conocidos en el estado de la técnica como, por ejemplo, pero sin limitarse, los descritos en los ejemplos de esta memoria.

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

#### Tejido artificial de la invención

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

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

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

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

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

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

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

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

#### 5 *USOS DEL BIOMATERIAL Y DEL TEJIDO ARTIFICIAL DE LA INVENCION EN LA EVALUACION DE PRODUCTOS FARMACOLOGICOS O QUIMICOS*

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

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

#### 25 *USOS TERAPÉUTICOS DEL BIOMATERIAL Y DE LOS TEJIDOS ARTIFICIALES DE LA INVENCION*

Una enfermedad infecciosa, inflamatoria, genética o degenerativa, un daño físico o químico, o una interrupción del flujo sanguíneo, pueden dar lugar a una pérdida de células de un tejido o un órgano. Esta pérdida celular conllevaría una alteración de la función normal de dicho tejido u órgano; y por consiguiente, conduciría al desarrollo de  
30 enfermedades o secuelas físicas que merman la calidad de vida de la persona. Por tanto, es importante tratar de regenerar o y restablecer la función normal de dichos

tejidos u órganos. El tejido o el órgano dañado pueden ser sustituidos por un tejido u órgano nuevo que haya sido fabricado en el laboratorio mediante técnicas de ingeniería tisular. El objetivo de la ingeniería tisular es la construcción de tejidos biológicos artificiales y la utilización con fines médicos de los mismos para restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de tejidos y órganos enfermos. La utilidad terapéutica de este tipo de técnicas es prácticamente ilimitada con aplicaciones en todos los campos. El empleo de las técnicas de ingeniería tisular permite disminuir las listas de espera de tejidos y órganos, con la consiguiente disminución de la morbi-mortalidad de la enfermedad en el receptor. Lógicamente, también tiene como consecuencia una disminución de la morbi-mortalidad en los donantes de órganos. Por otra parte, existen numerosas ventajas asociadas a la utilización de células o tejidos autólogos en la ingeniería tisular, destacando: (a) una reducción significativa del número de infecciones del donante al receptor por agentes infecciosos; y (b) la ausencia de rechazo inmune injerto contra huésped, por lo que el paciente no tiene necesidad de tomar tratamiento inmunosupresor, evitándose los efectos secundarios y los problemas asociados a la inmunodepresión.

Por tanto, un **séptimo aspecto** de la invención se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado.

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

Una realización preferida de este séptimo aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad

funcional de una piel. Una realización más preferida refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una piel enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una  
5 úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación o una malformación congénita.

Una realización preferida de este séptimo aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una vejiga. Una realización más preferida refiere al uso del tejido artificial  
10 de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una vejiga enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (como por ejemplo, pero sin limitarse, una extrofia vesical, una extrofia de cloaca o una  
15 microvejiga), una vejiga neurógena, una incontinencia urinaria, una disfunción vesical, una infección o una litiasis vesical.

Una realización preferida de este séptimo aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una uretra. Una realización más preferida refiere al uso del tejido artificial  
20 de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una uretra enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (como por ejemplo, pero sin limitarse, un hispospadias o un epispadias) o una estenosis.

25 Una realización preferida de este séptimo aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una córnea. Una realización más preferida refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una córnea enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una  
30 lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una úlcera corneal, un queratocono, un queratoglobo, un descematocele, un traumatismo, una causticación, una insuficiencia límbica, una queratitis atrófica, una distrofia corneal,

una queratopatía primaria o secundaria, una infección, un leucoma, una queratopatía bullosa, un fallo endotelial corneal o una neoplasia benigna o maligna.

Una realización preferida de este séptimo aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o  
5 sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una mucosa, preferiblemente de una mucosa oral. Una realización aún más preferida se refiere al uso del tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una mucosa oral enferma o dañada como consecuencia de una  
10 disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación, una malformación congénita, una pérdida de sustancia o una enfermedad periodontal. En una forma preferida de realización, el tejido que se usa para incrementar, restaurar o sustituir parcial o  
15 totalmente la actividad funcional de una mucosa es un tejido que ha sido sometido a un paso (e2) de adición de una proteína entre el paso (e) y el paso (f). En una forma de realización aún más preferida, dicho paso se lleva a cabo mediante la adición de una composición que comprende colágeno al material obtenido en la etapa (e) tal y como se indicó en detalle anteriormente.

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

Dicho medicamento es un medicamento de terapia celular somática. Se entiende por "terapia celular somática" la utilización de células somáticas vivas, autólogas, alogénicas o xenogénicas, cuyas características biológicas han sido alteradas sustancialmente como resultado de su manipulación, para obtener un efecto  
25 terapéutico, de diagnóstico o preventivo, por medios metabólicos, farmacológicos o inmunológicos. Entre los medicamentos de terapia celular somática se encuentran, por ejemplo, pero sin limitarse: células manipuladas para modificar sus propiedades inmunológicas, metabólicas o funcionales de otro tipo en aspectos cualitativos o cuantitativos; células clasificadas, seleccionadas y manipuladas, que se someten  
30 posteriormente a un proceso de fabricación con el fin de obtener el producto terminado; células manipuladas y combinadas con componentes no celulares (por ejemplo, matrices o productos sanitarios biológicos o inertes) que ejercen la acción pretendida en principio en el producto acabado; derivados de células autólogas

expresadas *ex vivo (in vitro)* en condiciones específicas de cultivo; o células modificadas genéticamente o sometidas a otro tipo de manipulación para expresar propiedades funcionales homólogas o no homólogas anteriormente no expresadas.

Un **séptimo aspecto** de la presente invención se refiere al uso del tejido artificial de la  
5 invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o  
sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano. En una  
realización preferida, el tejido o el órgano dañado se seleccionan de la lista que  
comprende: piel, vejiga, uretra, córnea, mucosa, conjuntiva, pared abdominal,  
conjuntiva, tímpano, faringe, laringe, intestino, peritoneo, ligamento, tendón, hueso,  
10 meninge o vagina.

Una realización preferida de este séptimo aspecto se refiere al uso del tejido artificial  
de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o  
sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o  
dañado como consecuencia de una enfermedad infecciosa, inflamatoria, genética o  
15 degenerativa, un daño físico o químico o una interrupción del flujo sanguíneo.

Una realización más preferida de este séptimo aspecto se refiere al uso del tejido  
artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar,  
restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una piel. Una  
realización aún más preferida se refiere al uso del tejido artificial de la invención para  
20 la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o  
totalmente la actividad funcional de una piel enferma o dañada como consecuencia de  
una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende:  
una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una  
infección, una contusión, un traumatismo, una causticación o una malformación  
25 congénita.

Una realización más preferida de este séptimo aspecto se refiere al uso del tejido  
artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar,  
restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una vejiga. Una  
realización aún más preferida de este séptimo aspecto se refiere al uso del tejido  
30 artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar,  
restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una vejiga enferma o  
dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad  
seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una

infección, un traumatismo, una malformación congénita (como por ejemplo, pero sin limitarse, una extrofia vesical, una extrofia de cloaca o una microvejiga), una vejiga neurógena, una incontinencia urinaria, una disfunción vesical, una infección o una litiasis vesical.

5 Una realización más preferida de este séptimo aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una uretra. Una realización aún más preferida de este séptimo aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar,  
10 restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una uretra enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (como por ejemplo, pero sin limitarse, un hispospadias o un epispadias) o una estenosis.

15 Una realización más preferida de este séptimo aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una córnea. Una realización aún más preferida de este séptimo aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar,  
20 restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una córnea enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una úlcera corneal, un queratocono, un queratoglobo, un descematocele, un traumatismo, una causticación, una insuficiencia límbica, una queratitis atrófica, una distrofia corneal, una queratopatía primaria o  
25 secundaria, una infección, un leucoma, una queratopatía bullosa, un fallo endotelial corneal o una neoplasia benigna o maligna.

Una realización más preferida de este séptimo aspecto se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una mucosa,  
30 preferiblemente una mucosa oral. Una realización aún más preferida se refiere al uso del tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una mucosa oral enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o

una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación, una malformación congénita, una pérdida de sustancia o una enfermedad periodontal. En una forma preferida de realización, el tejido que se para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una mucosa es un tejido que ha sido sometido a un paso (e2) de adición de una proteína entre el paso (d) y el paso (f). En una forma de realización aún más preferida, dicho paso se lleva a cabo mediante la adición de una composición que comprende colágeno al material obtenido en la etapa (e) tal y como se indicó en detalle anteriormente.

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

Una realización preferida de este octavo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para su uso en terapia celular somática.

Una realización más preferida de este octavo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano.

Una realización preferida de este octavo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado como consecuencia de una enfermedad infecciosa, inflamatoria, genética o degenerativa, un daño físico o químico o una interrupción del flujo sanguíneo.

Una realización más preferida de este octavo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una piel. Una realización aún más preferida se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una piel enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista



que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación o una malformación congénita.

