

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 956 833**

21 Número de solicitud: 202230435

51 Int. Cl.:

C08G 18/83 (2006.01)
C08G 63/91 (2006.01)
A61K 47/34 (2007.01)
A61K 31/785 (2006.01)
A61F 2/02 (2006.01)
A61L 27/18 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.05.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.12.2023

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)
Avenida del Hospicio s/n
18071 Granada (Granada) ES

72 Inventor/es:

MARTÍNEZ ALONSO, Daniel;
JIMÉNEZ GONZÁLEZ, Gema y
MARCHAL CORRALES, Juan Antonio

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **MÉTODO DE FUNCIONALIZACIÓN DE MATERIAL POLIMÉRICO CON PBA Y SU USO EN BIOMEDICINA**

57 Resumen:

Método de funcionalización de material polimérico con PBA y su uso en biomedicina.

La presente invención se refiere a un método de funcionalización de elastómeros y polímeros biocompatibles basado en el revestimiento con PBA de estos materiales. Esta funcionalización permite modificar las propiedades superficiales del material, reduciendo así su hidrofobicidad y mejorando la interacción célula-biomaterial. Estos biomateriales, preferiblemente el elastómero de poliuretano termoplástico 1,4-Butanediol (b-TPUe), son utilizados para preparar estructuras para su uso en medicina.

Por tanto, la invención también se refiere a una estructura que está compuesta esencialmente por el material funcionalizado, preferiblemente b-TPUe; además de la aplicación de esta estructura para cultivos en 3D in vitro o para el tratamiento de enfermedades que implican la reparación o degeneración de tejidos.

ES 2 956 833 A1

DESCRIPCIÓN

**MÉTODO DE FUNCIONALIZACIÓN DE MATERIAL POLIMÉRICO CON PBA Y SU
USO EN BIOMEDICINA****SECTOR DE LA TÉCNICA**

5

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina, preferentemente dentro del campo de la medicina regenerativa y, de forma más específica, en la rama de ingeniería tisular.

10 Particularmente, esta invención se refiere a un método para la funcionalización con PBA de un elastómero y/o polímero biocompatible, y a la utilización de este material para preparar una estructura que sirva como sustrato o guía para la reparación o regeneración de tejidos. Adicionalmente, la presente invención se dirige al uso de dicha estructura en
15 cultivos 3D *in vitro* para el estudio de la diferenciación celular, la producción a gran escala de vectores para uso en terapia génica, o el cultivo y proliferación de células maduras o células madre en 3D. Finalmente, la presente invención se dirige al uso de estas estructuras para la elaboración de una composición farmacéutica, y su utilización para el tratamiento de enfermedades que implican degeneración de tejidos, más concretamente para el tratamiento de osteoartritis.

20

ESTADO DE LA TÉCNICA

La medicina regenerativa (MR) persigue la regeneración total o parcial de células, órganos o tejidos humanos para restaurar o establecer una función normal [1]. Por otro
25 lado, la ingeniería de tejidos (IT) es una rama de la MR basada en tres pilares: células, biomateriales y moléculas bioactivas [2]. La osteoartritis (OA), una enfermedad irreversible y multifactorial, se encuentra entre las diferentes patologías que pueden beneficiarse de la MR. La baja tasa de regeneración en la OA es consecuencia de las características del cartílago, que es un tejido avascular, no linfático y sin terminaciones nerviosas [3]. La OA
30 provoca dolor y pérdida de la función articular debido a la pérdida del cartílago articular [4]. Es uno de los trastornos articulares más comunes que resultan de una combinación de factores de riesgo, donde la edad y la obesidad son los más destacados, y que afectan con mayor frecuencia a las rodillas [5]. Hasta el momento, no existe un tratamiento de la OA para detener o frenar su progresión, por lo que las alternativas quirúrgicas siguen siendo
35 el tratamiento elegido [6].

En las últimas décadas, varios productos de cartílago IT, como la implantación de condrocitos autólogos asociados a la matriz (MACI), Hyalograft® C, NeoCart®, NOVOCART® 3D, Cartipatch®, etc. han intentado imitar el cartílago articular [7]. Sin embargo, en su lugar, la mayoría de estas terapias implican la formación de fibrocartílago.

5 Para mejorar la eficacia de estos procedimientos de IT, se están desarrollando nuevos enfoques, como la biofabricación en 3D, para introducir células madre, a fin de evitar el inconveniente de las terapias con condrocitos autólogos, en una matriz 3D y cultivarlas *in vitro* durante períodos más largos, de 4 a 6 semanas [7]. Las matrices 3D se conocen como andamios, componentes que sirven como estructuras 3D para soportar temporalmente las
10 células autólogas hasta que éstas sintetizan sus componentes de matriz [8]. Este hecho permite crear un tejido relativamente maduro *in vitro* antes de su implantación, con una integridad bioquímica similar a la del cartílago articular sano, ya que se sabe que la presencia de matriz alrededor de las células mejora la retención de las células del donante [9], y protege a las células de los agentes inflamatorios [10]. Además, los andamios
15 cumplen ciertos requisitos, como i) la presencia de una superficie adecuada (rugosidad e hidrofilia) para mejorar la adhesión celular, ii) una estructura interna (porosidad, tamaño y estructura del poro y diámetro de la fibra) que favorezca la adhesión, proliferación y diferenciación celular, así como la difusión de nutrientes, oxígeno y desechos, iii) y también poseen propiedades mecánicas y bioquímicas similares a las del tejido diana [11]. Los
20 andamios pueden fabricarse con biomateriales, materiales destinados a interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o sustituir tejidos, órganos o funciones del cuerpo.

Un problema considerable relacionado con los biomateriales es cómo la hidrofobicidad y la falta de sitios de reconocimiento biológico en la superficie del material proporcionan un
25 entorno hostil para la adhesión celular [12]. Para mejorar la adhesión celular, se han desarrollado estudios previos de funcionalización centrados en la modificación de las superficies de los biomateriales. Además, las modificaciones de la superficie juegan un papel en la migración celular, proliferación y diferenciación de las células madre [13]. Por lo tanto, la mejora de la adhesión celular mejoraría la interacción célula-biomaterial [14]. Se
30 han utilizado varios métodos de funcionalización basados en la interacción de diferentes componentes con proteínas de la membrana celular. Por ejemplo, la superficie puede ser funcionalizada con el péptido RGD (Arg-Gly-Asp) [15], con el ácido 1-pireno butírico (PBA) [16], o con diferentes componentes presentes en la matriz extracelular (MEC) como la fibronectina o el colágeno [17].

Los poliésteres sintéticos, como el elastómero de poliuretano termoplástico 1,4-butanediol (b-TPUe) (que comprende diisocianato de difenilmetano [MDI] y 1,4-butanediol), han recibido una atención considerable para la ingeniería tisular de cartílago, debido a sus adecuadas propiedades mecánicas, como la capacidad de recuperación altamente elástica [18]. Sin embargo, su hidrofobicidad no proporciona el entorno deseado para la adhesión y proliferación celular.

Por ello, los inventores de la presente invención han puesto en marcha dos métodos de funcionalización diferentes, basados en el recubrimiento del biomaterial con colágeno tipo I y PBA, con el fin de comprobar si es posible reducir la hidrofobicidad del b-TPUe mejorando la interacción célula-biomaterial. Se seleccionaron dos métodos con el objetivo de comparar un método de recubrimiento tradicional (Colágeno tipo I) adaptado de la literatura [17] con una nueva metodología (PBA) con costes reducidos y buenos resultados obtenidos en la fabricación de biosensores de grafeno [16]. Ambas metodologías se comparan evaluando la eficacia de la funcionalización mediante el microscopio de fuerza atómica (AFM, de sus siglas en inglés Atomic Force Microscope) y el reactivo de ninhidrina. A continuación, se analizó la eficacia biológica de ambos métodos de funcionalización sembrando células madre mesenquimales obtenidas de la almohadilla de grasa de Hoffa (IPFP-MSCs, de sus siglas en inglés Infrapatellar Fat Pad derived Mesenchymal Stem Cells) y realizando los posteriores estudios de actividad metabólica y viabilidad. Junto con los estudios celulares, se analizó la secreción de MEC mediante PCR, cuantificación de glicosaminoglicanos (GAGs) y, finalmente, mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), para verificar el potencial condrogénico de ambos métodos funcionalizados.

La presente invención propone, por tanto, un método de funcionalización de elastómeros y polímeros biocompatibles mediante revestimiento con un componente más hidrófilo, como es el PBA, lo cual permite modificar las propiedades superficiales del material, reduciendo así su hidrofobicidad y mejorando la interacción célula-biomaterial. Como consecuencia, el método de funcionalización descrito aporta al biomaterial una naturaleza altamente manejable y una capacidad de recuperación elástica similar a la del cartílago, solventado así las limitaciones relativas a la adhesión y proliferación celular de los enfoques actuales, derivadas de la hidrofobicidad de estos polímeros. Siendo así, el biomaterial funcionalizado es utilizado para la preparación de una estructura de biomaterial que sirve como sustrato o guía para la reparación o regeneración de tejidos, lo que supone un avance en la ingeniería tisular de cartílago con gran potencial clínico.

Referencias:

1. C. Mason, P. Dunnill, A brief definition of regenerative medicine, *Regen. Med.* 3 (2007) 1–5. <https://doi.org/10.2217/17460751.3.1.1>.
2. R. Langer, J.P. Vacanti, C.A. Vacanti, A. Atala, L.E. Freed, G. Vunjak-Novakovic,
5 Tissue Engineering: Biomedical Applications, *Tissue Eng.* 1 (1995) 151–161.
<https://doi.org/10.1089/ten.1995.1.151>.
3. X. Houard, M.B. Goldring, F. Berenbaum, Homeostatic Mechanisms in Articular
Cartilage and Role of Inflammation in Osteoarthritis, *Curr. Rheumatol. Rep.* 15 (2013)
375. <https://doi.org/10.1007/s11926-013-0375-6>.
- 10 4. D. Heinegård, T. Saxne, The role of the cartilage matrix in osteoarthritis, *Nat. Rev.*
Rheumatol. 7 (2011) 50–56. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.198>.
5. S. Chen, P. Fu, H. Wu, M. Pei, Meniscus , articular cartilage and nucleus pulposus : a
comparative review of cartilage-like tissues in anatomy , development and function,
(2017) 53–70. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2613-0>.
- 15 6. R. Martínez, C. Martínez, R. Calvo, Osteoarthritis (artrosis) de rodilla, 56 (2015).
7. E.A. Makris, A.H. Gomoll, K.N. Malizos, J.C. Hu, K.A. Athanasiou, Repair and tissue
engineering techniques for articular cartilage, *Nat. Rev. Rheumatol.* 11 (2015) 21.
8. M. Tatsumura, M. Sakane, N. Ochiai, S. Mizuno, Off-loading of cyclic hydrostatic
pressure promotes production of extracellular matrix by chondrocytes, *Cells Tissues*
20 *Organs.* 198 (2013) 405–413. <https://doi.org/10.1159/000360156>.
9. A.R. Tan, E.Y. Dong, J.P. Andry, J.C. Bulinski, G.A. Ateshian, C.T. Hung, Coculture of
engineered cartilage with primary chondrocytes induces expedited growth, in: *Clin.*
Orthop. Relat. Res., Springer New York LLC, 2011: pp. 2735–2743.
<https://doi.org/10.1007/s11999-011-1772-7>.
- 25 10. S.R. Sampat, G.D. O’Connell, J. V. Fong, E. Alegre-Aguarón, G.A. Ateshian, C.T.
Hung, Growth factor priming of synovium-derived stem cells for cartilage tissue
engineering, *Tissue Eng. - Part A.* 17 (2011) 2259–2265.
<https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0155>.
11. M.R. Rad, M.J. Eghbal, N. Nadjmi, A. Khojasteh, S.R. Motamedian, M. Jafari, Z.
30 Paknejad, Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review, *J. Biomed.*
Mater. Res. Part B Appl. Biomater. 105 (2015) 431–459.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.33547>.
12. W.B. Tsai, C.H. Chen, J.F. Chen, K.Y. Chang, The effects of types of degradable
polymers on porcine chondrocyte adhesion, proliferation and gene expression, *J.*
35 *Mater. Sci. Mater. Med.* 17 (2006) 337–343. [https://doi.org/10.1007/s10856-006-8234-](https://doi.org/10.1007/s10856-006-8234-X)
[X](https://doi.org/10.1007/s10856-006-8234-X).

13. S. Metwally, U. Stachewicz, Surface potential and charges impact on cell responses on biomaterials interfaces for medical applications, *Mater. Sci. Eng. C.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109883>.
14. J.A. Sanz-Herrera, E. Reina-Romo, Cell-Biomaterial Mechanical Interaction in the Framework of Tissue Engineering: Insights, Computational Modeling and Perspectives, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 8217–8244. <https://doi.org/10.3390/ijms12118217>.
15. H. Zhang, S. Hollister, Comparison of bone marrow stromal cell behaviors on poly(caprolactone) with or without surface modification: Studies on cell adhesion, survival and proliferation, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 20 (2009) 1975–1993. <https://doi.org/10.1163/156856208X396074>.
16. M. Hinnemo, J. Zhao, P. Ahlberg, C. Hägglund, V. Djurberg, R.H. Scheicher, S.L. Zhang, Z. Bin Zhang, On Monolayer Formation of Pyrenebutyric Acid on Graphene, *Langmuir*. 33 (2017) 3588–3593. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04237>.
17. T. Douglas, H.J. Haugen, Coating of polyurethane scaffolds with collagen: Comparison of coating and cross-linking techniques, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19 (2008) 2713–2719. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3393-6>.
18. A. Haryńska, I. Gubanska, J. Kucinska-Lipka, H. Janik, Fabrication and characterization of flexible medical-grade TPU filament for Fused Deposition Modeling 3DP technology, *Polymers (Basel)*. 10 (2018). <https://doi.org/10.3390/polym10121304>.
19. E. López-Ruiz, M. Perán, J. Cobo-Molinos, G. Jiménez, M. Picón, M. Bustamante, F. Arrebola, M.C. Hernández-Lamas, A.D. Delgado-Martínez, E. Montañez, J.A. Marchal, Chondrocytes extract from patients with osteoarthritis induces chondrogenesis in infrapatellar fat pad-derived stem cells., *Osteoarthr. Cartil.* 21 (2013) 246–258. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.10.007>.
20. M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, E. Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement., *Cytotherapy*. 8 (2006) 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.
21. F. Galisteo-González, J.A. Molina-Bolívar, S.A. Navarro, H. Boulaiz, A. Aguilera-Garrido, A. Ramírez, J.A. Marchal, Albumin-covered lipid nanocapsules exhibit enhanced uptake performance by breast-tumor cells., *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 165 (2018) 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.02.024>.
22. E. López-Ruiz, G. Jiménez, W. Kwiatkowski, E. Montañez, F. Arrebola, E. Carrillo, S. Choe, J.A. Marchal, M. Perán, Impact of TGF- β family-related growth factors on chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells isolated from lipoaspirates

and infrapatellar fat pads of osteoarthritic patients, *Eur. Cells Mater.* 35 (2018) 209–224. <https://doi.org/10.22203/eCM.v035a15>.

23. S.H. Keshel, S.N.K. Azhdadi, A. Asefnejad, M. Sadraeian, M. Montazeri, E. Biazar, The relationship between cellular adhesion and surface roughness for polyurethane modified by microwave plasma radiation, *Int. J. Nanomedicine*. 6 (2011) 641–647. <https://doi.org/10.2147/IJN.S17180>.

24. H. Makki, K.N.S. Adema, M.M.R.M. Hendrix, E.A.J.F. Peters, J. Laven, L.G.J. Van Der Ven, R.A.T.M. Van Benthem, G. De With, Weathering of a polyester-urethane clearcoat: Lateral inhomogeneities, *Polym. Degrad. Stab.* 122 (2015) 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2015.10.022>.

25. M. Gircys, B.J. Ross, Image Evolution Using 2D Power Spectra, *Complexity*. 2019 (2019) 7293193. <https://doi.org/10.1155/2019/7293193>.

26. K.C. Hung, C.S. Tseng, S.H. Hsu, Synthesis and 3D Printing of biodegradable polyurethane elastomer by a water-based process for cartilage tissue engineering applications, *Adv. Healthc. Mater.* 3 (2014) 1578–1587. <https://doi.org/10.1002/adhm.201400018>.

27. K.C. Hung, C.S. Tseng, L.G. Dai, S. hui Hsu, Water-based polyurethane 3D printed scaffolds with controlled release function for customized cartilage tissue engineering, *Biomaterials*. 83 (2016) 156–168. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.019>.

28. G.T. Howard, Biodegradation of polyurethane: A review, in: *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2002: pp. 245–252. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00051-3](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00051-3).

29. J.P. Dahl, M. Caballero, A.K. Pappa, G. Madan, W.W. Shockley, J.A. van Aalst, Analysis of human auricular cartilage to guide tissue-engineered nanofiber-based chondrogenesis: implications for microtia reconstruction., *Otolaryngol. Head. Neck Surg.* 145 (2011) 915–23. <https://doi.org/10.1177/0194599811419092>.

30. Y.T. Wen, N.T. Dai, S. hui Hsu, Biodegradable water-based polyurethane scaffolds with a sequential release function for cell-free cartilage tissue engineering, *Acta Biomater.* 88 (2019) 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.02.044>.

31. B. Kundu, M. Eltohamy, V.K. Yadavalli, S.C. Kundu, H.W. Kim, Biomimetic Designing of Functional Silk Nanotopography Using Self-assembly, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 8 (2016) 28458–28467. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b07872>.

32. Y.C. Kuo, R. Rajesh, Nerve growth factor-loaded heparinized cationic solid lipid nanoparticles for regulating membrane charge of induced pluripotent stem cells during differentiation, *Mater. Sci. Eng. C*. 77 (2017) 680–689. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.303>.

33. T. Dvir, B.P. Timko, D.S. Kohane, R. Langer, Nanotechnological strategies for engineering complex tissues, *Nat. Nanotechnol.* 6 (2011) 13–22. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.246>.
34. J. Li, X. Mou, J. Qiu, S. Wang, D. Wang, D. Sun, W. Guo, D. Li, A. Kumar, X. Yang, A. Li, H. Liu, Surface Charge Regulation of Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cell on Polarized Ferroelectric Crystal Substrate, *Adv. Healthc. Mater.* 4 (2015) 998–1003. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500032>.
35. Y.N. Sergeeva, T. Huang, O. Felix, L. Jung, P. Tropel, S. Viville, G. Decher, What is really driving cell–surface interactions? Layer-by-layer assembled films may help to answer questions concerning cell attachment and response to biomaterials, *Biointerphases*. 11 (2016) 019009. <https://doi.org/10.1116/1.4943046>.
36. N. Kohli, V. Sharma, S.J. Brown, E. García-Gareta, Synthetic polymers for skin biomaterials, in: *Biomater. Ski. Repair Regen.*, Elsevier, 2019: pp. 125–149. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102546-8.00005-4>.
37. C. Chocarro-Wrona, J. de Vicente, C. Antich, G. Jiménez, D. Martínez-Moreno, E. Carrillo, E. Montañez, P. Gálvez-Martín, M. Perán, E. López-Ruiz, J.A. Marchal, Validation of the 1,4-butanediol thermoplastic polyurethane as a novel material for 3D bioprinting applications., *Bioeng. Transl. Med.* 6 (2021) e10192. <https://doi.org/10.1002/btm2.10192>.
38. D. Martínez-Moreno, G. Jiménez, C. Chocarro-Wrona, E. Carrillo, E. Montañez, C. Galocha-León, B. Clares-Naveros, P. Gálvez-Martín, G. Rus, J. de Vicente, J.A. Marchal, Pore geometry influences growth and cell adhesion of infrapatellar mesenchymal stem cells in biofabricated 3D thermoplastic scaffolds useful for cartilage tissue engineering., *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 122 (2021) 111933. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.111933>.
39. S.H. Keshel, S.N.K. Azhdadi, A. Asefnejad, M. Sadraei, M. Montazeri, E. Biazar, The relationship between cellular adhesion and surface roughness for polyurethane modified by microwave plasma radiation., *Int. J. Nanomedicine*. 6 (2011) 641–647. <https://doi.org/10.2147/ijn.s17218>.
40. W. Dai, N. Kawazoe, X. Lin, J. Dong, G. Chen, The influence of structural design of PLGA/collagen hybrid scaffolds in cartilage tissue engineering, *Biomaterials*. 31 (2010) 2141–2152. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.070>.
41. P. Singh, J.E. Schwarzbauer, Fibronectin and stem cell differentiation - lessons from chondrogenesis, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 3703–3712. <https://doi.org/10.1242/jcs.095786>.

42. R. Cai, T. Nakamoto, N. Kawazoe, G. Chen, Influence of stepwise chondrogenesis-mimicking 3D extracellular matrix on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Biomaterials*. 52 (2015) 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.033>.
- 5 43. G. Luo, J. Wang, Y. Wang, B. Feng, J. Weng, Synthesis and characterisation of multifunctional alginate microspheres via the in situ formation of ZnO quantum dots and the graft of 4-(1-pyrenyl) butyric acid to sodium alginate., *J. Microencapsul.* 32 (2015) 129–136. <https://doi.org/10.3109/02652048.2014.950712>.
44. M. Santin, A. Motta, S.P. Denyer, M. Cannas, Effect of the urine conditioning film on ureteral stent encrustation and characterization of its protein composition, *Biomaterials*. 20 (1999) 1245–1251. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00026-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00026-5).
- 10 45. I. Sallent, H. Ctor Capella-Monsonís, D.I. Zeugolis, Chapter 3 Production and Characterization of Chemically Cross-Linked Collagen Scaffolds, (n.d.). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9095-5_3.
- 15 46. W. Wan, Y. Lin, A. Prakash, Y. Zhou, Three-dimensional carbon-based architectures for oil remediation: from synthesis and modification to functionalization, *J. Mater. Chem. A*. 4 (2016) 18687–18705. <https://doi.org/10.1039/C6TA07211A>.
47. P.H. Byers, J.F. Bonadio, 4 - The molecular basis of clinical heterogeneity in osteogenesis imperfecta: Mutations in type I collagen genes have different effects on collagen processing, in: J.K. Lloyd, C.R.B.T.-G. and M.D. in P. Sriver (Eds.), *Butterworths Int. Med. Rev.*, Butterworth-Heinemann, 1985: pp. 56–90. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-407-02312-3.50009-0>.
- 20 48. A. Krüger-Genge, S. Dietze, W. Yan, Y. Liu, L. Fang, K. Kratz, A. Lendlein, F. Jung, Endothelial cell migration, adhesion and proliferation on different polymeric substrates, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 70 (2018) 511–529. <https://doi.org/10.3233/CH-189317>.
- 25 49. C. Antich, G. Jiménez, J. de Vicente, E. López-Ruiz, C. Chocarro-Wrona, C. Griñán-Lisón, E. Carrillo, E. Montañez, J.A. Marchal, Development of a Biomimetic Hydrogel Based on Predifferentiated Mesenchymal Stem-Cell-Derived ECM for Cartilage Tissue Engineering, *Adv. Healthc. Mater.* 10 (2021) 2001847. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adhm.202001847>.
- 30 50. S. Ghosh, M. Laha, S. Mondal, S. Sengupta, D.L. Kaplan, In vitro model of mesenchymal condensation during chondrogenic development, *Biomaterials*. 30 (2009) 6530–6540. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.08.019>.
- 35 51. T. Masutani, S. Yamada, A. Hara, T. Takahashi, P.G. Green, M. Niwa, Exogenous Application of Proteoglycan to the Cell Surface Microenvironment Facilitates to

Chondrogenic Differentiation and Maintenance, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 7744.
<https://doi.org/10.3390/ijms21207744>.

52. T. Masutani, S. Yamada, A. Hara, T. Takahashi, P.G. Green, M. Niwa, Exogenous Application of Proteoglycan to the Cell Surface Microenvironment Facilitates to Chondrogenic Differentiation and Maintenance, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 7744.
<https://doi.org/10.3390/ijms21207744>.

53. J. Lu, X. Shen, X. Sun, H. Yin, S. Yang, C. Lu, Y. Wang, Y. Liu, Y. Huang, Z. Yang, X. Dong, C. Wang, Q. Guo, L. Zhao, X. Sun, S. Lu, A.G. Mikos, J. Peng, X. Wang, Increased recruitment of endogenous stem cells and chondrogenic differentiation by a composite scaffold containing bone marrow homing peptide for cartilage regeneration., *Theranostics*. 8 (2018) 5039–5058. <https://doi.org/10.7150/thno.26981>.

54. D. He, H. Li, Biomaterials affect cell-cell interactions in vitro in tissue engineering, *J. Mater. Sci. Technol.* 63 (2021) 62–72.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmst.2020.03.022>.

55. H. Muhammad, Y. Rais, N. Miosge, E.M. Ornan, The primary cilium as a dual sensor of mechanochemical signals in chondrocytes, *Cell. Mol. Life Sci.* 69 (2012) 2101–2107.
<https://doi.org/10.1007/s00018-011-0911-3>.

56. C.E. Farnum, N.J. Wilsman, Orientation of Primary Cilia of Articular Chondrocytes in Three-Dimensional Space, *Anat. Rec.* 294 (2011) 533–549.
<https://doi.org/10.1002/ar.21330>.

57. D.R. Rich, A.L. Clark, Chondrocyte primary cilia shorten in response to osmotic challenge and are sites for endocytosis, *Osteoarthr. Cartil.* 20 (2012) 923–930.
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.04.017>.

58. N.S. Stott, T.X. Jiang, C.M. Chuong, Successive formative stages of precartilaginous mesenchymal condensations in vitro: modulation of cell adhesion by Wnt-7A and BMP-2., *J. Cell. Physiol.* 180 (1999) 314–324. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199909\)180:3<314::AID-JCP2>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199909)180:3<314::AID-JCP2>3.0.CO;2-Y).

59. F. Accadbled, T.T. Pham, C. Thevenin Lemoine, J. Sales de Gauzy, Implantation of an Actifit® Polyurethane Meniscal Scaffold 18 Months After Subtotal Lateral Meniscectomy in a 13-Year-Old Male Adolescent, *Am. J. Case Rep.* 21 (2020) e920688. <https://doi.org/10.12659/AJCR.920688>.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método de funcionalización de elastómeros y polímeros biocompatibles basado en el revestimiento de estos biomateriales con PBA, preferentemente se refiere a un método de funcionalización con PBA del elastómero de poliuretano termoplástico de 1,4-butanediol (b-TPUe, que comprende diisocianato de difenilmetano [MDI] y 1,4-butanediol).

El método propuesto proporciona al biomaterial cambios en sus propiedades superficiales, lo que resulta en una reducción de la hidrofobicidad de estos biomateriales. Como consecuencia, mediante la funcionalización con PBA se consigue una mejora en la interacción célula-biomaterial y con ello un ambiente favorable para la adhesión y proliferación celular.

En un aspecto más concreto, la presente invención se refiere a una estructura compuesta esencialmente de un elastómero y/o polímero biocompatible que está funcionalizado con PBA, preferentemente el PBA se encuentra adherido a la superficie de esta estructura, haciendo al biomaterial más hidrófilo y con una mayor capacidad para la adhesión celular.

En una realización particular, el biomaterial funcionalizado del que está compuesta esencialmente dicha estructura es b-TPUe, que comprende diisocianato de difenilmetano [MDI] y 1,4-butanediol.

Otro aspecto de la invención comprende la estructura funcionalizada con PBA, que puede ser un andamio tisular, un implante tisular, un stent o una válvula; la cual se puede emplear como guía o sustrato para la reparación o regeneración de tejidos.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un andamio tisular funcionalizado con PBA que comprende la estructura de biomaterial funcionalizado, que además se emplea para cultivos en 3D *in vitro*.

Un aspecto adicional de la invención hace referencia a una composición que comprende una población de células, o el secretoma de ellas, dentro del andamio tisular funcionalizado del aspecto anterior.

Un último aspecto de la invención se refiere al uso de esta composición farmacéutica en el tratamiento de enfermedades que implican degeneración de tejidos, preferiblemente degeneración cartilaginosa, vascular, del músculo esquelético o de la piel, y de forma aún más preferente en el tratamiento de osteoartritis.

5

Definiciones

El término “biocompatible” hace referencia a la cualidad que se atribuye a cualquier elemento para indicar que este posee biocompatibilidad. La biocompatibilidad se entiende
10 como la capacidad que posee un elemento que es utilizado en un medio biológico sin llegar a interferir ni suponer un obstáculo para este. Así pues, un elemento biocompatible es aquel que está en contacto directo con los tejidos y fluidos internos del organismo, ya sea de forma breve o prolongada, sin desencadenar reacciones alérgicas, inmunitarias, o cualquier otro tipo de efecto nocivo que ejerza dicho contacto sobre el organismo.

15

El término “biomaterial” se refiere a materiales destinados a interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o sustituir tejidos, órganos o funciones del cuerpo, sin degradar o destruir el ambiente con el que coexisten. Por consiguiente, el término “biomaterial” hace referencia a un “material que tiene biocompatibilidad”, que también
20 puede ser conocido como un “material biocompatible”.

Así, en el contexto de este documento se entenderán los términos “biomaterial” o “material biocompatible” como todo aquel “elastómero y/o polímero” o “material polimérico” que es objeto del método de funcionalización con PBA.

25

El término “estructura de biomaterial”, se refiere a cualquier material biocompatible que sirva como sustrato o guía para la reparación de tejidos o su regeneración, como un andamio tisular, un implante tisular, un stent o una válvula.

Los términos “b-TPUe” o “elastómero de poliuretano termoplástico 1,4-Butanediol” en el contexto de este documento se entenderán como dicho elastómero el cual comprende diisocianato de difenilmetano [MDI] y 1,4-butanediol.

El término “funcionalización” hace referencia al procedimiento mediante el cual se insertan
35 grupos funcionales para facilitar la incorporación de otras moléculas, persiguiendo una mejora de las propiedades del elemento original. En el contexto del documento, el término

“funcionalizado” se refiere a aquel elemento que se encuentra revestido con el material de funcionalización.

El término “tratamiento” o “tratar” en el contexto de este documento se refieren al uso de una composición según la invención para reparar o regenerar tejidos, cuya degeneración son síntomas de una enfermedad, condición patológica o uno o más síntomas asociados con dicha enfermedad o condición. “Tratamiento” también abarca la prevención, mejora o eliminación de las secuelas fisiológicas de la enfermedad. Concretamente, el concepto “tratar” se puede interpretar como:

- i. Inhibir o prevenir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- ii. Paliar síntomas o aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causa la regresión de la enfermedad o la condición patológica;
- iii. Estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones el término “comprende”, que también podrá interpretarse como “consiste en”, 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.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Análisis de topografía por AFM. (A-F) Imágenes de altura capturadas con AFM para, (A) agua Mili Q como control, (B) etanol 70% (mezclado con agua Mili Q), utilizado para esterilizar los andamios, (C) tampón 2-propanol 100%, utilizado para diluir la hexametildiamina (necesaria para la funcionalización con PBA) y (D) tampón KH₂PO₄ 0,16 % Glutaraldehído utilizado para reticular las fibras de colágeno en la funcionalización con colágeno tipo I. (E) Imágenes de altura para los andamios funcionalizados con colágeno, mientras que (F) expone una fibra funcionalizada con PBA. En todos los casos, el ROI era de 5x5 µm. (G) Curvas de PSD de los análisis de tampón AFM en comparación con el control. (H) PSD de los andamios funcionalizados frente al control.