5 Una realización más preferida de este octavo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una vejiga. Una realización aún más preferida se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una vejiga enferma o dañada como  
10 consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (como por ejemplo, pero sin limitarse, una extrofia vesical, una extrofia de cloaca o una microvejiga), una vejiga neurógena, una incontinencia urinaria, una disfunción vesical, una infección o una litiasis vesical.

15 Una realización más preferida de este sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una uretra. Una realización aún más preferida se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una uretra enferma o dañada como  
20 consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita (como por ejemplo, pero sin limitarse, un hispospadias o un epispadias) o una estenosis.

25 Una realización más preferida de este sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una córnea. Una realización aún más preferida se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una córnea enferma o dañada como  
30 consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una úlcera corneal, un queratocono, un queratogloblo, un descematocele, un traumatismo, una causticación, una insuficiencia límbica, una

queratitis atrófica, una distrofia corneal, una queratopatía primaria o secundaria, una infección, un leucoma, una queratopatía bullosa, un fallo endotelial corneal o una neoplasia benigna o maligna.

Una realización más preferida de este octavo aspecto se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una mucosa, preferiblemente una mucosa oral. Una realización aún más preferida se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una mucosa oral enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación, una malformación congénita, una pérdida de sustancia o una enfermedad periodontal. En una forma preferida de realización la composición farmacéutica que comprende el tejido artificial de la invención para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de una mucosa o de una mucosa oral es un tejido que ha sido sometido a un paso (e2) de adición de una proteína entre el paso (e) y el paso (f). En una forma de realización aún más preferida, dicho paso se lleva a cabo mediante la adición de una composición que comprende colágeno al material obtenido en la etapa (e) tal y como se indicó en detalle anteriormente.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende el tejido artificial de la invención, y además, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende el tejido artificial de la invención, y además, otro principio activo. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende el tejido artificial de la invención y, además, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, otro principio activo.

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

*KIT O DISPOSITIVO DE LA INVENCION*

Un **noveno aspecto** de la invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante "kit o dispositivo de la invención", que comprende:

- 5 a) las partículas con multidominio magnético, la composición, el biomaterial o el tejido artificial de la invención, y
- b) un elemento capaz de generar un campo magnético.

El elemento generador del campo magnético puede ser, pero sin limitarnos, un solenoide, un toroide, o una espira, que generan en ciertas regiones del espacio un campo magnético cuando circula por ellos una corriente eléctrica. Elementos generadores de un campo magnético son conocidos en el estado del arte.

Preferiblemente, el campo magnético aplicado es menor de 500 kA/m, más preferiblemente menor de 100 kA/m, y aún más preferiblemente estará comprendido entre 10 y 50 kA/m. En una realización aún mucho más preferida, el campo magnético es de entre 16 y 48 kA/m.

Dicho campo magnético se generará preferentemente en la región donde se sitúa el tejido que contiene partículas magnéticas y se puede producir mediante bobinas por las que circula una corriente eléctrica continua. Preferentemente será un campo magnético uniforme en el espacio en el tejido que contiene partículas magnéticas.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el tiempo de aplicación del campo magnético oscila entre 2 minutos y 1 hora, más preferiblemente entre 3 y 20 minutos, y aún más preferiblemente es de aproximadamente 5 minutos.

25 En otra realización preferida, el campo magnético se mantiene durante el cultivo de las células.

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

## EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

### Ejemplo 1. Preparación de un tejido magnético.

En este ejemplo utilizamos para elaborar los tejidos biológicos partículas de MagNP-OH (Nanomyp, Spain), que poseen un diámetro de 100 nm, y están constituidas por un núcleo de magnetita ( $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ ) y recubiertas por una matriz polimérica de metil metacrilato-co.hidroxi etil metacrilato-co-etilen glicol dimetacrilato (MMA-co-HEMA-co-EGDMA). Las nanopartículas de MagNP-OH se encontraban previamente en una suspensión acuosa estabilizada con un tensioactivo. Con la finalidad de eliminarlo se procedió a realizar 5 lavados mediante: centrifugado a 15000 g durante 30 minutos cada uno, después se desechó el sobrenadante; posteriormente se agregó agua bidestilada para redispersar las partículas; después se sustituyó el agua por etanol al 70% y se dejaron las nanopartículas en esa solución durante 12 horas para su esterilización. Finalmente, se eliminó el etanol y las nanopartículas se redispersaron en un medio de cultivo (Medio de Eagle Modificado de Dupleccos, DMEM).

Se utilizó una mezcla de fibrina y agarosa como matriz biopolimérica y fibroblastos gingivales humanos para generar una mucosa oral artificial. Para ello se siguieron los siguientes pasos.

- i) Se tomaron 3,8 mL de plasma humano procedente de donantes de sangre (provisto gentilmente por el Dr. Fernandez-Montoya, Banco de Tejidos de Granada).
- ii) A dicho volumen de plasma se añadieron 1.000.000 de fibroblastos gingivales humanos que se encontraban dispersos en 0,625 mL de DMEM.
- iii) Luego se agregaron 75  $\mu\text{L}$  de ácido tranexámico, que es un anti-fibrinolítico que evita la degradación de la matriz extracelular.

- iv) Posteriormente, se añadió la suspensión de partículas MagNP-OH en DMEM hasta alcanzar una concentración resultante de aproximadamente 2 mL de partículas por cada 100 mL.
- v) Seguidamente, se agregaron 0,25 mL de agarosa tipo VII en PBS (0,02 g/mL de concentración) a la mezcla resultante del paso (iv) anterior, resultando una  
5 concentración final de agarosa de 0,1 %.
- vi) A la mezcla resultante en el paso (v), se añadieron 0,25 mL de una disolución al 2% de CaCl<sub>2</sub> con objeto de activar la polimerización de la fibrina.
- vii) Finalmente, la mezcla resultante del paso (vi) se colocó en placas de Petri y se  
10 mantuvo a 37 °C hasta completar la gelificación. Durante los primeros 5 minutos de esta gelificación aplicamos un campo magnético vertical sobre la mezcla por medio de un solenoide conectado a una fuente de alimentación de corriente continua. A las distintas muestras se aplicaron diferentes intensidades de campo, en un rango de 0 a 48 kA/m (0, 16, 32 y 48 kA/m).
- 15 Las muestras control fueron tejidos no magnéticos elaborados siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente, con la excepción de que no se introducen partículas magnéticas, es decir, no se realizó el paso (iv) descrito en el párrafo anterior. También se aplicaron distintas intensidades de campo magnético durante la gelificación de las muestras (0, 16, 32 y 48 kA/m), para analizar el efecto sobre los  
20 distintos constituyentes biológicos de los tejidos. Se obtuvieron sustitutos de mucosa oral preparados por 8 protocolos diferentes (Tabla 1). La densidad de todos esos sustitutos fue de aproximadamente 1,1 g/mL.

Tabla 1. Diferentes sustitutos de fibrina y agarosa preparados.

Campo magnético aplicado durante la gelificación (kA/m)	0		16		32		48	
	Concentración de partículas MagNP-OH (g)	0	2	0	2	0	2	0

por 100 mL)								
Nombre de la muestra	Ctrl-MF0	M-MF0	Ctrl-MF16	M-MF16	Ctrl-MF32	M-MF32	Ctrl-MF48	M-MF48

Las muestras indicadas en la Tabla 1 se utilizarán en el ejemplo 4 que se describe más adelante.

5 **Ejemplo 2. Análisis de la biocompatibilidad de las partículas magnéticas en sistemas 2D de cultivos celulares.**

**Ejemplo 2a. Cultivo celular y tratamiento.**

En este ejemplo se usaron 20.000 fibroblastos gingivales humanos cultivados en placas de 24 pocillos con 500  $\mu$ L de DMEM suplementado con 10% de SBF y antibióticos/antimicóticos. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de dióxido de carbono durante 24 horas. Luego se lavaron dos veces en PBS e incubadas en DMEM.

Las partículas de MagNP-OH se dispersaron en DMEM en una concentración de 5% (peso/vol) y 1% (peso/vol). Estas suspensiones se colocaron en las placas en contacto con las células. Las células en contacto con las partículas MagNP-se incubaron en una estufa a 37°C y con 5% de dióxido de carbono durante 24 horas. Como control positivo (no toxicidad) las células se incubaron en las mismas condiciones sin la presencia de las partículas de MagNP-OH. Como control negativo (100% de toxicidad), las células se incubaron en el mismo medio con la adición de 1% de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich). Se realizaron 6 experimentos independientes, obteniendo un total de 24 mediciones por método y por condición.

**Ejemplo 2b. Análisis morfoestructural mediante microscopio de contraste de fase.**

Para evaluar los daños morfológicos provocados por la presencia de las nanopartículas MagNP-OH en fibroblastos gingivales humanos, se utilizó un microscopio de contraste de fase (Nikon Eclipse i90, Tokio, Japan).

Los resultados de este ejemplo 2b muestran que los tejidos magnéticos tienen un aspecto macroscópico similar al de los tejidos no-magnéticos, aunque con un color más oscuro, en contraste con la mayor transparencia de los tejidos no-magnéticos.