Figura 2.- Caracterización macroscópica y microscópica. (A) Imágenes captadas con lupa bajo luz transmitida de diferentes tampones. El control fue agua Mili Q, etanol al 70%

mezclado con agua Mili Q, isopropanol puro y tampón de glutaraldehído KH₂PO₄ al 0,16%. (B) La curva de absorbencia del estándar de ninhidrina se realiza mediante un espectrofotómetro. (C) Ensayo de ninhidrina para los andamios aminados (andamios incrustados en el tampón hexametilendiamina 2-prop) y el control (andamios naïve). (D) Imágenes confocales de autofluorescencia de andamios bTPUe funcionalizados con PBA, y control (no funcionalizado). (E) Imágenes confocales de inmunohistoquímica de andamios, inmunomarcados como funcionalización de colágeno tipo I, y control como andamios naïve. La ampliación fue de 10X.

10 **Figura 3.- Proliferación metabólica y celular de los andamios funcionalizados con bTPUe cargados con IPFP-MSCs.** (A) Respuesta de fluorescencia del azul Alamar ($\lambda = 570$ nm) para andamios bTPUe sin tratamiento (control), andamios funcionalizados con PBA y andamios funcionalizados con colágeno tipo I en los días 1, 3, 7, 14 y 21. (B) Curvas de aumento del pliegue de ADN para los andamios funcionalizados con PBA y los andamios funcionalizados con colágeno tipo I a lo largo de 21 días. (n=3) (***, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$; N.S., no significativo), (C-K) Imágenes confocales del ensayo Live/Dead (Thermo Fisher Scientific) de los andamios bTPUe naïve como control y de ambos protocolos de funcionalización. La ampliación fue de 10X.

20 **Figura 4.- Propiedades condro-inductoras del andamio funcionalizado con bTPUe cargado con IPFP-MSCs.** (A) Concentraciones de GAG obtenidas mediante el ensayo de papaína para el andamio bTPUe naïve y ambos protocolos de funcionalización el día 1 y el día 21. (B) Las concentraciones de ADN se obtuvieron mediante el ensayo de papaína para los andamios bTPUe naïve y ambos protocolos de funcionalización el día 1 y el día 21. (C) Relaciones GAG/ADN para los andamios bTPUe naïve y ambos protocolos de funcionalización en el día 1 y en el día 21 (n=3). (***, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$; ###, $p < 0,001$; ^^^, $p < 0,001$). (D) Incremento del pliegue de expresión génica obtenido mediante qPCR. El control utilizado fue IPFP-MSCs cultivadas en el día 0. PBA fueron andamios funcionalizados con PBA bajo medio celular normal, PBA Dif fueron los mismos andamios bajo medio condrogénico, ambos en el día 21. Los andamios de colágeno eran andamios funcionalizados con colágeno tipo I bajo medio normal, el colágeno Dif eran los mismos andamios bajo medio condrogénico, ambos en el día 21. Col2 era COL2A1. Sox9 era el factor de transcripción SOX-9. Acan era Aggrecan. Col1 era COL1A1. (n=3) (***, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$; ###, $p < 0,001$; ^^^, $p < 0,001$; N.S., no significativo). Las barras negras correlacionan los marcadores condrogénicos de los andamios funcionalizados frente al control. N.S: implica excepción en la correlación anterior. Barras azules correlacionan

control respecto a otros. Las barras grises correlacionan PBA con PBA Dif. Las barras verdes correlacionan Colágeno con Colágeno Dif.

Figura 5.- Imágenes MEB de los andamios de control, funcionalizados con PBA y

5 **funcionalizados con colágeno tipo I en el día 21.** (A-E) Imágenes de control, donde (B) muestra una ampliación de una célula viable. (E) muestra la escasa interacción célula-biomaterial. (F-J) Imágenes de PBA, (F) muestran claramente la presencia de MEC sobre las fibras del andamio, (G) representa las interacciones célula-célula. (J) Muestra las interacciones célula-MEC. (K-O) Imágenes de colágeno, donde (K) muestra la presencia
10 de MEC sobre la superficie del andamio, (L) muestra una célula similar a un condrocito y, (O) muestra la interacción célula-biomaterial y la morfología preservada de MEC.

Figura 6. Caracterización de Células Madre pluripotentes. A) Marcadores FACS para

la capacidad de diferenciación. B) Capacidad de diferenciación. Los controles fueron IPFP-
15 MSCs con DMEM, 10%FBS y 1%P/S. Los medios de diferenciación fueron: El medio osteogénico aplicado fue StemMACS OsteoDiff 130-091-678, Miltenyi. El medio adipogénico aplicado fue StemMACS adipoDiff 130-091-677, Miltenyi. El medio condrogénico aplicado fue DMEM complementado con 10 ng/ml de TGF- β 1, 0,1 μ M de dexametasona, 40 μ g/ml de L-prolina, 50 μ g/ml de L-ascorbato-2-fosfato y 50 mg/ml de
20 ITS. (Barra de escala = 110 μ m).

Figura 7. Proliferación metabólica y celular de los andamios funcionalizados con bTPUe cargados con IPFP-MSCs. A), B) Estudio de la actividad metabólica realizado en

los días 0 y 3 utilizando el reactivo Alamar Blue. Los andamios FF han sido funcionalizados
25 con colágeno utilizando diferentes concentraciones de glutaraldehído (0%; 0,16% y 0,625%) y glicina (0M, 0,5M, 0,2M, respectivamente). El control positivo sólo se ha sembrado sin funcionalización previa. (***) $p < 0.001$). Imágenes obtenidas con el microscopio confocal Nikon Eclipse Ti tras el tratamiento de los andamios FF con el kit de citotoxicidad/viabilidad LIVE/DEAD®. C) Control positivo. D) 0% de glutaraldehído y 0M de glicina E) 0,16% de glutaraldehído y 0,5M de glicina. F) 0,625% de glutaraldehído y 0,2M
30 de glicina.

Figura 8. Desarrollo del protocolo de funcionalización. (A) Ensayo del material de PLA

con solución de isopropanol a diferentes diluciones 100%, 75% y 50%. Barras de escala:
35 2 mm. (B) Ensayo de material de PLA con solución de DMSO en diferentes diluciones al 100%, 75% y 50%. Barras de escala: 2 mm.

Figura 9. Ensayo de proliferación durante 21 días y viabilidad a 1, 7, 14, 21 días y en diferentes condiciones (control, PBA y colágeno) en PLA. (A) Unidades de fluorescencia relativas en control, PBA y colágeno. (B) Aumento del doble de la proliferación de fibroblastos. La significación estadística se indica como *** ($p < 0,005$), NS (sin significación). (C) Ensayo de Confocal de los andamios con luz transmitida, barra de escala: 200 μm .

Figura 10. Imágenes representativas por SEM de los fibroblastos a través del andamio de PLA.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Método de funcionalización de biomateriales con PBA

Los inventores han estudiado dos métodos de funcionalización de elastómeros y/o polímeros biocompatibles para probar si tal funcionalización permite solventar las limitaciones en cuanto a adhesión y proliferación celular asociada a la hidrofobicidad de tales biomateriales.

Para conseguir este objetivo, se utilizó como biomaterial el elastómero de poliuretano termoplástico 1,4-Butanediol (b-TPUe), el cual fue sometido a ambos métodos de funcionalización: (i) con colágeno tipo I, el cual ya ha sido descrito en el estado del arte; y (ii) con PBA. Posteriormente, para probar el éxito de la funcionalización, observaron los cambios que esta provoca en el biomaterial y compararon los resultados de ambos métodos. Para ello, se llevaron a cabo estudios que permitieron evaluar la actividad metabólica celular y la viabilidad celular de los andamios formados con el biomaterial funcionalizado, además de evaluar también su potencial condrogénico y analizar la morfología celular y del aspecto de la MEC. Según los datos obtenidos, en ambos casos hubo síntesis de MEC y presencia de marcadores condrogénicos, por lo que ambos métodos de funcionalización suponen una mejora en la interacción célula-biomaterial e inducen condrogénesis sin precisar un medio especial para ello.

En su aspecto más general, en un primer aspecto, la presente invención propone un método de funcionalización de un elastómero y/o polímero biocompatible comprendido o que constituye un biomaterial o estructura, que comprende los siguientes pasos:

- a) Opcionalmente esterilizar previamente el elastómero y/o polímero biocompatible comprendido o que constituye un biomaterial o estructura,
- b) aminor el elastómero y/o polímero biocompatible comprendido o que constituye el biomaterial o estructura poniéndolo en contacto con una solución de amina,
- c) poner en contacto el producto resultante del paso (b) con una solución que comprende ácido 1-pirenebutírico (PBA), y
- d) opcionalmente realizar uno o más lavados del elastómero y/o polímero biocompatible revestido con PBA del paso (c) con una solución salina, preferiblemente con suero salino (PBS) estéril.

En una realización particular del primer aspecto de la invención, el biomaterial funcionalizado mediante el método del primer aspecto de esta invención comprende o consiste en un elastómero que comprende o consiste en PLA (ácido poli-láctico), PCL (poli-caprolactona), b-TPUe (elastómero de poliuretano termoplástico 1,4-Butanediol), PLGA (co-polímero ácido poli(láctico-co-glicólico)) o cualquiera de sus combinaciones; preferiblemente el elastómero es de poliuretano termoplástico 1,4-Butanediol (b-TPUe).

Otra realización particular del primer aspecto de la invención se caracteriza porque en el proceso de aminación del paso (b) se emplea una solución que contiene una amina de cadena larga y no cíclica, disuelta en 2-propanol. Preferentemente, la amina de la solución para el proceso de aminación se selecciona de la lista que consiste en: 1,6-hexanodiamina; (2-metilbutil)amina; metoxipoliglicol amina; poli(etilenglicol) metiléter amina; 1,6-hexanodiamina-1,6-¹³C₂; N-Boc-1,6-hexanodiamina.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el PBA del paso (c) se emplea en una solución de PBA disuelto en 2-propanol, preferiblemente a una concentración de 5mM, o alternativamente en una solución de PBA disuelto en DMSO, preferiblemente a una concentración de 5mM.

A pesar de que b-TPUe es apropiado para regeneración de cartílago y que destaca por sus buenas propiedades mecánicas y su capacidad de recuperación altamente elástica, su carácter hidrofóbico hace que dicho biomaterial no proporcione un ambiente favorable para la adhesión y proliferación celular. La funcionalización con PBA propuesta en esta memoria de patente supone una adición de componentes en la superficie del b-TPUe y una

reducción de su hidrofobicidad, mejorando por tanto la interacción célula-biomaterial e incrementando la adhesión y proliferación celular.

Los biomateriales funcionalizados con PBA mediante el método propuesto son útiles en el
5 campo de la biomedicina, principalmente en el campo de la ingeniería tisular o para el cultivo in vitro 3D, entre otras aplicaciones.

Estructura compuesta por el biomaterial funcionalizado con PBA

10 En otro aspecto de la presente invención, que denominaremos como segundo aspecto de la invención, la presente invención se refiere a una estructura compuesta esencialmente por el elastómero y/o polímero biocompatible que ha sido funcionalizado con PBA mediante el método descrito en el primer aspecto de esta invención. Es decir, la presente invención hace referencia a un elastómero y/o polímero biocompatible que ha sido funcionalizado con
15 PBA obtenido u obtenible a través de la metodología del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones particulares. Preferiblemente, el biomaterial funcionalizado mediante el método del primer aspecto de esta invención es un elastómero que comprende o consiste en PLA (ácido poli-láctico), PCL (poli-caprolactona), b-TPUe (elastómero de poliuretano termoplástico 1,4-Butanediol), PLGA (co-polímero ácido
20 poli(láctico-co-glicólico)) o cualquiera de sus combinaciones; preferiblemente el elastómero es de poliuretano termoplástico 1,4-Butanediol (b-TPUe).

En una realización particular del segundo aspecto de la invención, el PBA usado en el método de funcionalización se encuentra adherido a la superficie de la estructura objeto de
25 este segundo aspecto. Esta adhesión proporciona cambios en las propiedades superficiales de dicha estructura, haciendo al biomaterial que la conforma más hidrófilo, lo que se traduce en una mejora de la interacción célula-biomaterial. De esta manera, se mantiene la viabilidad celular y se aumenta el ratio de proliferación celular.

30 En otra realización particular, dicha estructura está compuesta esencialmente por b-TPUe, también conocido como el elastómero de poliuretano termoplástico de 1,4-butanediol, que comprende diisocianato de difenilmetano [MDI] y 1,4-butanediol.

Otro aspecto de la invención, tercer aspecto de la invención, se refiere a un andamio tisular,
35 un implante tisular, un stent o una válvula que comprende la estructura funcionalizada con PBA de acuerdo al segundo aspecto de la invención.

En una realización particular del tercer aspecto de la invención, la estructura funcionalizada con PBA consiste en un andamio tisular compuesto esencialmente por un elastómero de poliuretano termoplástico de 1,4-butanediol que comprende diisocianato de difenilmetano [MDI] y 1,4-butanediol.

En una realización preferida, el andamio tisular, implante tisular, stent o válvula que comprende la estructura funcionalizada con PBA de este tercer aspecto de la invención, puede ser empleada como guía o sustrato para la reparación o regeneración de tejidos.

Uso en cultivos 3D *in vitro*

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un andamio tisular funcionalizado con PBA, según cualquiera de los aspectos segundo o tercero o cualquier realización preferida de los mismos, que comprende la estructura de biomaterial funcionalizado, para cultivos 3d *in vitro*

En una realización particular, el andamio tisular funcionalizado con PBA, según cualquiera de los aspectos segundo o tercero o cualquier realización preferida de los mismos, se usa en el cultivo 3d *in vitro* para el estudio de la diferenciación celular, la producción a gran escala de vectores para uso en terapia génica a partir de la expansión en 3D de células empaquetadoras, o el cultivo y proliferación de células maduras o células madre en 3D.

Tratamiento de enfermedades que implican degeneración de tejidos

Otro aspecto de la invención, un cuarto aspecto de la invención, hace referencia a una composición, preferiblemente una composición farmacéutica que opcionalmente comprende excipientes, adyuvantes o vehículos, que comprende una población de células, y/o el secretoma de dichas células, adherido al andamio tisular funcionalizado según cualquiera de los aspectos segundo o tercero o cualquier realización preferida de los mismos.

En una realización particular del cuarto aspecto de la invención, la composición comprende células maduras o células madre mesenquimales, pluripotentes y/o embrionarias. Preferiblemente, dichas células maduras comprenden condrocitos, células cutáneas,

células endoteliales, células musculares lisas, osteoblastos, células empaquetadoras para producción de vectores, fibroblastos, cardiomiocitos y/o miocitos.

Un último aspecto de la invención se refiere al uso de la composición, preferiblemente composición farmacéutica, del cuarto aspecto de la invención para el tratamiento de enfermedades que implican degeneración de tejidos, preferiblemente degeneración cartilaginosa, vascular, del músculo esquelético o de la piel, y de forma aún más preferente en el tratamiento de osteoartritis.

10 MODOS DE REALIZACIÓN

Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

15

Caracterización y verificación de los protocolos de funcionalización en b-TPUe

Los métodos de funcionalización implican algunos reactivos agresivos, por lo que es necesario evaluar su efecto sobre el biomaterial. La topología de la superficie de los andamios de b-TPUe se investigó utilizando una lupa y un AFM [23], para sondear cualquier variación superficial de la macro y/o microestructura de las fibras derivadas por los procesos de funcionalización.