5 Los fibroblastos gingivales humanos, utilizados como control positivo, mostraron una forma típica, alargada y fusiforme (Figura 1). Las células expuestas a las nanopartículas de MagNp-OH mantuvieron la característica forma fusiforme de las células normales, y las nanopartículas pueden ser observadas en el espacio extracelular (Figuras 1B y 1C). Por otro lado, los fibroblastos utilizados como control negativo mostraron una forma redondeada (Figura 1D).

10

#### **Ejemplo 2c. Test de viabilidad celular WST-1**

Para evaluar la biocompatibilidad de las nanopartículas de MagNP-OH se utilizó el test WST-1. Para ello, se retiró el sobrenadante de los pocillos y se lavaron las células con PBS. Posteriormente se colocó sobre ellas una solución constituida por 10  $\mu$ L del reactivo WST-1 (Roche, Germany) y 100  $\mu$ L de medio de cultivo. Las células se incubaron por 4 horas en esa solución, y se evaluó su viabilidad usando un lector de placas (Biochrom® Asys UVM340) en un rango de longitud de onda de 450-690 nm. Para comparar los resultados se utilizó el test estadístico Mann-Whitney y se consideró como estadísticamente significativo una p menor a 0,05.

20 Los resultados de este ejemplo 2c (véase Figura 2) muestran que los grupos control positivo y las muestras expuestas a las nanopartículas de MagNP-OH poseen una actividad mitocondrial similar, no existiendo entre ellos diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ). Sólo el control negativo mostró actividad mitocondrial muy baja respecto de los anteriores con diferencias estadísticamente significativas ( $p =$   
25 0.000).

#### **Ejemplo 2d. Test de cuantificación de ADN libre**

Para identificar el ADN liberado al medio de cultivo por las células muertas se utilizó el método de cuantificación de ADN. Para ello se tomaron 10  $\mu$ L de sobrenadante de cada pocillo donde las células estaban cultivadas. Posteriormente, esos 10  $\mu$ L se diluyeron en agua bidestilada hasta obtener un volumen total de 100  $\mu$ L y se cuantificó el ADN presente en las muestras mediante la utilización de un

30

espectrofotómetro (Bio-Rad, ref. 170-2510, Hercules, California, USA) en una longitud de onda con rango entre 260-280 nm. El factor de conversión fue  $1 = 50 \mu\text{g/mL}$ . Para comparar los resultados se utilizó el test estadístico Mann-Whitney y el valor de  $p$  menor que 0,05 fue considerado como estadísticamente significativo.

- 5 Los resultados de la la identificación de fragmentos de ADN libre en el medio de cultivo celular mostraron que las muestras expuestas a las nanopartículas de MagNP-OH y el control positivo conforman un subgrupo homogéneo, no presentando diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ) (Figura 3), diferenciándose a su vez del control negativo ( $p = 0.002$ ) que presentó valores de ADN libre significativamente  
10 mayores.

### **Ejemplo 3. Análisis de biocompatibilidad de partículas magnéticas sobre un sistema 3D.**

- 15 **Ejemplo 3a. Análisis morfoestructural mediante microscopía óptica y electrónica de barrido.**

2) En este ejemplo se analizó la biocompatibilidad de las partículas MagNP-OH en un sistema de tejidos en tres dimensiones. Para esto, a las 24 horas de elaborados los tejidos artificiales que contenían células humanas, se fijaron en formalina, incluidos en parafina y se obtuvieron cortes de  $5 \mu\text{m}$ . Después de desparafinar las  
20 muestras, los tejidos se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y fueron observados por microscopía óptica para analizar la estructura biológica de los mismos. También se realizó una caracterización de las muestras mediante la utilización de la microscopía electrónica de barrido (SEM) fijándolas en glutaraldehído. En ambos casos, se analizó la estructura del biomaterial y las formas de las células.

25 **3)** Los resultados del análisis macroscópico (microscopía óptica) de las partículas inmersas en los sistemas de tejidos tridimensionales mostraron que los tejidos magnéticos poseían un aspecto similar al de los tejidos no magnéticos, aunque presentaron un color oscuro, en contraste con el color más transparente de los constructos no magnéticos.

30 **4)** Para el grupo gelificado en ausencia de campo magnético (Ctrl-MF0), el análisis mostró células fusiformes y estrelladas, compatibles con la normalidad (Figura 4A).



Además, las células se distribuyeron por todos los biomateriales de fibrina-agarosa, que presentan un aspecto normal, parecido a una red. Unas conclusiones parecidas se obtuvieron de las observaciones de los grupos de control gelificados en presencia de un campo magnético aplicado, aunque no se presentan aquí por brevedad.

5       **5)** Con respecto a las muestras que contenían partículas magnéticas, se pudieron distinguir casos diferentes. La muestra con partículas, gelificada en ausencia de un campo magnético aplicado (M-MF0), mostró un patrón fibrilar isotrópico y homogéneo, con partículas distribuidas aleatoriamente (Figura 4B). Por otro lado, se observó que las muestras con partículas, gelificadas bajo la aplicación de un campo magnético (M-MF16, M-MF32 y M-MF48), presentaron un patrón que consistía en  
10       estructuras filamentosas alineadas en una dirección específica, sin importar la intensidad del campo magnético aplicado - véase como ejemplo la imagen de la muestra M-MF32 (Figura 4C).

15       **6)** Las imágenes de microscopía electrónica de barrido revelan que las muestras de control presentaron un patrón fibrilar isotrópico y homogéneo (véase la muestra Ctrl-MF0 – Figura 5A). La aplicación de un campo magnético durante la gelificación de las muestras de control no causó ningún cambio significativo en su morfología microscópica, las muestras Ctrl-MF12 y Ctrl-MF48 presentaban un patrón similar a Ctrl-MF0 (no se incluyen aquí por brevedad).

20       **7)** La adición de las nanopartículas MagNP-OH produjo algunos cambios a nivel microscópico con una modificación del patrón fibrilar, incluso en ausencia de la aplicación de un campo magnético durante la gelificación. No obstante, en este caso el biomaterial conservó su morfología homogénea, algunas partículas y agregados de partículas se distribuyeron de forma homogénea en toda la red de fibrina,  
25       interrumpiendo su orden a nivel mesoscópico (Figura 5B). Cuando se aplicó un campo magnético durante la gelificación, la red de fibrina presentó un patrón anisotrópico a nivel microscópico. Este se caracteriza por la existencia de una dirección privilegiada con presencia de bandas gruesas que contenían fibras de fibrina empaquetadas estrechamente, alineadas y trenzadas en la dirección de las  
30       bandas. Además, existe un aumento de los espacios en los que existe una distribución isotrópica reticular entre las bandas, con una menor concentración de fibras – véase como ejemplo la imagen de microscopía de barrido para la muestra M-MF48 (Figura 5C). Es importante mencionar que las bandas gruesas se hicieron más

evidentes al aumentar la intensidad del campo magnético aplicado durante la gelificación.

### **Ejemplo 3b. Análisis de viabilidad celular**

La viabilidad celular se analizó mediante la actividad de una esterasa intracelular y la integridad de las membranas citoplasmáticas y nuclear utilizando el test de LIVE/DEAD™ (Life Technologies, Carlsbad, CA). Para ello, se tomó una muestra de tejido de 3 mm de diámetro después de 24 horas de elaborado, se eliminó el sobrenadante y se lavó con PBS. Seguidamente, se incubaron las muestras en una solución de LIVE/DEAD™ durante 15 minutos, como indica el fabricante, y posteriormente se lavó en PBS. Las muestras se observaron por microscopía de fluorescencia y las imágenes se procesaron mediante un programa informático ImageJ para poder cuantificar el número de células vivas (teñidas de verde) y células muertas (teñidas de rojo).

También se evaluó la viabilidad celular mediante el análisis de la integridad de la membrana nuclear mediante la cuantificación de ADN liberado al medio de cultivo. Para esto, se tomó el sobrenadante de cada muestra; después se extrajeron alícuotas de 10  $\mu\text{L}$ ; estas alícuotas se diluyeron en 100  $\mu\text{L}$  agua bidestilada (Ambion-Life Technologies, Austin, TX). El ADN liberado se cuantificó mediante un espectrofotómetro (SmartSpec™ plus BIO-RAD, Hercules, CA) en un rango de longitud de onda entre 260-280 nm.

Los resultados de estos ensayos de viabilidad celular Live & Dead mostraron que el número de células viables se mantuvo por encima del 80% para todos los grupos experimentales, sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los grupos (Figura 6).

De manera similar, no se observó diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre los valores de ADN libre en los constructos de los diferentes grupos experimentales (Figura 7).

### **Ejemplo 4. Propiedades magnéticas y mecánicas**

La magnetización,  $M$ , de las partículas del material MagNP-OH, en forma de polvo seco, se midió en función de la intensidad de campo aplicado,  $H$ , en un magnetómetro Squid Quantum Design MPMS XL. De forma similar, se obtuvo la curva de magnetización ( $M$  en función de  $H$ ) de los tejidos, con la humedad que

contienen, 24 horas después de su preparación. En ambos casos, la temperatura de medida fue de 37 °C.