Para ello, los andamios de b-TPUe se sumergieron en diferentes soluciones durante 24 horas: Agua MilliQ (Figura 1A), que establece el control; etanol al 70% (Figura 1B) utilizado en la esterilización de los andamios; isopropanol utilizado en la solución de 1,6-hexanodiamina (Figura 1C) implicada en el primer paso de la funcionalización con PBA; y, finalmente, tampón monopotásico 0,6 M a pH 7.4, donde se disolvió el glutaraldehído (Figura 1D), un paso fundamental en la funcionalización con colágeno tipo I. El AFM no mostró ninguna modificación superficial perceptible en el tampón monopotásico; sin embargo, los efectos producidos por el etOH 70% y el isopropanol aumentaron la rugosidad pero no apareció ninguna degradación (variación inferior a 100 nm, como puede verse en las barras de leyenda de las Figuras 1B y 1C) [24].

Los andamios ya funcionalizados con colágeno (Figura 1E) y PBA (Figura 1F) fueron analizados bajo AFM para calcular la presencia de cualquier modificación superficial. La

Figura 1E sondeó cómo se alineaban las fibras de colágeno que rodeaban los filamentos del andamio añadiendo patrones de varillas de 150 nm de diámetro. La figura 1F confirmó la presencia de material externo adherido a la superficie del b-TPUe. En este caso, el PBA formaba pequeñas montañas de 200-400 nm de altura. Además, se realizó la densidad del espectro de potencia (PSD) por AFM para calcular cuantitativamente cualquier posible intercambio en los patrones de la superficie [25]. La figura 1G muestra los efectos de los tampones sobre los andamios frente al control, mientras que la figura 1H compara los andamios funcionalizados con respecto al control. Aquí, es interesante destacar que el tampón glutaraldehído no modifica la rugosidad de las fibras del andamio. Por el contrario, los tampones EtOH 70% y 2-prop mostraron un aumento de la altura de la rugosidad, manifestado en frecuencias inferiores a 1 micra. Siguiendo la consideración anterior, la funcionalización del colágeno aumentó la altura de la rugosidad a frecuencias superiores a 1 micra, induciendo que esas fibras de colágeno se distribuyeran por la superficie del andamio dejando menos de 1 micra entre cada fibra. Además, la comparación de las curvas PSD del tampón de funcionalización PBA y del tampón 2-propanol comparte tendencias similares, lo que implica que no hay una modificación significativa de la microestructura del andamio más allá de la aparición de picos de 400 nm que no se encontraron bajo el tampón 2-propanol.

La rugosidad de la superficie se evaluó a nivel macroscópico mediante imágenes tomadas con la lupa Leica Si9, pero no se encontraron diferencias (Figura 2A). Comparando estas imágenes con los resultados anteriores, se puede estimar que cualquier variación percibida por AFM no modifica la microestructura del andamio ni la integridad de las fibras. En los tampones EtOH al 70% y 2-prop, se pueden distinguir algunos puntos más brillantes para el control y el tampón glutaraldehído, lo que se explica por las curvas de la Figura 1G. Además, se puede apreciar que el tamaño de dichos puntos es mayor en el 2-prop que en el 70% de EtOH, como muestra la PSD (Figura 2G).

En cuanto a la verificación de los protocolos de funcionalización, junto con el AFM (Figuras 1E-F), se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para comprobar el resultado final. Dado que el método de funcionalización con PBA consta de dos pasos, el proceso de aminación y la adición de PBA, para comprobar que es posible la unión de PBA, es necesario comprobar la aminación previa de los andamios (ver datos suplementarios, sección 1.2.).

Como puede verse en la Figura 2B, la curva estándar de ninhidrina sigue una tendencia dosis-respuesta, con la siguiente ecuación [25]:

$$y = \frac{A1 + (A2 - A1)}{1 + 10^{(\log x_0 - x) \cdot p}} \quad (R^2 = 0,988)$$

5

Donde: A1=2,626; A2=100,640; logx0=34,587

Esta tendencia corresponde al modelo sigmoide o modelo de Hill [26], uno de los dos modelos farmacocinéticos comúnmente utilizados para correlacionar la respuesta farmacológica con las concentraciones del fármaco. Este modelo sigue la siguiente ecuación:

10

$$E = \frac{E_{max} \cdot C^y}{CE_{50}^y + C^y}$$

15

Donde E_{max} sería V_{max} y CE_{50} sería K_m , correspondiente a la ecuación de Michaelis-Menten, siendo y un parámetro.

Los andamios de b-TPUe tratados con 1,6-hexanodiamina mediante la adición de ninhidrina, mostraron un promedio de absorbancia significativamente aumentado ($p < 0,001$) en comparación con los andamios no aminados, lo que permite comprobar que el proceso de aminación fue eficiente (Figura 2C). Para finalizar con el PBA, la Figura 2D muestra la autofluorescencia del b-TPUe sin funcionalizar y después del tratamiento con PBA, pudiendo distinguirse los patrones de montaña mostrados en el AFM como puntos de fluorescencia más brillantes.

20

También se realizó un ensayo de inmunofluorescencia para visualizar los componentes de la funcionalización. La inmunofluorescencia de la Figura 2E para comprobar la presencia de colágeno tipo I (en verde), muestra la anterior distribución homogénea sin diferencia entre los puntos de fluorescencia, y el colágeno se puede apreciar sobre las fibras en diferentes planos focales indicando que la funcionalización del colágeno se produjo en todo el andamio.

30

En conclusión, los resultados mostraron diferencias en la rugosidad del material dependiendo de la condición a la que fueron sometidos, pero no se observó ninguna

degradación aparente y, lo que es más importante, se puede establecer que la funcionalización tuvo éxito en ambos casos.

Evaluación de la actividad metabólica celular y la viabilidad celular en andamios funcionalizados con PBA y colágeno tipo I

Los procesos de funcionalización tienen como objetivo mejorar las propiedades superficiales del b-TPUe dado que es un material altamente hidrofóbico. La reducción de la hidrofobicidad y la adición de diferentes componentes a la superficie de los andamios pueden mejorar la interacción célula-biomaterial y, en consecuencia, mantener la viabilidad celular y aumentar la tasa de proliferación. Para ello, se sembraron IPFP-MSCs en los andamios de b-TPUe funcionalizados y se midió la actividad metabólica para evaluar la adhesión y proliferación celular mediante el reactivo Alamar Blue (Figuras 3A).

Las IPFP-MSC se aislaron de pacientes con osteoartritis y se expandieron hasta pasajes bajos 3-6. Las IPFP-MSC se caracterizaron (Figura 6) siguiendo las directrices propuestas por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) [20]. A continuación, las IPFP-MSCs (700.000 células por pocillo) se sembraron sobre los andamios y se incubaron durante 4 h a 37°C, aplicando después un medio fresco. La progresión de la actividad metabólica se monitorizó durante 21 días para todas las condiciones. En el caso del colágeno de tipo I, se realizaron estudios adicionales para ajustar la concentración de glutaraldehído (Figura 7). Los resultados del día 3 confirmaron que la concentración óptima de glutaraldehído para la funcionalización del colágeno era del 0,16%.

En el día 1, la diferencia en la actividad metabólica y, por lo tanto, en la proliferación celular se encontró entre todas las condiciones ($p < 0,001$) (Figura 3A). Ambos métodos de funcionalización presentaron una actividad metabólica superior a la de los controles. Además, los andamios funcionalizados con colágeno tipo I (0,16% de glutaraldehído) mostraron una actividad metabólica mayor que los andamios funcionalizados con PBA, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$). En el día 3, la actividad metabólica aumentó en el control y en los andamios funcionalizados con PBA, mientras que se mantuvo en los andamios funcionalizados con colágeno tipo I ($p < 0,05$) (Figura 3A). Aunque en el día 3, el control mostró un aumento de su proliferación, los niveles metabólicos volvieron a descender y se mantuvieron el resto de los días (Figura 3A). En el día 7, la actividad metabólica aumentó en los andamios funcionalizados con colágeno tipo I, mientras que los funcionalizados con PBA se mantuvieron ($p < 0,05$). Aun así, ambos

métodos de funcionalización siguieron mostrando una mayor actividad metabólica en comparación con el control. Por el contrario, en el día 14 y en el día 21 la tendencia a la disminución continuó en los andamios funcionalizados con colágeno tipo I, mientras que el método PBA se observó el mantenimiento (día 14) o el aumento (día 21) de la proliferación en comparación con ambos, la funcionalización con colágeno y el control ($p < 0,001$).

Además, para comprobar si la reducción de la actividad metabólica se correlacionaba con una reducción de la densidad celular, se realizó la cuantificación del ADN tanto para el método de funcionalización con PBA como para la funcionalización con colágeno tipo I. El control no se computó porque no se pudo extraer suficiente ADN en ningún día. La figura 3B no presenta diferencias significativas en la densidad celular entre PBA y colágeno tipo I a lo largo de los 21 días.

En resumen, estos resultados indican que la funcionalización con PBA induce una mayor adhesión celular y actividad metabólica que las obtenidas mediante la funcionalización con colágeno tipo I. A pesar de ello, el aumento de la actividad metabólica no se extrapola al contenido celular como muestran las curvas de aumento del pliegue de ADN.

No obstante, las imágenes obtenidas de las muestras del andamio de b-TPUe en las diferentes condiciones mediante microscopía confocal corroboraron los resultados obtenidos con el ensayo de azul Alamar y el aumento del pliegue del ADN. El estudio de viabilidad se realizó en los días 1, 7 y 21 después de la siembra de células (Figuras 3C-3K). Los resultados se correlacionaron con los ensayos proliferativos, con un aumento de la adhesión celular en el día 1 significativamente mayor en los andamios de colágeno tipo I (Figura 3E) que en el control (Figura 3C) y en la funcionalización PBA (Figura 3D). Se puede apreciar que las células se encontraron incluidas en las regiones entre las fibras, algo que no ocurre en los otros casos. Además, en el día 7, la viabilidad siguió manteniéndose en ambos andamios funcionalizados (Figuras 3G y 3H) y, aún más, la proliferación celular permitió que esas células colonizaran toda la superficie de las fibras. Por el contrario, el control (Figura 3F) no presentaba células vivas en la mayoría de las superficies del andamio. Finalmente, en el día 21 (Figuras 3I-3K), la viabilidad se conservó con una viabilidad muy pobre en el control. En cambio, la distribución de las células sobre los andamios funcionalizados con PBA y con colágeno tipo I fue ligeramente diferente, mientras que en el caso del PBA las células rodearon las fibras, en el del colágeno tipo I parecen crecer formando aglomeraciones.

Evaluación del potencial condrogénico de las estructuras de biomaterial funcionalizadas

Teniendo en cuenta los resultados de los ensayos metabólicos y la viabilidad celular, evaluamos si las células estaban produciendo una matriz condrogénica. Para ello, se
5 calculó la cuantificación de GAGs frente a la concentración de ADN (Figuras 4A-4C) y se analizó la expresión génica mediante PCR (Figura 4D).

Para la cuantificación de los GAGs, los andamios se sembraron durante 21 días en un medio celular común. La determinación de los GAGs mostró diferencias significativas entre
10 las muestras funcionalizadas y los controles (Figura 4A, $p < 0,001$). Aunque los andamios de control presentaban un número similar de células (Figura 4B), no se extrajo contenido de GAGs de estos andamios. Después de 21 días, aunque la concentración de GAGs disminuyó para ambos métodos de funcionalización, presentaron resultados más altos en comparación con el control. Además, los andamios funcionalizados con PBA mostraron un
15 aumento significativo del contenido de GAGs que los andamios funcionalizados con colágeno tipo I. La figura 4B muestra que las concentraciones de ADN en los andamios funcionalizados con PBA en ambos momentos no presentan diferencias estadísticas, hecho que concuerda con las anteriores curvas de aumento del pliegue de ADN (figura 3B). Además, los andamios funcionalizados con colágeno tipo I presentaron mayores
20 concentraciones de ADN en ambos días ($p < 0,001$). El contenido de ADN de los controles no era despreciable, pero, en cualquier caso, era significativamente menor que el de los métodos de funcionalización. Además, la ausencia de cualquier GAG en ambos días declara que las células adheridas a los filamentos desnudos no producen MEC (PBA, $p < 0,05$; Colágeno, $p < 0,001$).

No obstante, la representación de la relación entre las concentraciones de GAGs frente a las de ADN (Figura 4C) mostró la diferencia significativa de los andamios funcionalizados con las muestras de control ($p < 0,001$). Además, los andamios funcionalizados con PBA presentaron una ratio de síntesis de MEC mayor que los andamios funcionalizados con
30 colágeno tipo I, sin embargo, en las muestras de colágeno tipo I la ratio de síntesis se conservó a lo largo de los 21 días, mientras que, en el protocolo de PBA esa producción se redujo ($p < 0,001$).

Para explorar el potencial condroinductivo, los andamios funcionalizados se trataron con
35 medios condrogénicos y normales durante 21 días. Los resultados de la expresión génica (Figura 4D) mostraron que los andamios funcionalizados presentan un mayor potencial

condrogénico que los controles ($p < 0,001$), excepto para Sox9 en los casos de medio diferenciado y PBA y aggrecan (Acan) en PBA diferenciado, donde no se encontraron diferencias significativas. Sorprendentemente, en los andamios funcionalizados cultivados con un medio normal la expresión génica para el colágeno tipo II, Sox9 y Acan fue mayor que en los cultivados en el medio de diferenciación, lo que implica que no es necesario utilizar factores de crecimiento adicionales. Los andamios funcionalizados con colágeno tipo I con medio normal destacaron sobre el resto de casos con casi 10000 veces más expresión de colágeno tipo II y 1000 veces de Acan que el control ($p < 0,001$). Además, la expresión del colágeno tipo I en los andamios funcionalizados fue significativamente menor que en el control (Figura 4D, $p < 0,001$).

En conclusión, las relaciones GAG/ADN y los ensayos de expresión génica indican que, en contraste con los andamios de control, los andamios funcionalizados produjeron más MEC y son condroinductores.

Análisis de la morfología celular y del aspecto de la MEC mediante microscopía electrónica de barrido (MEB)

Tras confirmar que los andamios funcionalizados mostraban una alta viabilidad celular durante 21 días y que eran capaces de producir MEC sin ningún factor de crecimiento adicional, se evaluó la morfología celular y el aspecto de la MEC mediante ensayos de MEB después de 21 días (Figura 5). Las figuras 5A, 5D, 5G y 5J representan los andamios de control a diferentes aumentos, donde se puede distinguir perfectamente la presencia de células vivas adheridas sobre la superficie del andamio, pero dichas células presentaban una pobre interacción célula/biomaterial (figura 5G y 5J). Se puede señalar que, correlativamente con los resultados de expresión de MEC, no se encontró presencia de MEC.

Por el contrario, los andamios funcionalizados con PBA (Figuras 5B, 5E, 5H y 5K) mostraron un mayor contenido celular que el control y hubo una alta presencia de MEC formando una superficie homogénea que cubría las fibras del andamio. La Figura 5K muestra cómo las IPFP-MSC diferenciadas interactúan entre sí y en la Figura 5H se aprecia cómo las células están inmersas en una MEC densa y se expandieron sobre ella.

Los andamios de colágeno tipo I fueron, con diferencia, los que presentaron un mayor número de células y con la presencia de una gran cantidad de MEC (Figura 5C, 5F, 5I y

5H). Todas las superficies de los andamios estaban cubiertas por contenido celular de la MEC y células. Lo más interesante es que las IPFP-MSC diferenciadas produjeron MEC sobre los ángulos que formaban secciones transversales de las fibras. En la Figura 5H se puede encontrar la presencia de una célula con apariencia de condrocito con forma esférica y algunos cilios incrustados en la MEC. Además, se observó una respuesta célula-biomaterial mucho más natural que en otros casos con células que crecían a través de fibras de andamios naïve (Figura 5I).

En resumen, el ensayo de MEB confirmó todos los resultados anteriores, en los que los andamios de control presentaban muy pocas células con una morfología similar a la apoptótica y los métodos funcionalizados mostraban un mayor número de células con una morfología similar a la de los condrocitos y con una cantidad considerable de MEC que evolucionaba tanto en las células como en los andamios.

Análisis del método de funcionalización usando la mezcla de 2-propanol en vez de DMSO en otro material (PLA, ácido poliláctico) y con otra línea celular (fibroblastos)

Para comprobar la resistencia del material de PLA frente a las diferentes soluciones utilizadas en el protocolo de funcionalización protocolo de funcionalización, los andamios se sumergieron en isopropanol, dimetilsulfóxido (DMSO) a diferentes concentraciones. También se añadió urea a la solución de isopropanol y 1,6-hexano diamina a diferentes concentraciones y se midió la absorbancia (Figura 8). Por un lado, el PLA sumergido en la solución de isopropanol no cambió sus propiedades estructurales en ninguna de las concentraciones expuestas después de 24 horas (Figura 8). Se observó la misma estructura del andamio se observó la misma estructura del andamio en las tres condiciones. Por lo tanto, el protocolo optimizado de funcionalización pudo ser con la solución de isopropanol al 100%. Sin embargo, con la solución de DMSO, se observaron algunos cambios en el material en la Figura 8. Con la solución de DMSO al 100%, el material se fundió tras 30 minutos de incubación, mientras que con la solución al 75% tardó hasta 180 minutos en generar burbujas como resultado de la degradación del PLA. Por lo tanto, se eligió la concentración de DMSO al 50% como la ideal para la funcionalización, ya que mostró el andamio intacto tras 24 horas de exposición.

Para medir la proliferación celular de los fibroblastos, se realizó el ensayo de actividad metabólica Alamar Blue HS se realizó midiendo las unidades de fluorescencia durante un máximo de 21 días (Figura 9). En el primer día se observaron diferencias significativas

entre las tres condiciones mostrando una mayor adaptación al material de las células en la condición de colágeno (Figura 9A). En los días 7, 14 y 21, el control disminuyó bruscamente, mostrando una baja actividad metabólica. En la condición PBA, del día 1 al 7 se observó un comportamiento de crecimiento lineal, pasando a los días 14 y 21 con un crecimiento exponencial, siendo la condición con mayor actividad metabólica al día 21. Por otro lado, la condición de colágeno mostró una mejor adaptación al material en el primer día, pero a medida que pasaba el tiempo, la proliferación celular disminuyó hasta el día 21, cuando volvió a aumentar. Por un lado, se puede observar cómo las células de control disminuyeron su crecimiento desde el día 1. Por otro lado, el estado del colágeno disminuyó ligeramente por encima del control. Por otro lado, el PBA mostró un incremento exponencial respecto al primer día, llegando a crecer seis veces más que en la condición de control (Figura 9B).

Para evaluar la morfología y la dispersión de las células a lo largo de los andamios, se realizó un ensayo Live/Dead™ Viability/Cytotoxicity (Invitrogen). Como se describe con más detalle en la sección 4.5, las células vivas se tiñeron de verde y las muertas de rojo, y se tomaron imágenes los días 1, 7, 14 y 21 (Figuras 9C). Como puede observarse, en el primer día de análisis, en las condiciones PBA y control, los fibroblastos presentaban una morfología redonda rodeando las fibras de PLA, mientras que en la condición de colágeno mostraban una forma alargada alrededor de la fibra (Figura 4). Sin embargo, en el día 7, las células eran alargadas en la condición de PBA, asemejándose a la condición de colágeno, pero se puede observar que había una mayor confluencia de células viables en la condición de colágeno que en la condición de PBA (Figura 9C). Mientras tanto, en la condición de control, las células redondas permanecieron sin adheridas a la superficie del andamio. Además, se encontraron muchas más células rojas en la condición de control que en sus homólogos. En el día 14, el colágeno y el PBA mostraron resultados muy similares, sin embargo, en la condición de control la mayoría de las células eran inviables (Figura 9C). Por último, en el día 21 no se encontraron células en la condición de control y fueron limitadas en la condición de colágeno. En general, PBA mostró el mejor resultado de viabilidad celular en comparación con las otras condiciones.

Las imágenes de SEM nos permitieron observar la estructura del andamio con más detalle (Figura 10). En primer lugar, en la condición de control, se aprecia poca confluencia celular y sólo se pueden células. En segundo lugar, en la condición PBA, la superficie del andamio está completamente cubierta por fibroblastos sin espacios visibles entre ellos. Por último,

el andamio funcionalizado con colágeno está cubierto por células, aunque menos confluentes que en la condición PBA. Estas células son más alargadas y no forman estructuras tan complejas y similares a la MEC como en la condición PBA.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

Procesamiento de las muestras

Las IPFP-MSCs se extrajeron directamente de pacientes con osteoartritis del Hospital Universitario de Málaga, España. La aprobación ética para el estudio se obtuvo del Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario de Málaga, España (número de permiso ético: 02/022010 Hospital Virgen de la Victoria, Málaga). Se obtuvo el consentimiento informado del paciente para todas las muestras utilizadas en este estudio. La almohadilla de grasa de Hoffa se recogió del interior de la cápsula, excluyendo las áreas vasculares y las regiones sinoviales. Los protocolos de aislamiento y cultivo de las IPFP-MSCs se realizaron según López-Ruiz et al. [19]. Las IPFP-MSCs se caracterizaron siguiendo los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) [20].

Impresión de estructuras en 3D

El diseño del andamio deseado se realizó con el programa Cura 3D, y se llevó a cabo su impresión con la bioimpresora Monoprice Mini V2 dentro de una cabina de flujo laminar de clase II. La bioimpresora se limpió a fondo con etanol al 70 % y se dejó toda la noche bajo los rayos UV.

Los andamios se diseñaron para ajustarse a una placa multipocillo de 48 pocillos. Por lo tanto, adoptaron una geometría cilíndrica: diámetro de 10 mm, la altura de 2 mm; altura de la capa de 200 μ m. La velocidad de movimiento del extrusor se fijó en 14 mm/s y la temperatura de trabajo fue de 230 °C. Por último, la tasa de flujo (la velocidad a la que el filamento se desplaza por el extrusor) se determinó en 1 mm/s.

Para garantizar la completa esterilidad de los andamios, se colocaron en una placa de Petri y se lavaron con etanol al 20 %, 50 % y 70 %. Tras el lavado, se aplicó radiación UV durante 1 hora en ambas caras. Se realizó un nuevo lavado con PBS al 1% de antibiótico (P/S) para eliminar el etanol que pudiera quedar. Finalmente, los andamios de b-TPUe se

sumergieron en PBS al 1% de antibiótico, y se incubaron hasta los protocolos de funcionalización.

Funcionalización con PBA

5

Los andamios se colocaron en una placa multipocillo y se sumergieron en una solución de isopropanol al 10% de 1,6-hexanodiamina durante 30 minutos a temperatura ambiente para el método de funcionalización con PBA. Después, los andamios se enjuagaron en ácido 1-pireno-butírico (PBA; Sigma-Aldrich) a 5 mM DMSO (Sigma-Aldrich) o bien a 5mM 2-propanol (Sigma-Aldrich). Finalmente, se realizaron varios lavados con PBS [1,2].

10

Funcionalización con colágeno tipo I

Los andamios se sumergieron en urea (Sigma-Aldrich) durante 24 horas a temperatura ambiente [17]. Posteriormente, se añadió colágeno tipo I de piel de ternera (0,1% en ácido acético 0,1M) (Sigma-Aldrich) durante la noche. A continuación, se utilizó glutaraldehído al 0,625% en tampón monopotásico 0,6 M a pH 7,4 [17] en los primeros procesos de funcionalización. A continuación, se probó un segundo protocolo de funcionalización para mejorar la adhesión celular. Para ello se redujo la concentración de glutaraldehído del 0,625% al 0,16% y se utilizó en el mismo tampón. Esta reducción del glutaraldehído se hizo para asegurar la viabilidad celular [21]. Finalmente, para bloquear los grupos funcionales no reaccionados del glutaraldehído, se añadió glicina 0,2 M y 0,5 M durante 10 minutos, respectivamente, para cada una de las bombas de glutaraldehído.

15

20

25

Lupa y microscopio de fuerza atómica (AFM)

Para identificar la superficie de las muestras modificadas, se estudiaron antes (control) y después de la modificación de la superficie a nivel macroscópico y microscópico. Las muestras se introdujeron en diferentes soluciones durante 24 horas: Agua MilliQ (control); etanol al 70% y al 100%; en isopropanol y en tampón monopotásico 0,6 M a pH 7,4. Para este estudio, las muestras se limpiaron antes de ser utilizadas. Se utilizó una lupa Leica Si9 para estudiar macroscópicamente las propiedades superficiales de los andamios en diferentes condiciones. A nivel microscópico, se realizaron análisis de AFM NX20 sin pretratamiento adicional.

30

35

Inmunofluorescencia de colágeno tipo I y PBA tras el proceso de funcionalización

Para comprobar la presencia de colágeno tipo I en la superficie del biomaterial b-TPUe tras el método de funcionalización, se realizó una visualización inmunofluorescente indirecta del colágeno tipo I. Los andamios funcionalizados con colágeno fueron tratados con un anticuerpo primario contra el colágeno tipo I (Sigma-Aldrich) y un anticuerpo secundario (Thermofischer). El PBA posee autofluorescencia, por lo que no fue necesaria la tinción, y los andamios se observaron antes y después del proceso de funcionalización ($\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 405$ nm). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal (Nikon Eclipse Ti) y se analizaron con el software Image J (v. 1.52i, USA).

Siembra de los andamios con células

Se pipeteó una suspensión de IPFP-MSCs (7×10^5 células) sobre cada andamio y se incubó durante 4 horas a 37 °C para permitir la adhesión celular. Los andamios sembrados de células se transfirieron a nuevas placas de cultivo de 48 pocillos de baja fijación con 1 ml de medio. Todas las muestras se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37 °C durante 21 días. El medio de cultivo se sustituyó cada 2 días.

Actividad metabólica

La tasa metabólica se evaluó mediante el ensayo colorimétrico Alamar Blue (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante en los días 1, 3, 7, 14 y 21 después de la siembra. Los andamios 3D sin células se utilizaron como controles, y los datos se normalizaron con respecto al control correspondiente. La intensidad de la fluorescencia se midió con un lector de placas (Synergy HT, BIO-TEK).

Viabilidad celular

Se utilizó el ensayo LIVE/DEAD (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante para evaluar la viabilidad de las IPFP-MSCs antes y después del proceso de bioimpresión en los días 1, 7 y 21. Los andamios se observaron con un microscopio confocal (Nikon Eclipse Ti) para su visualización e imagen. Las imágenes se analizaron con el software Image J (v. 1.52i, USA).

Cuantificación del ADN y glucosaminoglicanos (GAG)

Los andamios (n=3) se digirieron con papaína (25 uL/ml en FBE) tras 1 día y 21 días de cultivo con DMEM Glutamax (Thermo) 1% P/S, 10% FBS. La cuantificación de los GAGs se abordó mediante un ensayo colorimétrico con azul de dimetilen (DMMB), mientras que el contenido de ADN se estimó mediante un marcador fluorométrico (tinción con DAPI). La

5 curva estándar para el protocolo de GAGs se utilizó una curva de gradiente de condroitín sulfato (Sigma) y la curva estándar de ADN se realizó utilizando ADN de timo de ternera (Sigma-Aldrich).

Además, también se determinó el ADN a los días 1, 7, 14 y 21 en las muestras de colágeno y PBA para comprobar la diferencia de adhesión y proliferación entre los protocolos de

10 funcionalización. Para ello, también se aproximó el contenido de ADN con DAPI, pero el protocolo de extracción fue diferente: se introdujeron las muestras en diferentes tubos Eppendorf, se añadió 1 mL de agua destilada para inducir la lisis osmótica a 37°C durante 1 h. Inmediatamente después, los tubos se transfirieron a -80°C durante 1 h.

Expresión génica del cartílago

Para determinar la expresión génica del cartílago, se analizaron los ARN del colágeno tipo II, el agregano y el colágeno tipo I (como control) mediante ensayos de PCR. Se utilizaron

20 secuencias de cebadores como en trabajos anteriores [22].

Los andamios se cultivaron durante 21 días con una concentración celular inicial de 2 x10⁶ células por andamio. Ambos casos funcionalizados se estudiaron en medio normal (DMEM, 10% FBS y 1%P/S) y en medio condrogénico (DMEM 1%PS, 1% de ácido ascórbico, 1% de prolina, 1% de suero de transferrina insulina-ITS, 1% de factor de crecimiento transformante-beta 3, TGFB3, y 0,1% de dexametasona). A continuación, se extrajo el ARN mensajero total (ARNm) de las IPFP-MSCs adheridas utilizando 1 ml de RNeasy lysis reagent (Qiagen) por Eppendorf/escafandra (n=3) en el día 21. A continuación, el ARNm se transcribió de forma inversa a ADNc utilizando el kit Reverse Transcription System (Promega) siguiendo los protocolos del fabricante. Por último, se ejecutó una reacción en

25 cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) utilizando una mezcla maestra SYBR green (Promega) siguiendo las instrucciones de la empresa. Los niveles de expresión génica se normalizaron con respecto al gen de mantenimiento gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) y mostraron un cambio de pliegues en relación con el

30 valor de las IPFP-MSC de control en el día 0.

35

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Los andamios fueron fotografiados con un microscopio FEI Quanta 400 (Thermo Fisher Scientific-FEI, Fremont, CA, EE.UU.) con un detector Everhart-Thornley (E-TD) para
5 muestras secas y conductoras en modo de alto vacío. Las muestras se incubaron durante 21 días (2×10^6 células por andamio) y, a continuación, se fijaron con glutaraldehído al 2% durante una noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se enjuagaron en tampón de cacodilato 0,1 M y se guardaron a 4°C. A continuación, se prepararon las muestras para el
10 MEB siguiendo los protocolos estándar: i) varios lavados con PBS, ii) series de deshidratación con etanol (30-100%), iii) se secaron en punto crítico en un Emscope CPD 750, iv) se montaron en soportes de aluminio para el MEB, y v) se recubrieron con un material conductor (aleación de oro y paladio, Sputter Coater 108 Auto).

Análisis estadístico

15 El procesamiento de los datos, así como su representación, se realizaron con el programa Origin 9.0. Para el análisis estadístico se aplicó la T de Student con un intervalo de confianza de 0,05. Previamente, todos los datos fueron evaluados bajo pruebas de normalidad para verificar la homocedasticidad. En cada condición, se utilizaron tres
20 muestras para realizar cada experimento ($n=3$). En las figuras, los valores $p < 0,001$ se representan con "****", $< 0,01$ "***" y, $< 0,05$ "**".

REIVINDICACIONES

1.- Método de funcionalización de un elastómero y/o polímero biocompatible comprendido o que constituye un biomaterial o estructura, que comprende los siguientes pasos:

- 5 e) Opcionalmente esterilizar previamente el elastómero y/o polímero biocompatible comprendido o que constituye un biomaterial o estructura,
- f) aminor el elastómero y/o polímero biocompatible comprendido o que constituye el biomaterial o estructura poniéndolo en contacto con una solución de amina,
- 10 g) poner en contacto el producto resultante del paso (b) con una solución que comprende ácido 1-pirenebutirico (PBA), y
- h) opcionalmente realizar uno o más lavados del elastómero y/o polímero biocompatible revestido con PBA del paso (c) con una solución salina, preferiblemente con suero salino (PBS) estéril;

15

donde el que el elastómero y/o polímero biocompatible a funcionalizar se selecciona de la lista que consiste en b-TPUe (elastómero de poliuretano termoplástico de 1,4-Butanediol), PLA (ácido poli-láctico), PCL (poli-caprolactona), PLGA (co-polímero ácido poli(láctico-co-glicólico)) o cualquiera de sus combinaciones.