Los resultados de la curva de magnetización (no se muestra aquí por brevedad) muestran que las partículas de MagNP-OH poseen el comportamiento típico de un material ferromagnético. La magnetización de saturación de estas partículas, obtenida mediante ajuste de los datos de magnetización a la ley de Fröhlich–Kennely [Jiles 1991], fue de  $161 \pm 7$  kA/m.

De forma similar, los tejidos magnéticos presentan carácter ferromagnético, aunque con un valor de magnetización de saturación mucho menor que el de las partículas magnéticas (Figura 8). Las diferencias en la magnetización de las distintas muestras de tejido magnético se puede atribuir a su diferente contenido en partículas MagNP-OH. De hecho, la concentración de partículas magnéticas en cada tejido se puede obtener a partir de los valores de magnetización de saturación del tejido y de las partículas secas utilizando la ley de mezclas [Rosensweig 1985]. De este modo, se obtuvieron los siguientes valores de la concentración de partículas magnéticas (expresada como fracción de volumen ocupado por las mismas  $\phi$  vol.) en las distintas muestras de tejidos: M-MF0:  $\phi = (2.9 \pm 0.3)$  vol.%; M-MF16:  $\phi = (2.5 \pm 0.3)$  vol.%; M-MF32:  $\phi = (1.66 \pm 0.16)$  vol.%; M-MF48:  $\phi = (2.22 \pm 0.22)$  vol.%. Como es lógico, el tejido de control (no magnético) no muestra comportamiento ferromagnético.

Las propiedades mecánicas de las muestras de tejidos se midieron, a las 24 horas de su preparación a 37 °C, con un reómetro de esfuerzo controlado de la marca Haake MARS III (Thermo Fisher Scientific, USA). La geometría de medida elegida en el reómetro fue la de placas paralelas. Estas son discos con un diámetro de 3.5 cm en las que la superficie en contacto con la muestra tenía la rugosidad necesaria para evitar el fenómeno de deslizamiento en paredes. La gelificación de las muestras de tejido se había realizado en placas Petri con el mismo diámetro de 3.5 cm que el las placas del reómetro.

El procedimiento seguido se describe a continuación. En primer lugar, se situó la muestra de tejido sobre la placa inferior del reómetro y se comprimió con el plato superior rotor del mismo hasta alcanzar una fuerza normal sobre el plato rotor de 5 N. La distancia entre las dos placas del sistema de medida para la que alcanzó dicho valor de fuerza normal varió ligeramente de una muestra a otra, pero en todos los

casos se encontraba en torno a 300  $\mu\text{m}$ . Las medidas se realizaron tanto en ausencia como en presencia de campo magnético. Para ello, se dispuso una bobina rodeando a las placas de medida cuyo eje de simetría coincidía con el eje de rotación de la placa superior giratoria del reómetro. En las medidas reológicas bajo campo magnético, este se aplicó desde 1 minuto antes de iniciarlas y se mantuvo aplicado durante todo el tiempo de duración experimento.

Se realizaron tres tipos diferentes de ensayos reológicos.

(i) Oscilometría con barrido en amplitud. En este tipo de ensayo, la muestra se sometió a una deformación por cizalla que variaba de forma sinusoidal; se mantuvo constante la frecuencia (1 Hz) y se fue aumentando la amplitud de la deformación ( $\gamma_0$ ) mientras se medían los valores del esfuerzo oscilatorio correspondiente. A partir de estas medidas, se calcularon los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) en función de  $\gamma_0$ . De esta forma, se obtiene el rango de valores de  $\gamma_0$  en el que el material tiene un comportamiento viscoelástico lineal (o región viscoelástica lineal, VLR).

(ii) Oscilometría con barrido en frecuencia. En este caso, la deformación sinusoidal que se aplica posee una amplitud  $\gamma_0$  constante (dentro del rango de la VLR) y se varía la frecuencia de oscilación, obteniéndose los correspondientes oscilogramas, esto es  $G'$  y  $G''$  en función de la frecuencia. En estos dos ensayos oscilométricos, cada valor de las magnitudes amplitud de deformación (ensayo i) o frecuencia (ensayo ii) se mantuvo durante 5 ciclos. Solo se tuvieron en cuenta los valores obtenidos en los 3 últimos ciclos para evitar efectos transitorios.

(iii) Ensayo en estado estacionario. En este caso, la muestra se mantuvo con una deformación por cizalla constante durante 10 segundos y se midió el esfuerzo de cizalla resultante. Este proceso se repitió para valores crecientes de deformación (rampa de deformaciones) hasta alcanzar la zona de dependencia esfuerzo-deformación no lineal. A partir de la parte lineal inicial de las curvas esfuerzo-deformación se obtuvo el módulo de rigidez de las muestras. Todos los ensayos mencionados se efectuaron con diferentes alícuotas de cada tipo de muestra. Los resultados que se describen a continuación siempre corresponden a los valores medios obtenidos con al menos 3 alícuotas diferentes.

Aquí solo mostramos los valores para el módulo elástico  $G'$  en función de la amplitud de la deformación  $\gamma_0$  a una frecuencia de 1 Hz (Figura 9A). También se muestran los

resultados del ensayo en estado estacionario (esfuerzo vs. deformación, Figura 9B). En los oscilogramas obtenidos para otras frecuencias diferentes de 1 Hz, se obtuvieron tendencias similares a la mostrada en la Figura 9A. Lo mismo se puede decir (las mismas tendencias) respecto de los valores del módulo viscoso obtenidos en los oscilogramas con barrido de amplitud o en los de barrido en frecuencia.

En ausencia de campo magnético, se observan valores mucho más elevados (hasta 4 veces mayores) del módulo elástico ( $G'$ ) en las muestras que contienen partículas magnéticas que en aquellas que no las contienen (Figura 9A). Algo similar se puede decir respecto de los valores de esfuerzo de cizalla, que son hasta 5 veces mayores para un valor dado de deformación, en el caso de las muestras magnéticas (Figura 9B). La desviación entre los valores obtenidos en las muestras de control (no magnética) eran pequeñas. En el caso de las muestras magnéticas las desviaciones en los valores de  $G'$  (ensayos oscilométricos) para distintas alícuotas de un mismo tipo de muestra llegan hasta el 40 %. Sin embargo, los valores obtenidos en el esfuerzo de cizalla (ensayos en estado estacionario) en las alícuotas de las muestras magnéticas son estadísticamente coincidentes, con excepción de la muestra magnética que en la que la gelificación se realizó en ausencia de campo magnético aplicado (M-MF0). Respecto a la dependencia entre  $G'$  y  $\gamma_0$ , se observa que en todos los casos existe un pseudoplateau inicial para los valores más bajos de  $\gamma_0$  seguido de una disminución para valores medios y altos de  $\gamma_0$ . El pseudoplateau inicial corresponde a la región viscoelástica lineal (VLR), mientras que el resto de la curva corresponde a la región de comportamiento viscoelástico no lineal. Habitualmente, el valor de  $G'$  en la VLR se toma como un parámetro que caracteriza la rigidez del material, siendo esta tanto mayor cuanto mayor es  $G'$ . En el caso de las curvas de esfuerzo de cizalla vs. deformación, se observa que para valores bajos de deformación existe una relación lineal, es decir, el esfuerzo y la deformación son proporcionales (comportamiento elástico) siendo el módulo de rigidez,  $G$ , la constante de proporcionalidad. Para valores más elevados de deformación dicho comportamiento elástico no se mantiene, de forma que el esfuerzo aumenta más lentamente cuanto mayor es la deformación (comportamiento plástico). Por otra parte, los valores de  $G$  para las muestras magnéticas pueden ser hasta tres veces mayores que los de las muestras no magnéticas (véase Tabla 2). Esto demuestra también que las muestras magnéticas son más rígidas que las no magnéticas, puesto que  $G$  cuantifica la rigidez de un material elástico. Además, hay que destacar que en las

muestras magnéticas el comportamiento elástico (linealidad esfuerzo-deformación) se mantiene hasta valores mucho más elevados de la deformación (Figura 9B).

Comparemos ahora los valores de  $G'$  (pertenecientes a la VLR) entre las distintas muestras magnéticas. En este caso, hay que tener en cuenta que las distintas muestras contienen una fracción de volumen ( $\phi$ ) de partículas magnéticas diferente. Por tanto, para realizar este análisis se ha calculado el incremento de  $G'$  en cada muestra magnética, respecto de su valor en el tejido de control no magnético ( $G'_{control}$ ), y se ha normalizado dicho incremento dividiendo por la fracción de volumen de partículas magnéticas ( $\phi_{MagNP-OH}$ ) y por el valor de  $G'_{control}$ . Utilizaremos, por tanto, el

parámetro adimensional  $\frac{G' - G'_{control}}{\phi_{MagNP-OH} \cdot G'_{control}}$ . Los valores de este parámetro se han representado en función de la amplitud de la deformación  $\gamma_0$  en la Figura 10. En esta se puede observar que los datos para los distintos tejidos magnéticos prácticamente solapan en una única curva maestra.