20

2.- Método según reivindicación anterior, en el que el elastómero a funcionalizar es poliuretano termoplástico de 1,4-butanediol (b-TPUe) que comprende diisocianato de difenilmetano [MDI] y 1,4-butanediol.

25

3.- Método de funcionalización con PBA según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que en el proceso de aminación del paso (b) se emplea una solución que comprende una amina de cadena larga y no cíclica, disuelta en 2-propanol.

30

4.- Método según reivindicación anterior, en el que la amina de la solución para el proceso de aminación se selecciona de la lista que consiste en: 1,6-hexanodiamina; (2-metilbutil) amina; metoxipoliglicol amina; poli(etilenglicol) metiléter amina; 1,6-hexanodiamina-1,6-¹³C₂; N-Boc-1,6-hexanodiamina.

35

5.- Método según reivindicación anterior, donde la amina empleada en la solución para el proceso de aminación es 1,6-hexanodiamina.

6.- Método según reivindicación anterior, en el que la 1,6-hexanodiamina del paso (b) se emplea en una solución de 1,6-hexanodiamina 10% (p/v).

5 7.- Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el PBA del paso (c) se emplea en una solución de PBA disuelto en DMSO.

8.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el PBA del paso (c) se emplea en una solución de PBA disuelto en 2-propanol.

10

9.- Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la estructura tanto del paso (b) como del paso (c) se ponen en contacto con la solución correspondiente en cada etapa durante un periodo de entre 30 minutos y 24 horas, preferiblemente durante 1 hora.

15

10.- Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la temperatura tanto de la etapa (b) como de la etapa (c) se fija entre valores mayores o iguales a 4 °C y menores o iguales a 30 °C, preferentemente se fija a un valor constante de 25 °C.

20

11.- Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque además las soluciones empleadas en el paso (b) y el paso (c) están diluidas en agua mili-Q.

25

12.- Método según la reivindicación anterior, en el que la dilución de las soluciones de los pasos (b) y (c) en agua mili-Q se lleva a cabo al 50%.

13.- Método según cualquiera las reivindicaciones 11 o 12, caracterizado por que la estructura tanto del paso (b) como del paso (c) se ponen en contacto con la solución correspondiente en cada etapa durante 24 horas a 4 °C.

30

14.- Una estructura de biomaterial estéril que comprenda o consista en un elastómero y o polímero biocompatible, caracterizada por que está funcionalizada mediante un revestimiento con PBA y caracterizada por ser obtenida u obtenible por el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

35

15.- Una estructura de biomaterial estéril compuesta esencialmente de un elastómero y o polímero biocompatible, caracterizada por que está funcionalizada mediante un revestimiento con PBA.

5 16.- Estructura de biomaterial funcionalizada con PBA según reivindicación anterior, donde el elastómero y/o polímero biocompatible empleado se selecciona de la lista que consiste en: PLA, PCL, b-TPUe, etc., o cualquiera de sus combinaciones.

10 17.- Estructura de biomaterial funcionalizada con PBA según reivindicación anterior, donde el elastómero empleado es poliuretano termoplástico de 1,4-butanediol (b-TPUe) que comprende diisocianato de difenilmetano [MDI] y 1,4-butanediol.

15 18.- Estructura de biomaterial funcionalizada con PBA según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, caracterizada porque el PBA se encuentra adherido a la superficie de la estructura.

20 19.- Estructura de biomaterial funcionalizada con PBA según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, caracterizada porque la estructura funcionalizada es un andamio tisular, un implante tisular, un stent o una válvula.

20.- Estructura de biomaterial funcionalizada con PBA, según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, para su uso en la reparación o regeneración de tejidos.

25 21.- Estructura de biomaterial funcionalizada con PBA según la reivindicación 14, para su uso en la reparación o regeneración de tejidos.

22.- Andamio tisular funcionalizado con PBA que emplea la estructura de biomaterial según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19.

30 23.- Andamio tisular funcionalizado con PBA según la reivindicación anterior, constituido esencialmente por un elastómero de poliuretano termoplástico de 1,4-butanediol que comprende diisocianato de difenilmetano [MDI] y 1,4-butanediol.

35 24.- Andamio tisular funcionalizado con PBA según cualquiera de las reivindicaciones 22 o 23, para su uso en cultivos en 3D *in vitro*.

- 25.- Andamio tisular funcionalizado con PBA según la reivindicación anterior, donde los cultivos en 3D *in vitro* se emplean para estudios de diferenciación celular, la producción a gran escala de vectores para uso en terapia génica a partir de la expansión en 3D de células empaquetadoras o el cultivo y proliferación de células maduras o células madre en 3D.
- 26.- Una composición que comprende una población de células, o el secretoma de dichas células, dentro del andamio tisular de las reivindicaciones 22 o 23.
- 27.- Una composición según la reivindicación anterior, en la que las células son células maduras o células madre mesenquimales/pluripotentes/embrionarias.
- 28.- Una composición según las reivindicaciones 26 o 27, en la que las células maduras se seleccionan de la lista que comprende: condrocitos, células cutáneas, células endoteliales, células musculares lisas, osteoblastos, células empaquetadoras para producción de vectores, fibroblastos, cardiomicitos o miocitos.
- 29.- Composición farmacéutica que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28 y, opcionalmente, excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.
- 30.- Composición farmacéutica según la reivindicación anterior, para su uso en el tratamiento de enfermedades que implican degeneración de tejidos.
- 31.- Composición farmacéutica para uso, según la reivindicación anterior, en el tratamiento de enfermedades que implican degeneración cartilaginosa, vascular, del músculo esquelético o de la piel.
- 32.- Composición farmacéutica para su uso, según la reivindicación anterior, en el tratamiento de la osteoartritis.

Figura 1

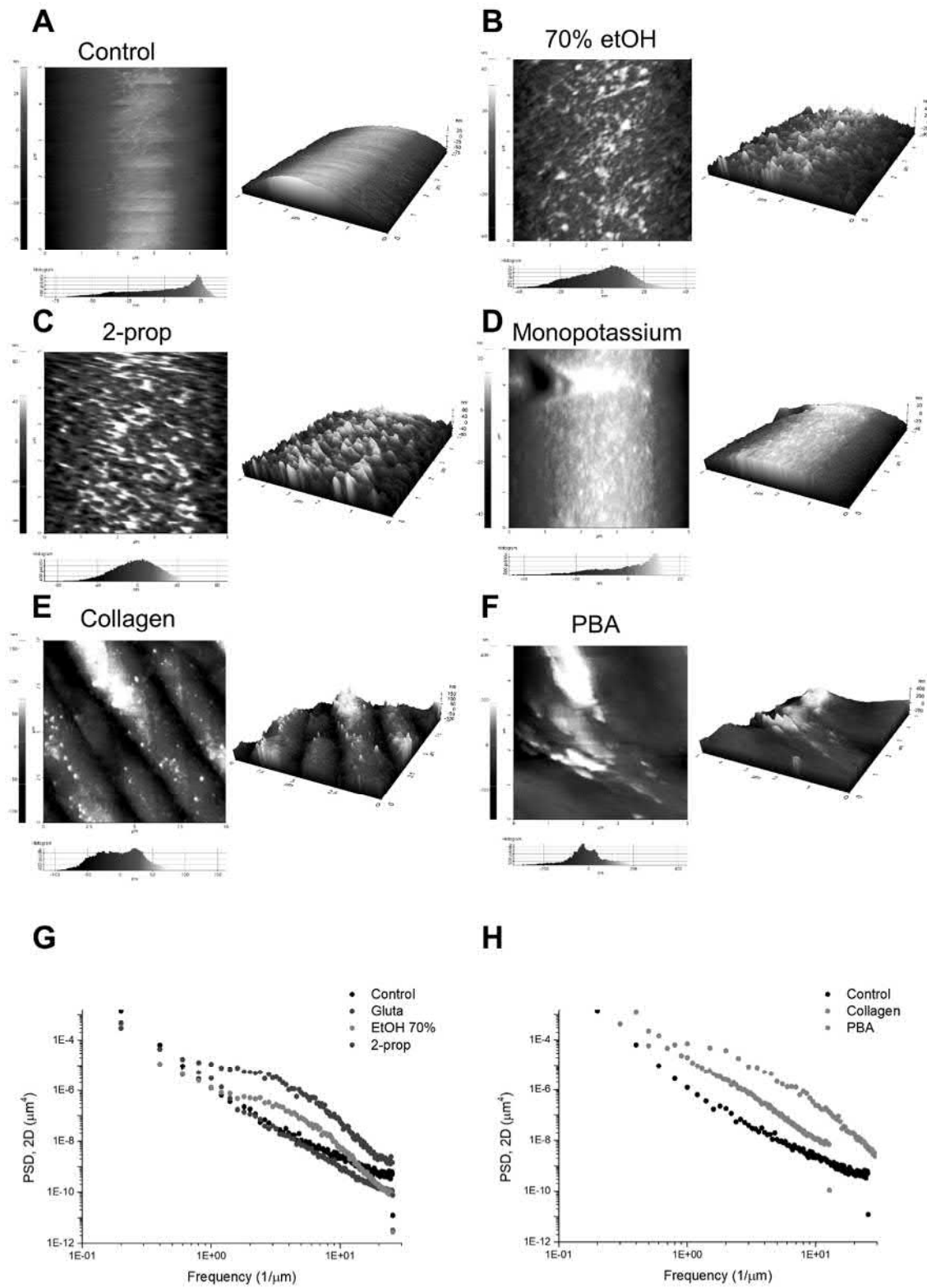


Figura 2

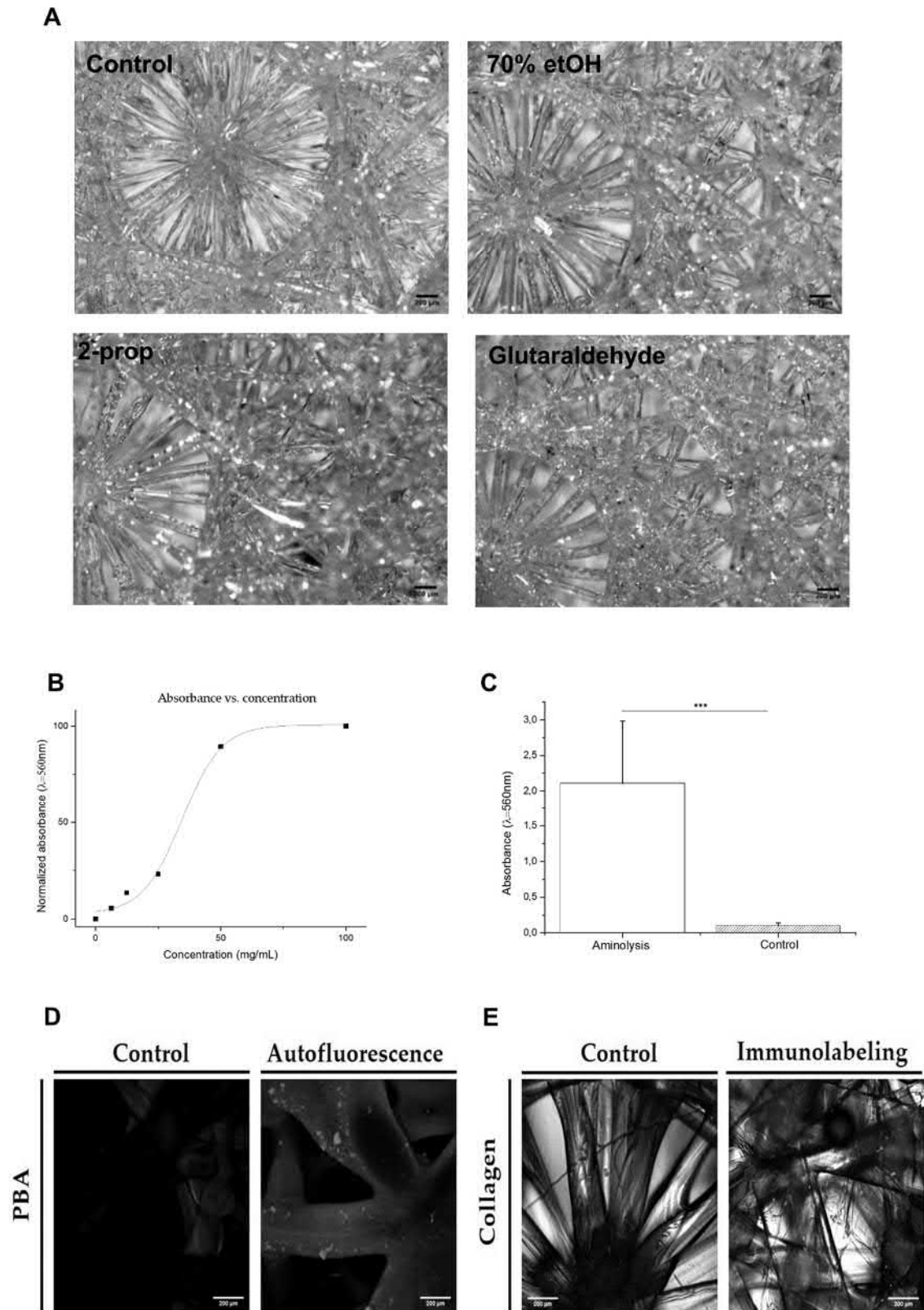


Figura 3

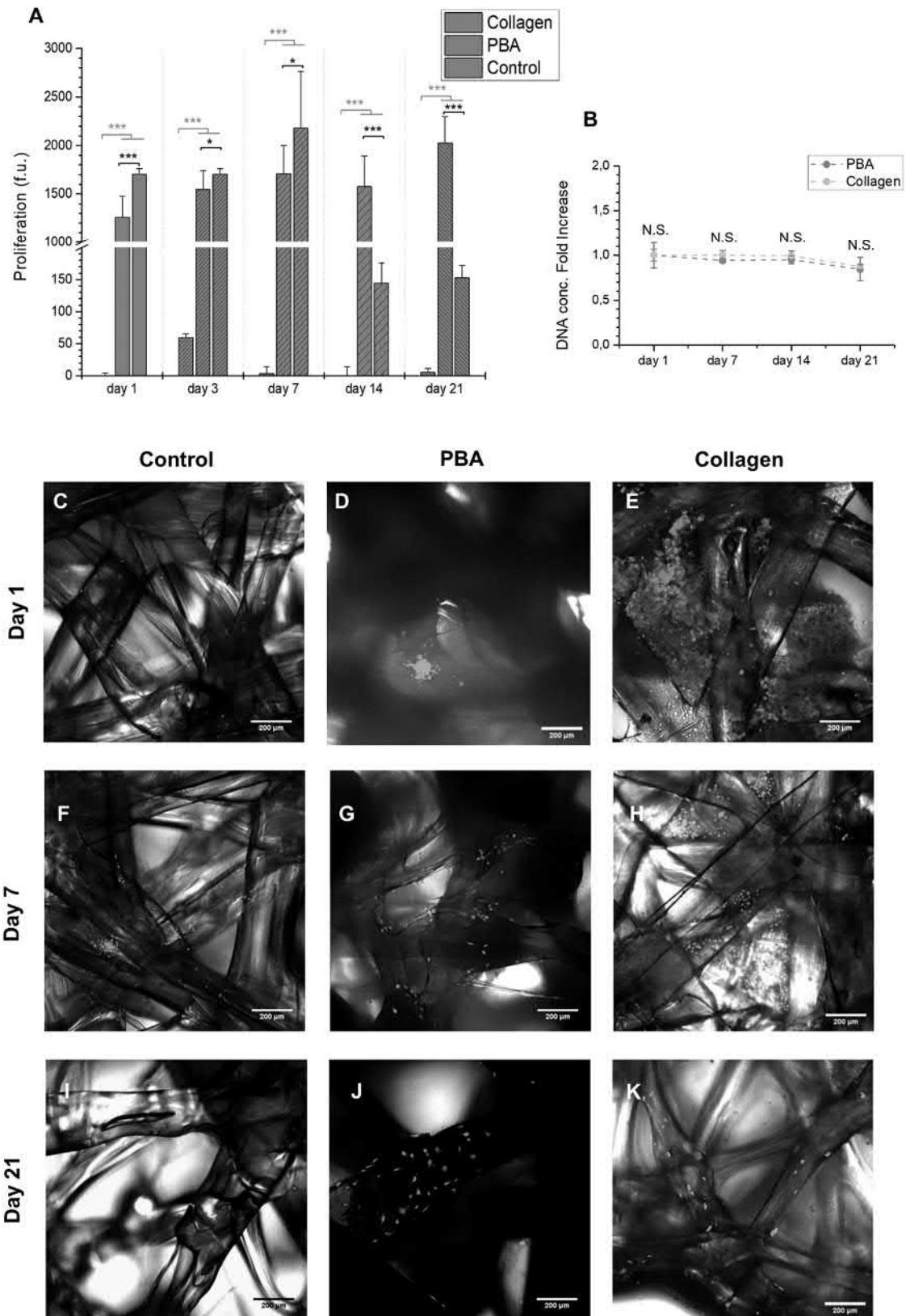


Figura 4

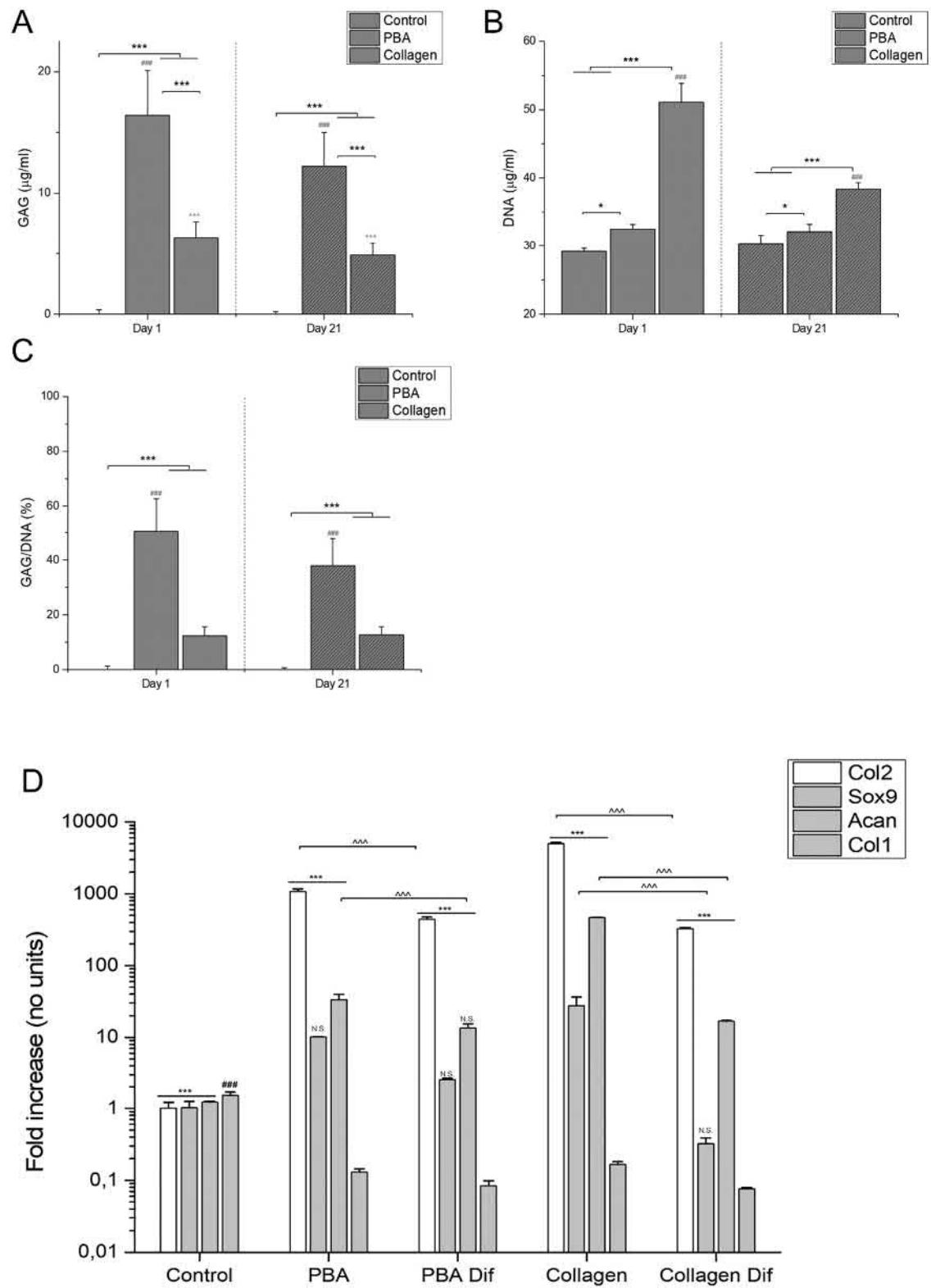


Figura 5

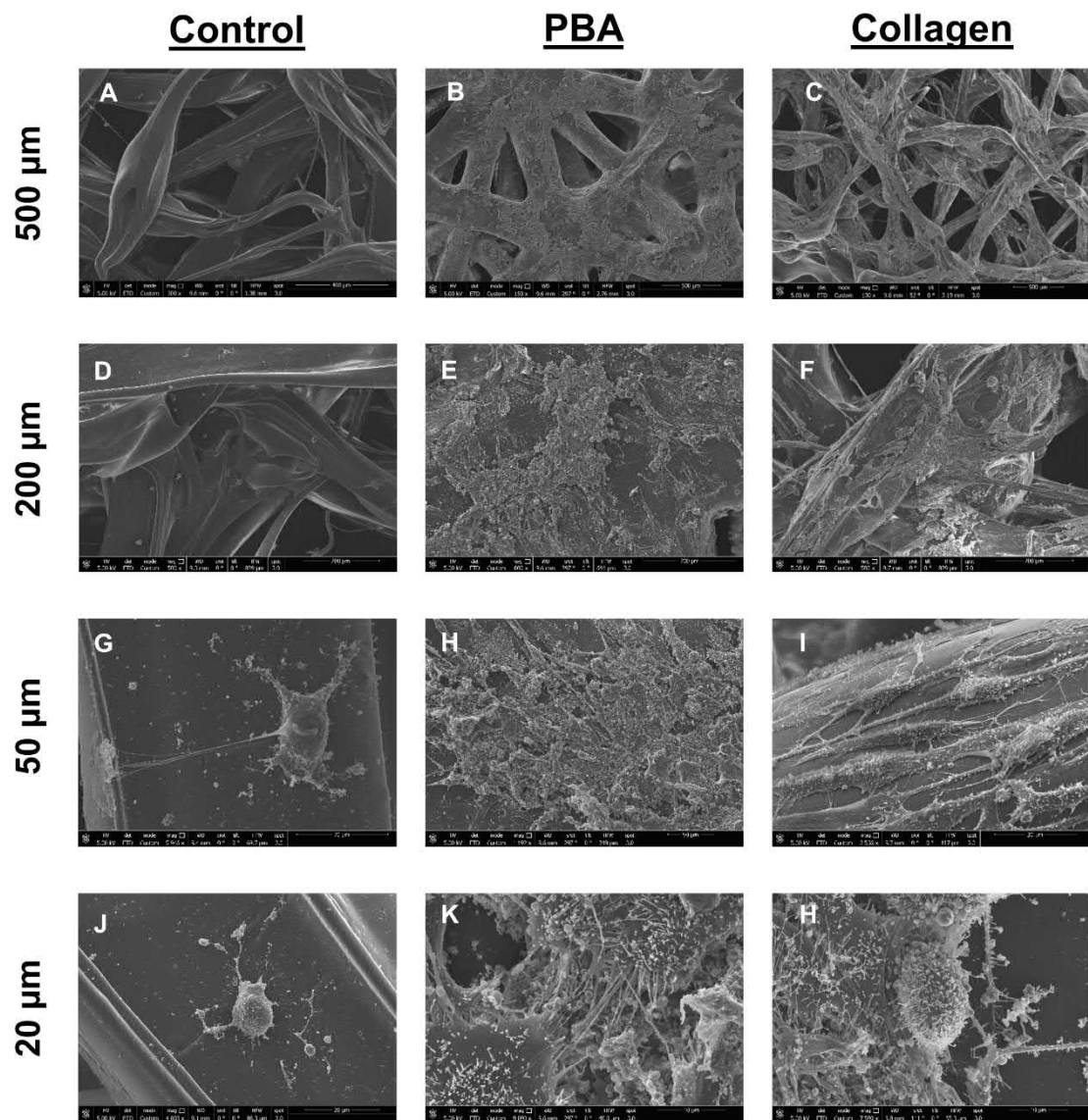
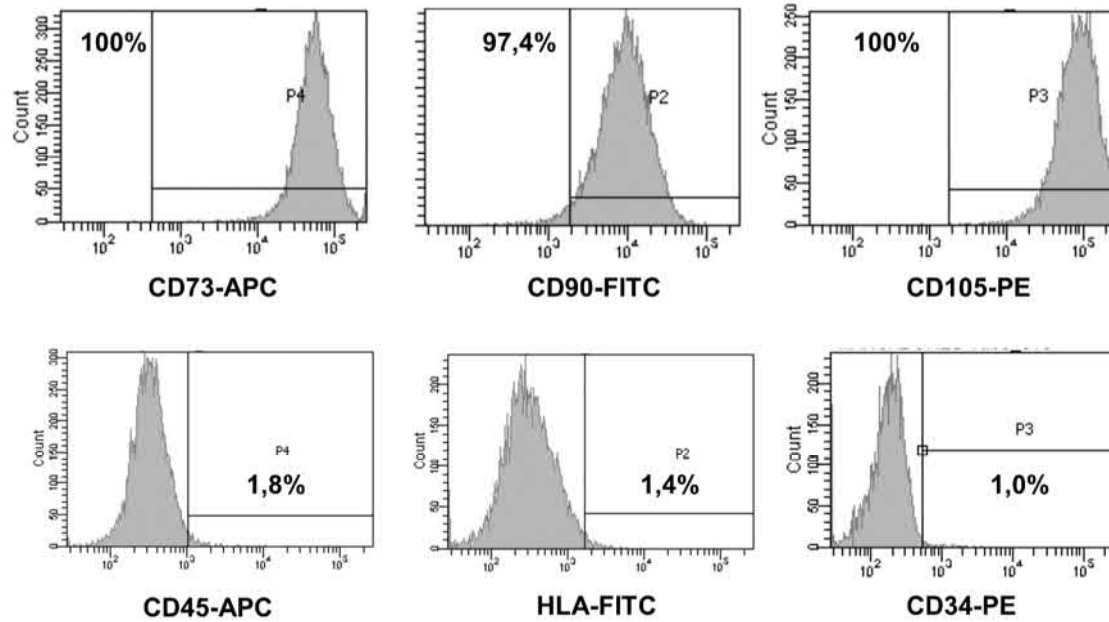