Como se mencionaba anteriormente, a partir de la pendiente de zona lineal inicial de las curvas representadas en la Figura 9B se puede obtener el módulo de rigidez,  $G$ , de los tejidos. De forma similar a como hemos indicado para el módulo elástico  $G'$ , se

puede definir el módulo de rigidez adimensional  $\frac{G - G_{control}}{\phi_{MagNP-OH} \cdot G_{control}}$ . Los correspondientes resultados se muestran en la Tabla 2. De nuevo, los módulos adimensionales de las distintas muestras solapan, no son significativamente diferentes teniendo en cuenta las desviaciones típicas de los valores mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2. Módulo de rigidez normalizado,  $\frac{G - G_{control}}{\phi_{MagNP-OH} \cdot G_{control}}$ , de las muestras de tejido magnético en ausencia de campo magnético. El valor medio del módulo de rigidez de la muestra no magnética es:  $G_{control} = (101 \pm 10)$  Pa.

Muestra	M-MF0	M-MF16	M-MF32	M-MF48
Módulo de rigidez normalizado: $\frac{G - G_{control}}{\phi_{MagNP-OH} \cdot G_{control}}$ (adimensional)	81 ± 21	49 ± 16	74 ± 22	58 ± 17

Respecto de la posible influencia de la intensidad del campo magnético aplicado durante las medidas reológicas, no se observó efecto alguno en el caso de la muestra de control no magnética. En el caso de la muestra M-MF0 había pequeñas diferencias en los valores de  $G'$  obtenidos (no los mostramos por brevedad). Sin embargo, en esta misma muestra M-MF0 sí que se encontró un efecto significativo en los valores obtenidos para el esfuerzo de cizalla medido en los ensayos en estado estacionario: de hecho, se observó una clara tendencia a aumentar el esfuerzo necesario para alcanzar un determinado valor de deformación cuando se incrementaba la intensidad del campo magnético (tampoco mostramos estos valores). En las muestras M-MF32 y M-MF48 también se observó un efecto significativo del campo magnético tanto en los valores de  $G'$  (oscilometría) como en los valores del esfuerzo de cizalla (estado estacionario) que se muestran en la Figura 11A. La forma de las curvas  $G'-\gamma_0$  obtenidas para las distintas intensidades de campo aplicada es similar, aunque en promedio  $G'$  tiende a aumentar conforme lo hace la intensidad de campo. Lo mismo se puede decir para las curvas esfuerzo-deformación (Figura 11B). De los datos representados en esta última figura se obtuvieron de nuevo los módulos de rigidez  $G$ , que muestran una clara tendencia a aumentar con el campo magnético en todas las muestras (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto del campo magnético sobre el módulo de rigidez de los tejidos magnéticos.

Intensidad de campo magnético aplicado durante las medidas (kA/m)	0	9	17	26
Muestra M-MF0	$338 \pm 3$	$363 \pm 3$	$369 \pm 4$	$370 \pm 4$
Muestra M-MF16	$224 \pm 3$	$237 \pm 3$	$246 \pm 3$	$253 \pm 3$
Muestra M-MF32	$225.8 \pm 2.2$	$243.6 \pm 2.1$	$239.6 \pm 1.9$	$245 \pm 1.9$
Muestra M-MF48	$230 \pm 3$	$237 \pm 3$	$252 \pm 3$	$254 \pm 3$

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de una partícula con multidominio magnético con un diámetro medio mayor de 25 nm en la elaboración de un medicamento.
2. El uso según la reivindicación anterior, donde la partícula magnética tiene un diámetro medio de aproximadamente 100 nm
3. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde las partículas magnéticas son de magnetita.
4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde las partículas magnéticas están recubiertas de un material polimérico.
5. El uso según la reivindicación 4, donde el material polimérico se selecciona de entre: ácido poliláctico, ácido poliglicólico, quitosano, poli( $\epsilon$ -caprolactona), PLGA, un polímero de metacrilato, poli(alquilianocrilato), o un derivado o una sal de los mismos, o cualquiera de sus mezclas.
6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, donde el material polimérico es una matriz polimérica de metil metacrilato-co.hidroxil etil metacrilato-co-etilen glicol dimetacrilato (MMA-co-HEMA-co-EGDMA).
7. El uso de una composición que comprende al menos una partícula magnética multidominio según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la elaboración de un medicamento.
8. El uso de una composición según la reivindicación 7, donde la composición es una composición farmacéutica.
9. El uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde la composición además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. El uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, donde la composición además comprende otro principio activo.
11. Un biomaterial que comprende una partícula con multidominio magnético según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o una composición según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 7-10.



12. Un tejido artificial, obtenible por un método de obtención del tejido artificial de la invención que comprende:
- a) añadir una composición que comprende fibrinógeno a una muestra de células aisladas,
  - 5 b) añadir un agente antifibrinolítico al producto resultante del paso (a),
  - c) añadir, al menos, un factor de coagulación, una fuente de calcio, trombina, o cualquier combinación de los anteriores al producto resultante del paso (b),
  - 10 d) añadir una composición que comprende las partículas de la invención al producto resultante del paso (c).
  - e) añadir una composición de un polisacárido al producto resultante del paso (d),
  - f) cultivar células aisladas en o sobre el producto resultante del paso (e), y
  - 15 g) inducir la nanoestructuración del producto resultante del paso (f).
13. El tejido artificial según la reivindicación 12, donde tras el paso (d) se aplica un campo magnético.
14. El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 12-13, en donde las células del paso (a) son fibroblastos o queratocitos.
- 20 15. El tejido artificial según la reivindicación 14 donde los fibroblastos proceden del estroma de un tejido o un órgano seleccionado de la lista que comprende: mucosa oral, pared abdominal, piel, vejiga, uretra o córnea.
16. El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 donde la composición que contiene fibrinógeno del paso (a) es plasma sanguíneo.
- 25 17. El tejido artificial según la reivindicación 16 donde el plasma sanguíneo es de origen autólogo.
18. El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17 donde el agente antifibrinolítico del paso (b) es ácido tranexámico.
19. El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18 donde la fuente  
30 de calcio del paso (c) es una sal de calcio.

20. El tejido artificial según la reivindicación 19 en donde la sal de calcio del paso (c) es cloruro cálcico
21. El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20 donde el polisacárido del paso (e) es agarosa.
- 5 22. El tejido artificial según la reivindicación 21 donde la agarosa es de tipo VII.
23. El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 22 que además comprende un paso (paso b2) entre los pasos (b) y (c) en el que se añade una proteína.
- 10 24. El tejido artificial según la reivindicación 23 donde la proteína añadida en el paso (b2) es fibronectina.
25. El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 24 que comprende un paso (e2) entre los pasos (e) y (f) que comprende la adición de una composición que comprende una proteína al producto resultante del paso (e).
- 15 26. El tejido artificial según la reivindicación 25 donde la proteína añadida en el paso (e2) es colágeno.
27. El tejido artificial según la reivindicación 26 donde el colágeno es colágeno tipo I.
28. El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 27 donde las células del paso (f) comprenden células madre del cordón umbilical.
- 20 29. El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 28 donde las células del paso (f) comprenden células epiteliales.
- 25 30. El tejido artificial según la reivindicación 29 donde las células epiteliales del paso (f) se seleccionan de la lista que comprende: queratinocitos, células del urotelio, células del epitelio de la uretra, células del epitelio corneal o células del epitelio de la mucosa oral.
31. El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 30 donde las células del paso (a) y/o las células del paso (f) son de origen autólogo.

32. El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 31 donde la inducción de la nanoestructuración del paso (g) comprende la deshidratación y/o la compresión mecánica del producto resultante del paso (f).
- 5 33. El tejido artificial según la reivindicación 32 donde la deshidratación del producto resultante del paso (f) comprende un procedimiento seleccionado de la lista que comprende: drenaje, evaporación, succión, presión capilar, ósmosis o electro-ósmosis.
- 10 34. El tejido artificial según la reivindicación 33 donde la deshidratación del producto resultante del paso (f) mediante presión capilar comprende la aplicación de un material absorbente sobre el producto resultante del paso (f).
- 15 35. El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34 donde la compresión mecánica del paso (g) comprende un procedimiento seleccionado de la lista que comprende: aplicación de una carga estática, aplicación de un hidrúlico, aplicación de una leva, aplicación de uno o más rodillos, aplicación de un globo, extrusión o centrifugación.
36. El tejido artificial según la reivindicación 35 donde la aplicación de una carga estática del paso (g) comprende la colocación de un peso sobre el producto resultante del paso (e).
- 20 37. El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 36 donde entre el paso (f) y el paso (g) hay un paso adicional en el que el producto resultante del paso (f) se expone al aire.
38. El tejido artificial artificial obtenible por el método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 37.
- 25 39. El uso del tejido artificial según la reivindicación 38 para la evaluación de un producto farmacológico y/o químico.
40. El uso del tejido artificial según la reivindicación 38 en la elaboración de un medicamento.
- 30 41. Uso del tejido artificial según la reivindicación 38 para la elaboración de un medicamento para incrementar, restaurar o sustituir parcial o totalmente la actividad funcional de un tejido o un órgano enfermo o dañado.