Figura 6

A



B

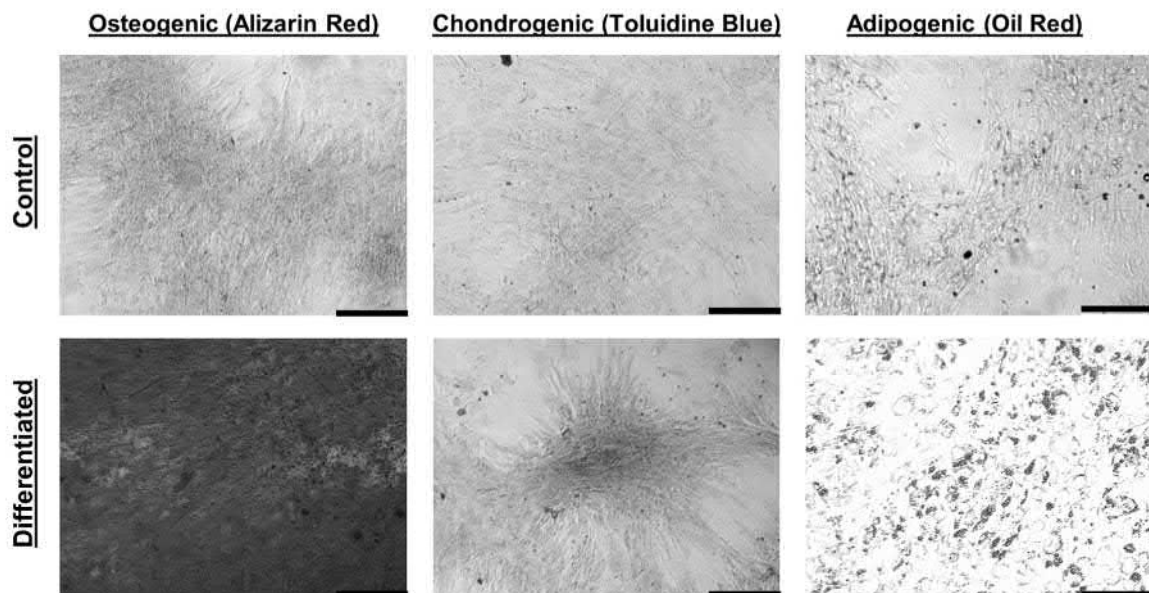


Figura 7

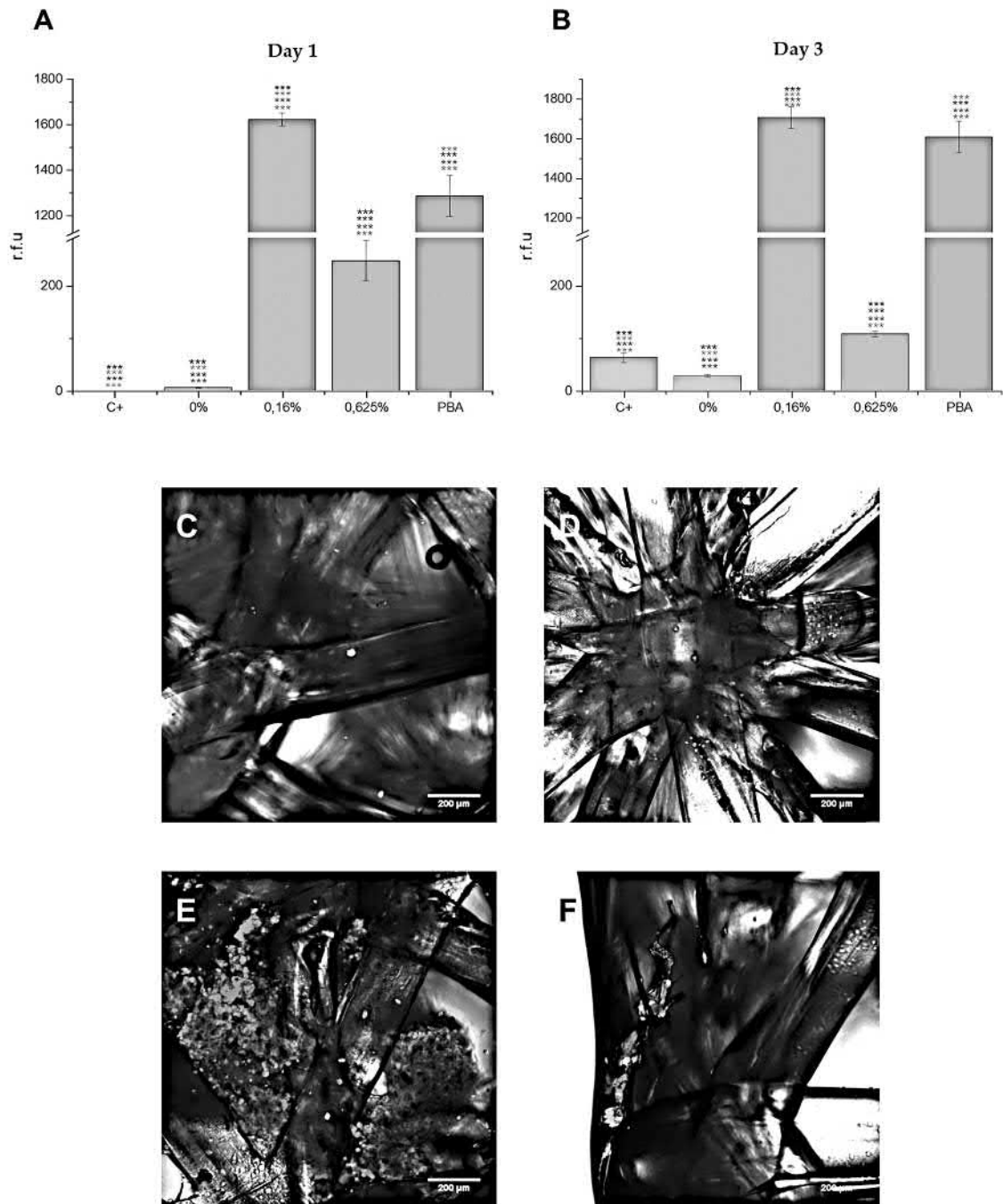


Figura 8

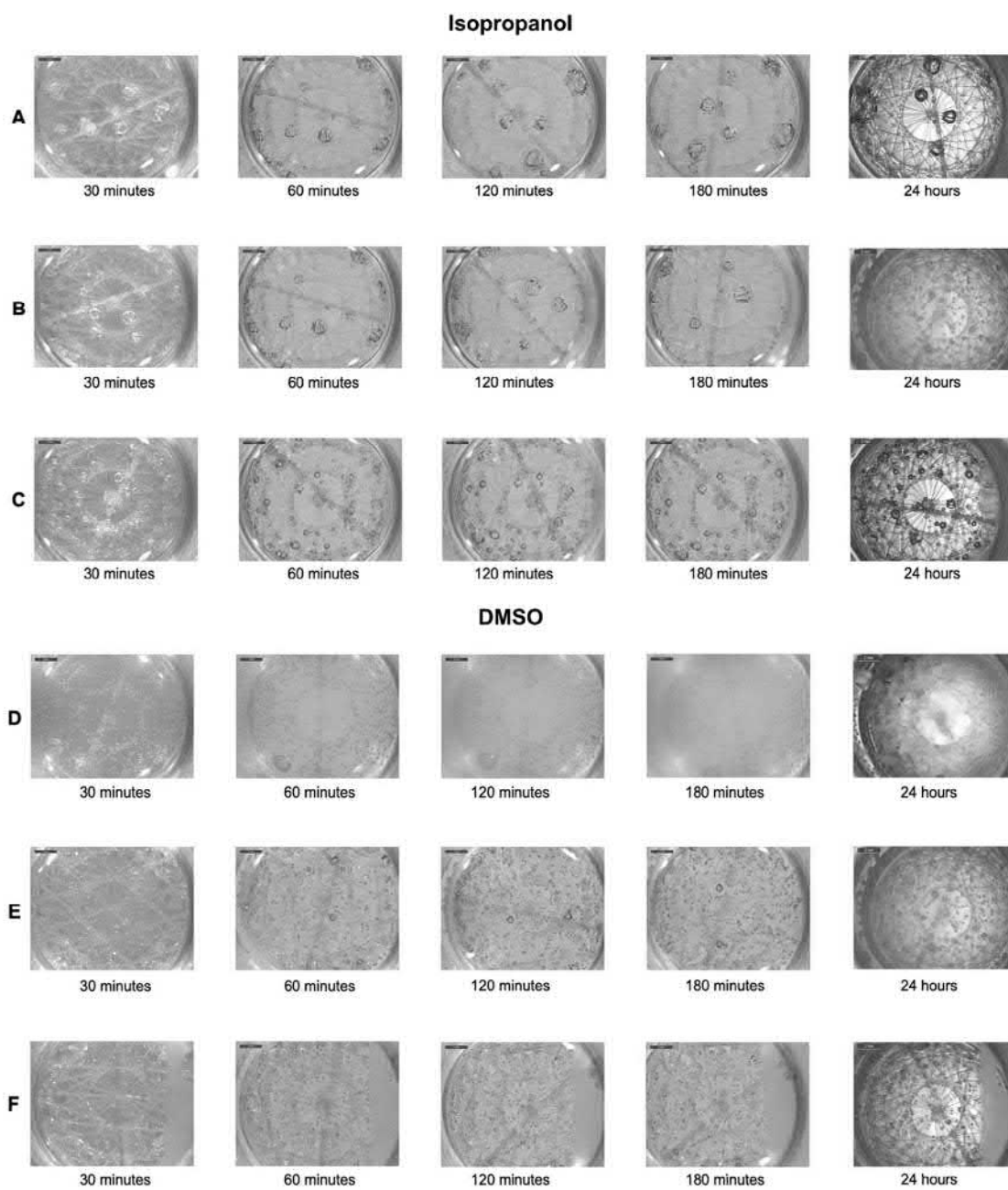


Figura 9

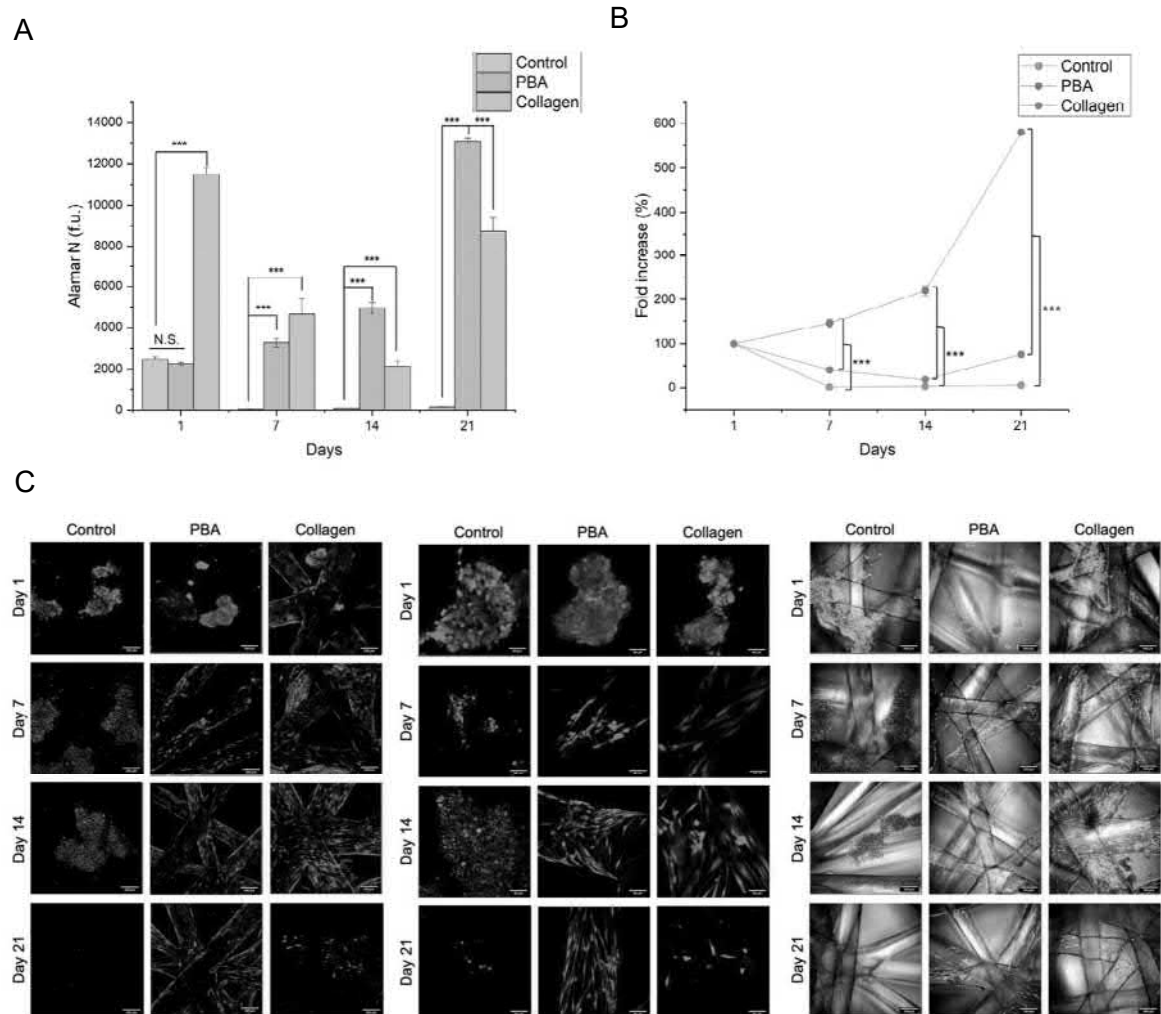
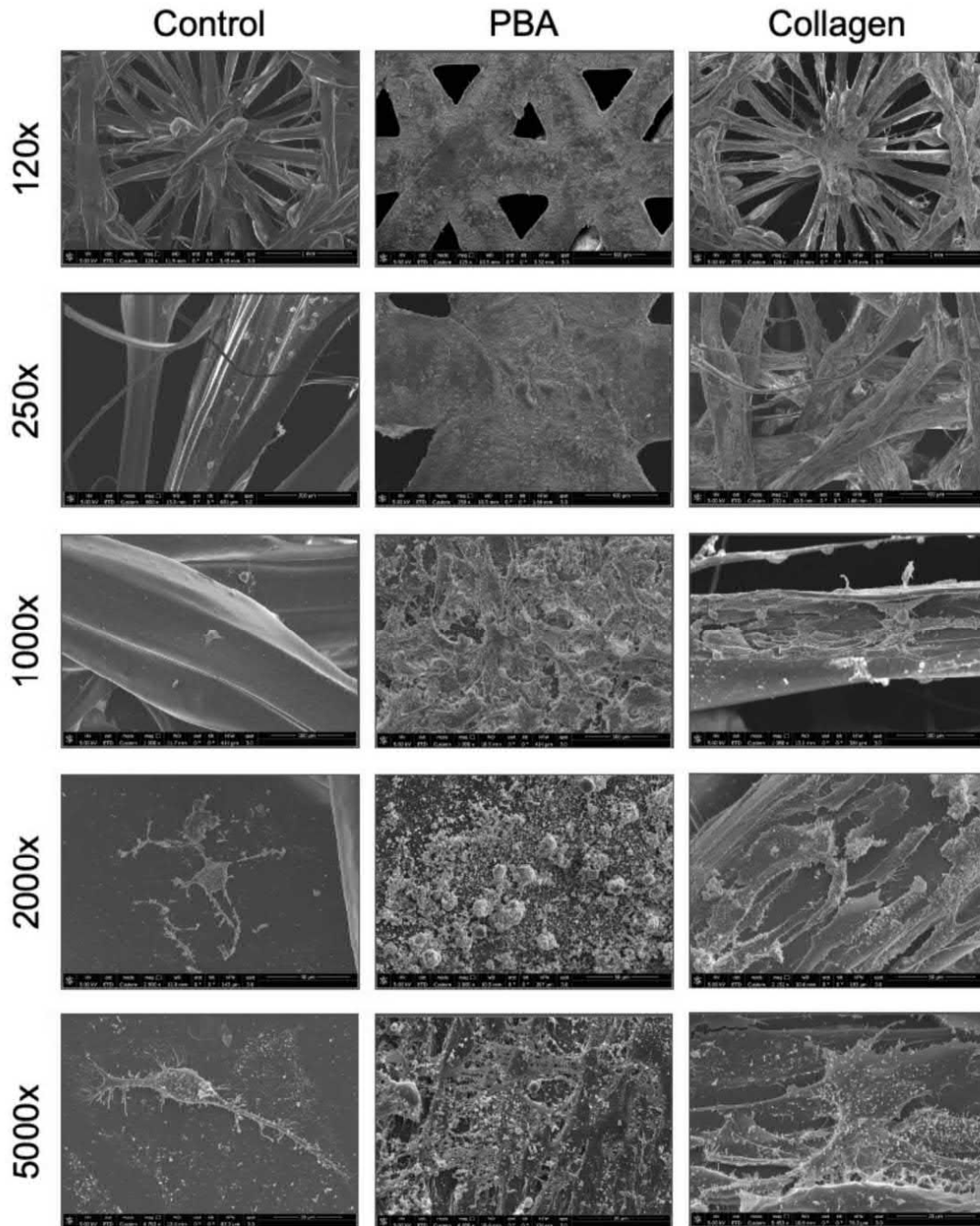


Figura 10





- ②① N.º solicitud: 202230435
②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.05.2022
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CN 106146829 A (UNIV YANTAI) 23/11/2016, resumen; ejemplo 2.	1, 3-16, 18-32
X	DANKO M et al. "Fluorescence study of the dynamics of a star-shaped poly-(caprolactone)s in THF: A comparison with a star-shaped poly(l-lactide)s. Polymer, 20090508 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL. , 08/05/2009, Vol. 50, Páginas 2209 - 2219, ISSN 0032-3861, <DOI: doi:10.1016/j.polymer.2009.03.027>. Ver resumen; introducción, párrafo 1; apartado 2.2.	1, 3-16, 18-32
A	MARTÍNEZ-MORENO D. et al. "Pore geometry influences growth and cell adhesion of infrapatellar mesenchymal stem cells in biofabricated 3D thermoplastic scaffolds useful for cartilage tissue engineering". Materials Science and Engineering C, 20210203 ELSEVIER SCIENCE S.A, CH. Harrison Benjamin S; Atala Anthony, 03/02/2021, Vol. 122, ISSN 0928-4931, <DOI: doi:10.1016/j.msec.2021.111933>. Ver resumen, apartado 2.	1-32
A	VAHEDI PARVIZ et al. "In vivo articular cartilage regeneration through infrapatellar adipose tissue derived stem cell in nanofiber polycaprolactone scaffold". Tissue & Cell APR 2019. , 31/03/2019, Vol. 57, Páginas 49-56, ISSN 0040-8166, <DOI: doi:10.1016/j.tice.2019.02.002>. Ver resumen; apartados 2 y 3.	1-32
A	TIMOTHY DOUGLAS et al. "Coating of polyurethane scaffolds with collagen: comparison of coating and cross-linking techniques". Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 20080219 Kluwer Academic Publishers, Bo. , 19/02/2008, Vol. 19, Páginas 2713 - 2719, ISSN 1573-4838. Ver resumen; ejemplos experimentales 1-3.	1-32

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
13.02.2023

Examinador
N. Martín Laso

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C08G18/83 (2006.01)**C08G63/91** (2006.01)**A61K47/34** (2017.01)**A61K31/785** (2006.01)**A61F2/02** (2006.01)**A61L27/18** (2006.01)

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

C08G, A61K, A61F, A61L

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXT-DB, NPL, XPESP, BIOSIS, CAS