42. Uso según la reivindicación 38 donde el tejido o el órgano dañado se selecciona de la lista que comprende: piel, vejiga, uretra, córnea, mucosa, conjuntiva, pared abdominal, conjuntiva, tímpano, faringe, laringe, intestino, peritoneo, ligamento, tendón, hueso, meninge o vagina.
- 5 43. Uso según la reivindicación 42 donde la piel está enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación o una malformación congénita.
- 10 44. Uso según la reivindicación 42 donde la vejiga está enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita, una vejiga neurógena, una incontinencia urinaria, una disfunción vesical, una infección o una litiasis vesical.
- 15 45. Uso según la reivindicación 42 donde la uretra está enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una neoplasia benigna o maligna, una infección, un traumatismo, una malformación congénita o una estenosis.
- 20 46. Uso según la reivindicación 42 donde la córnea está enferma o dañada como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una úlcera corneal, un queratocono, un queratoglobo, un descematocele, un traumatismo, una causticación, una insuficiencia límica, una queratitis atrófica, una distrofia corneal, una queratopatía primaria o secundaria, una infección, un leucoma, una queratopatía bullosa, un fallo  
25 endotelial corneal o una neoplasia benigna o maligna.
- 30 47. Uso del tejido artificial según la reivindicación 42 donde la mucosa está dañada o enferma como consecuencia de una disfunción, una lesión o una enfermedad seleccionada de la lista que comprende: una herida, una úlcera, una quemadura, una neoplasia benigna o maligna, una infección, una contusión, un traumatismo, una causticación, una malformación congénita, una pérdida de sustancia o una enfermedad periodontal.

48. Uso según la reivindicación 47 en donde la mucosa es la mucosa oral.
49. Uso según las reivindicaciones 47 ó 48 en donde el tejido se ha obtenido empleado un paso (d2).
50. Composición farmacéutica que comprende el tejido artificial según la  
5 reivindicación 38.
51. Composición farmacéutica según la reivindicación 50 que comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable.
52. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 50 ó 51 que  
10 comprende, además, otro principio activo.

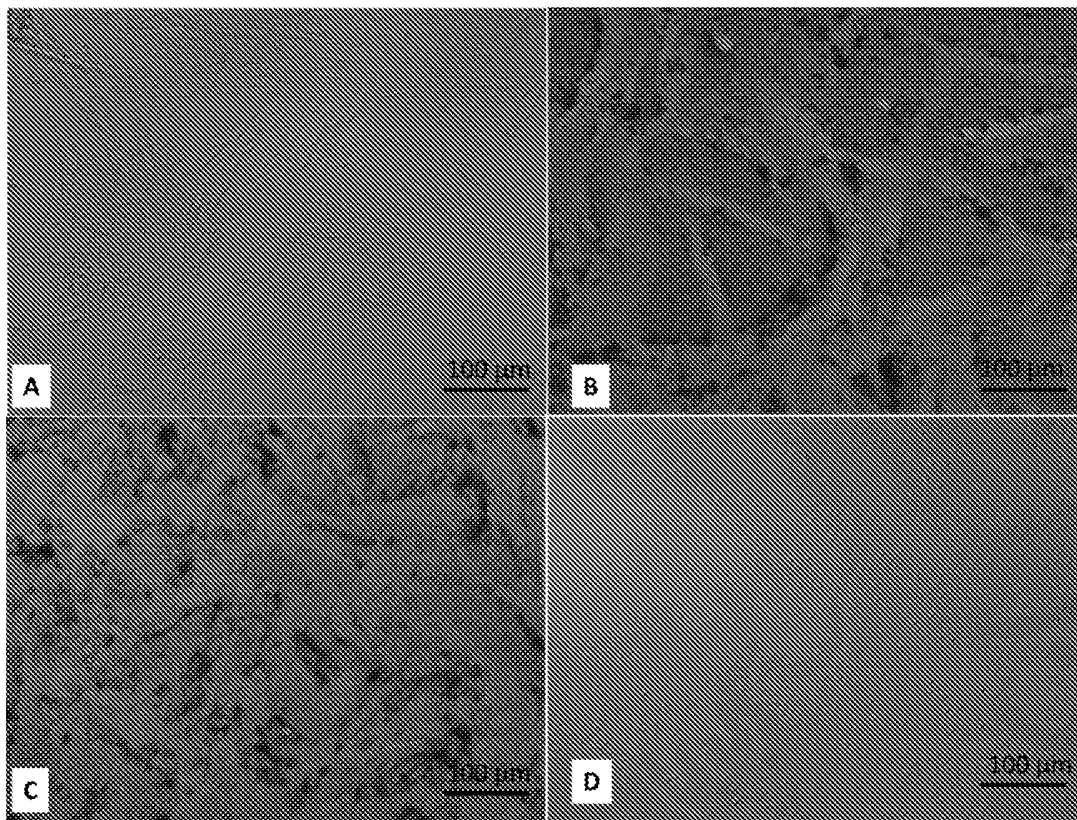


Fig. 1

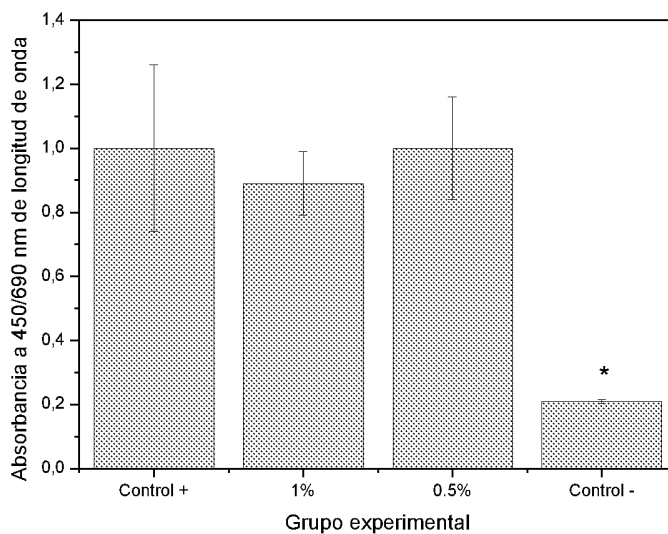


Fig. 2

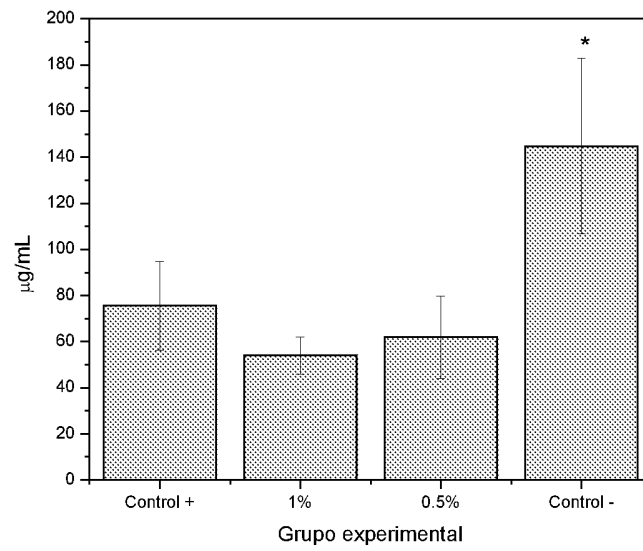


Fig. 3

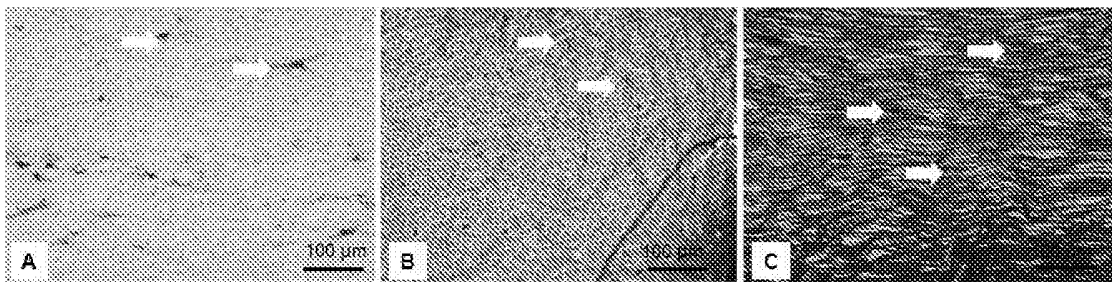


Fig. 4

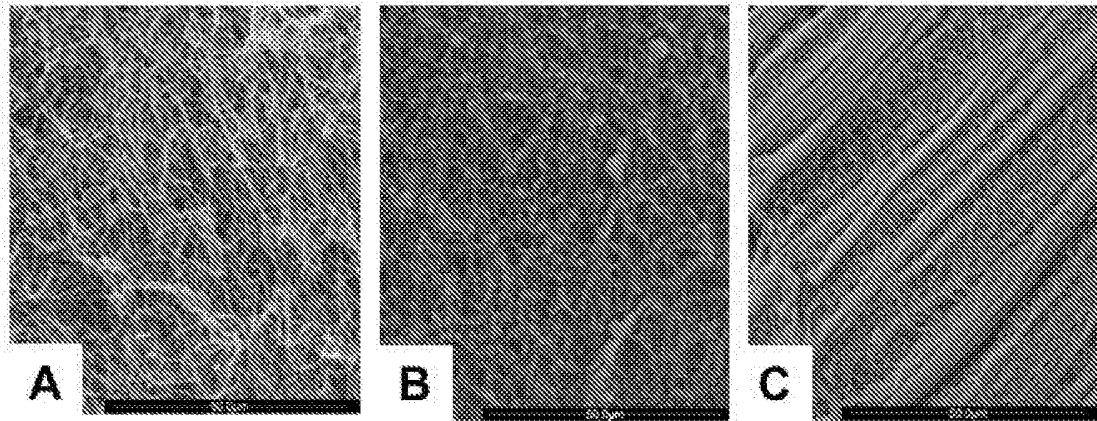


Fig. 5

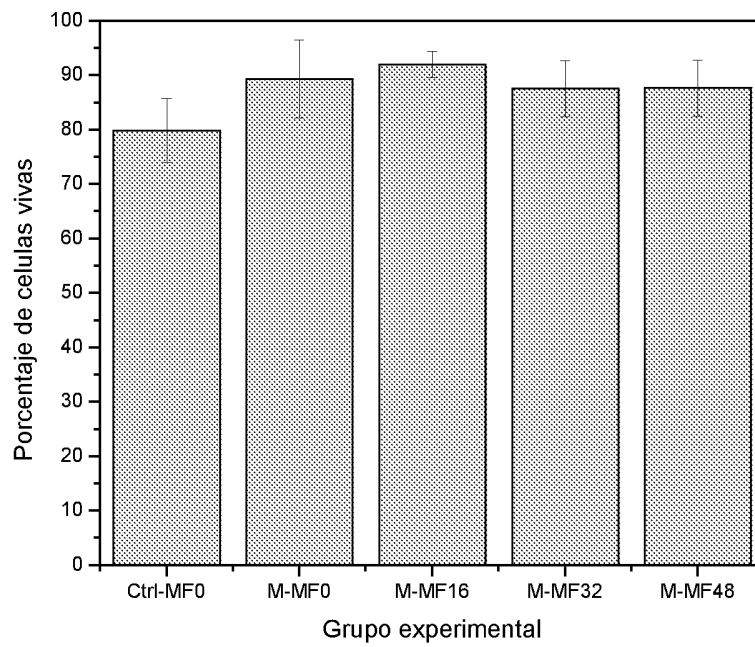


Fig. 6



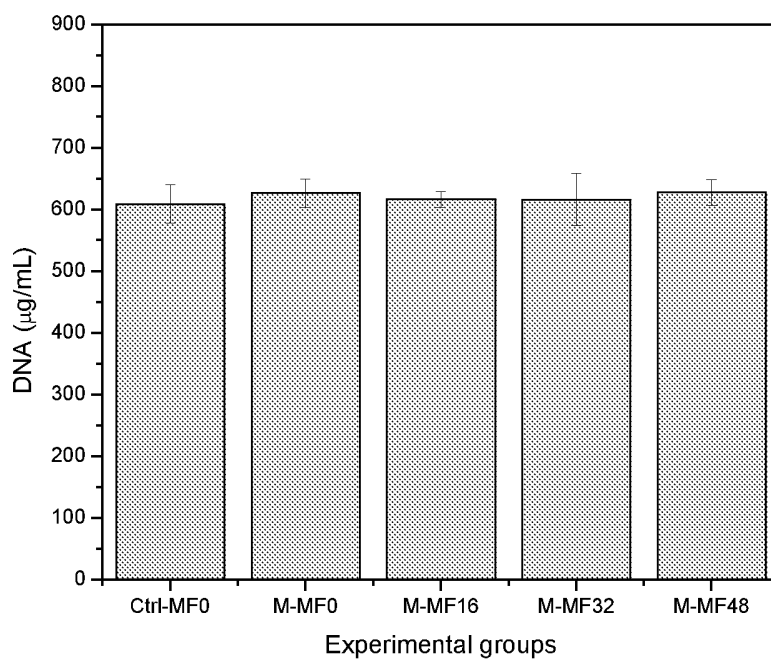


Fig. 7

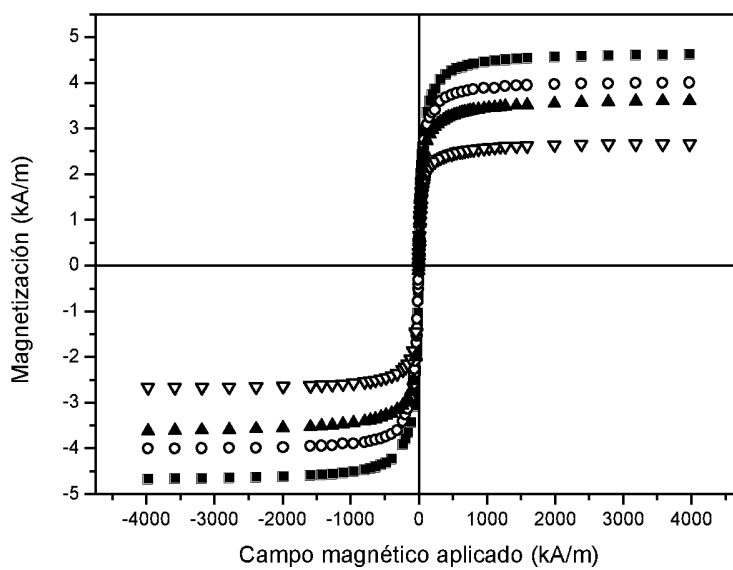


Fig. 8

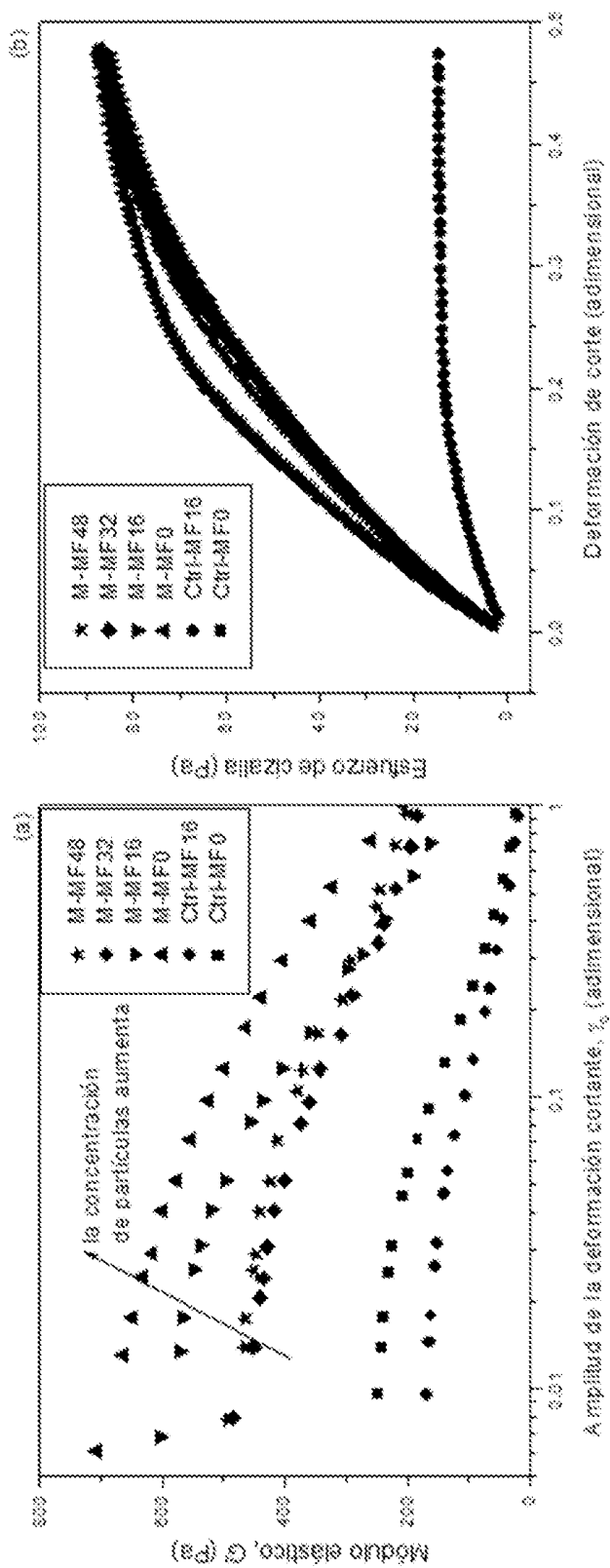


Fig. 9

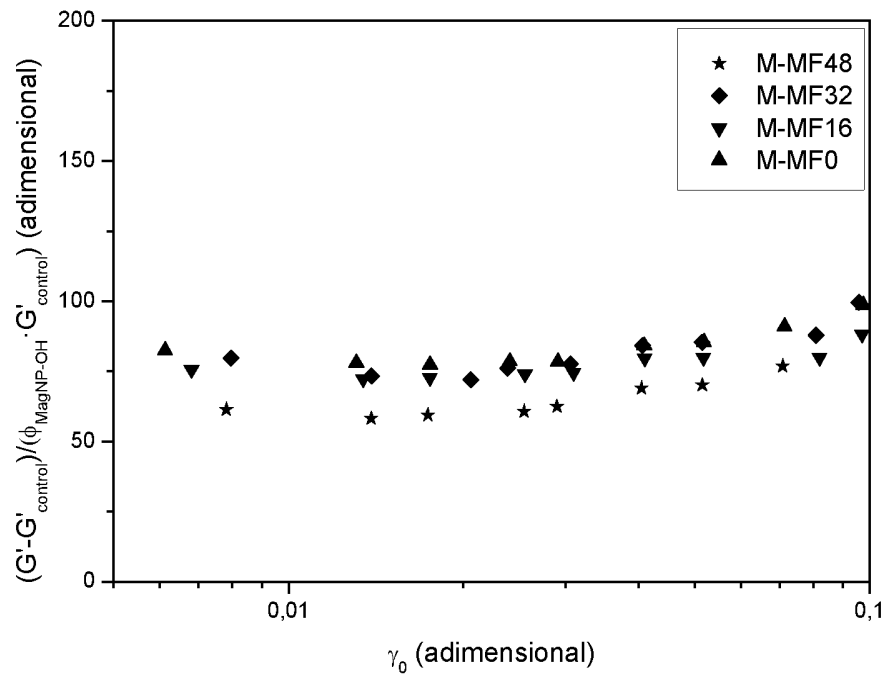


Fig. 10

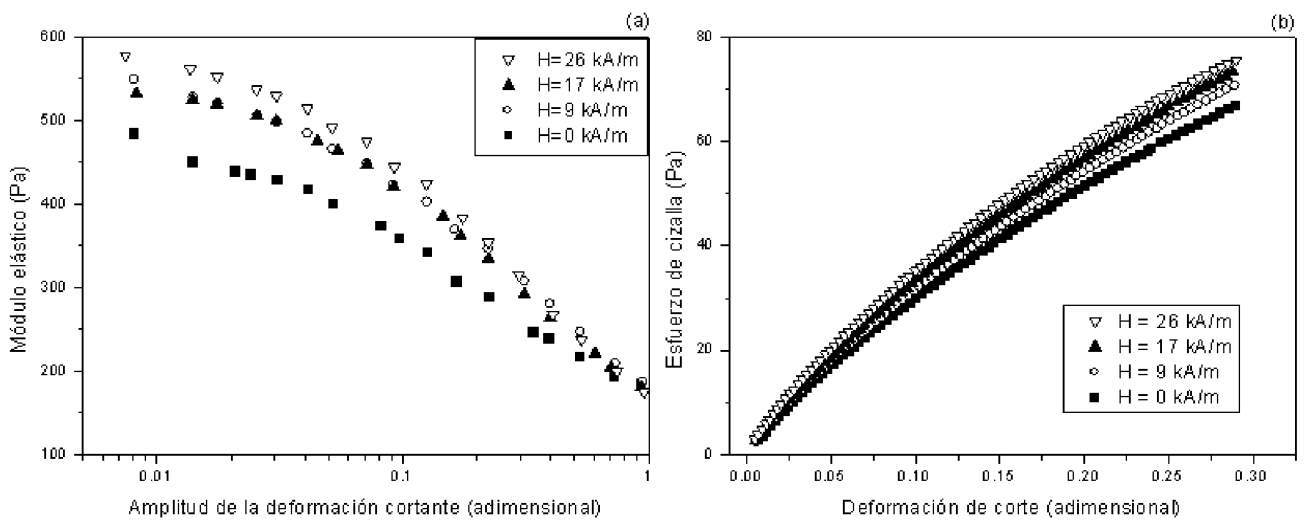


Fig. 11

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/ES2015/070836

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****See extra sheet**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, A61F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, EMBASE, NPL, MEDLINE

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006093611 A1 (HAJ ALICIA J ET AL.) 04/05/2006, Paragraphs [0016], [0021], [0024], [0026], [0033], [0034], [0035], [0036] and [0044].	1-5
X	US 2011034753 A1 (DOBSON JON ET AL.) 10/02/2011, Paragraphs [0016], [0042], [0043], [0044] and [0052]; claims 113 and 117.	1-5
X	US 2004147015 A1 (EL-HAJ ALICIA JENNIFER HAFEEZA ET AL.) 29/07/2004, Paragraphs [0001], [0016], [0017], [0018], [0019], [0020] and [0022] and claim 1.	1-5
A	US 2011085968 A1 (JIN SUNGHO ET AL.) 14/04/2011, Paragraphs [0018], [0021], [0023], [0025] and [0043].	1-52

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
22/02/2016Date of mailing of the international search report  
(24/02/2016)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer  
S. González PeñalbaOFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3493025

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070836

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2011085968 A1	14.04.2011	NONE	
-----			
US2011034753 A1	10.02.2011	US8469034 B2	25.06.2013
		KR20060124654 A	05.12.2006
		JP2007518710 A	12.07.2007
		WO2005059118 A2	30.06.2005
		WO2005059118 A3	26.05.2006
		EP1699917 A2	13.09.2006
		CN1898378 A	17.01.2007
		CA2550084 A1	30.06.2005
		AU2004299704 A1	30.06.2005
-----			
US2006093611 A1	04.05.2006	TW200409647 A	16.06.2004
		US7625562 B2	01.12.2009
		JP2005529971 A	06.10.2005
		WO2004000369 A2	31.12.2003
		WO2004000369 A3	26.02.2004
		EP1513560 A2	16.03.2005
		AU2003244806 A1	06.01.2004
		AU2003244806 A8	06.01.2004
-----			
US2004147015 A1	29.07.2004	KR20040028700 A	03.04.2004
		KR100837265B B1	11.06.2008
		JP2008263986 A	06.11.2008
		US7553662 B2	30.06.2009
		NZ526533 A	30.09.2005
		JP2004520028 A	08.07.2004
		WO02051985 A2	04.07.2002
		WO02051985 A3	16.01.2003
		EP1343872 A2	17.09.2003
		EP1343872 B1	14.08.2013
		CN1483075 A	17.03.2004
		CN1250714C C	12.04.2006
		CA2432574 A1	04.07.2002
		AU2002216206B B2	04.10.2007
-----			

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070836

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C12N5/00* (2006.01)

*C12N5/07* (2010.01)

*A61F2/00* (2006.01)

*A61F2/02* (2006.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2015/070836

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**Ver Hoja Adicional**

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12N, A61F

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, EMBASE, NPL, MEDLINE

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	US 2006093611 A1 (HAJ ALICIA J ET AL.) 04/05/2006, Párrafos [0016], [0021], [0024], [0026], [0033], [0034], [0035], [0036] y [0044].	1-5
X	US 2011034753 A1 (DOBSON JON ET AL.) 10/02/2011, Párrafos [0016], [0042], [0043], [0044] y [0052]; reivindicaciones 113 y 117.	1-5
X	US 2004147015 A1 (EL-HAJ ALICIA JENNIFER HAFEEZA ET AL.) 29/07/2004, Párrafos [0001], [0016], [0017], [0018], [0019], [0020] y [0022] y reivindicación 1.	1-5
A	US 2011085968 A1 (JIN SUNGHO ET AL.) 14/04/2011, Párrafos [0018], [0021], [0023], [0025] y [0043].	1-52

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&amp;" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
22/02/2016

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**24 de febrero de 2016 (24/02/2016)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
S. González Peñalba  
Nº de teléfono 91 3493025

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2015/070836

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2011085968 A1	14.04.2011	NINGUNO	
-----	-----	-----	-----
US2011034753 A1	10.02.2011	US8469034 B2 KR20060124654 A JP2007518710 A WO2005059118 A2 WO2005059118 A3 EP1699917 A2 CN1898378 A CA2550084 A1 AU2004299704 A1	25.06.2013 05.12.2006 12.07.2007 30.06.2005 26.05.2006 13.09.2006 17.01.2007 30.06.2005 30.06.2005
-----	-----	-----	-----
US2006093611 A1	04.05.2006	TW200409647 A US7625562 B2 JP2005529971 A WO2004000369 A2 WO2004000369 A3 EP1513560 A2 AU2003244806 A1 AU2003244806 A8	16.06.2004 01.12.2009 06.10.2005 31.12.2003 26.02.2004 16.03.2005 06.01.2004 06.01.2004
-----	-----	-----	-----
US2004147015 A1	29.07.2004	KR20040028700 A KR100837265B B1 JP2008263986 A US7553662 B2 NZ526533 A JP2004520028 A WO02051985 A2 WO02051985 A3 EP1343872 A2 EP1343872 B1 CN1483075 A CN1250714C C CA2432574 A1 AU2002216206B B2	03.04.2004 11.06.2008 06.11.2008 30.06.2009 30.09.2005 08.07.2004 04.07.2002 16.01.2003 17.09.2003 14.08.2013 17.03.2004 12.04.2006 04.07.2002 04.10.2007
-----	-----	-----	-----



**CLASIFICACIONES DE INVENCION**

*C12N5/00* (2006.01)

*C12N5/07* (2010.01)

*A61F2/00* (2006.01)

*A61F2/02* (2006.01)