

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

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
23 de junio de 2022 (23.06.2022)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2022/129663 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

A61L 27/36 (2006.01) A61K 35/616 (2015.01)
A61L 27/50 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01) A61P 19/08 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2021/070889

(22) Fecha de presentación internacional:

14 de diciembre de 2021 (14.12.2021)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P202031250 15 de diciembre de 2020 (15.12.2020) ES

(71) Solicitantes: **UNIVERSIDAD DE GRANADA** [ES/ES]; Hospital Real. Avda. del Hospicio s/n, 18071 Granada (ES). **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avda. de la Constitución, 18, 41071 Sevilla (ES). **FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD** [ES/ES]; Avda. Américo Vespucio 15, Edificio S-2, Parque Científico, y Tecnológico Cartuja 93, 41092 Sevilla (ES).

(72) Inventores: **ALAMINOS MINGORANCE, Miguel**; Universidad de Granada, Hospital Real. Avda. del Hospicio s/n, 18071 Granada (ES). **GARZÓN BELLO, Ingrid Johanna**; Universidad de Granada, Hospital Real. Avda. del Hospicio s/n, 18071 Granada (ES). **CAMPOS SÁNCHEZ, Fernando**; Universidad de Granada, Hospital Real. Avda. del Hospicio s/n, 18071 Granada (ES). **CHATO ASTRAIN, Jesús**; Universidad de Granada, Hospital Real. Avda. del Hospicio s/n, 18071 Granada (ES). **BLANCO ELICES, Cristina**; Servicio Andaluz de Salud, Avda. de la Constitución, 18, 41071 Sevilla (ES). **SÁNCHEZ PORRAS, David**; Servicio Andaluz de Salud, Avda. de la Constitución, 18, 41071 Sevilla (ES). **ORUEZABAL GUIJARRO, Roke Iñaki**; Fundación Pública Andaluza, Progreso y Salud, Avda. Américo Vespucio 15, Edificio S-2, Parque Científico, y Tecnológico Cartuja 93 41092 Sevilla (ES). **FERNÁNDEZ VALADÉS, Ricardo**; Servicio Andaluz de Salud, Avda. de la Constitución, 18, 41071 Sevilla (ES).

(74) Mandatario: **BERTRÁN VALLS, Silvia**; Paseo de la Castellana 140, 3ª Planta, Edificio Lima, 28046 Madrid (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, DJ, DK,

DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: NEW BIOMATERIAL FOR TISSUE ENGINEERING

(54) Título: NUEVO BIOMATERIAL PARA INGENIERÍA TISULAR

(57) Abstract: New biomaterial for tissue engineering The present invention proposes a new biomaterial based on echinoderm ossicles, an in vitro method for preparing same and uses thereof in regenerative medicine.

(57) Resumen: Nuevo biomaterial para ingeniería tisular. La presente invención propone un nuevo biomaterial basado en osículos de equinodermo, método in vitro de preparación del mismo y usos en medicina regenerativa.



WO 2022/129663 A1

DESCRIPCIÓN

NUEVO BIOMATERIAL PARA INGENIERÍA TISULAR

CAMPO DE LA TÉCNICA

- 5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biomedicina e ingeniería tisular. Específicamente, se refiere a un nuevo biomaterial y un método *in vitro* de preparación del mismo. También se refiere a sus usos en medicina regenerativa.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

- 10 Los enormes avances de la ingeniería de tejidos y los biomateriales han permitido desarrollar nuevos biomateriales para el tratamiento de las lesiones de la mayor parte de los tejidos y órganos humanos. Sin embargo, los tejidos duros, especialmente el hueso, son muy difíciles de tratar debido a sus especiales características biológicas y funcionales, y la mayoría de los biomateriales actualmente disponibles para el
- 15 tratamiento de las lesiones óseas presentan muy escasa biocompatibilidad y funcionalidad *in vivo*.

Hasta la fecha, las lesiones graves del hueso humano se tratan mediante injerto de hueso humano procedente de donante, hueso de animal liofilizado, partículas de hidroxiapatita y materiales similares, cuya biointegración en el hueso es muy lenta y

20 presenta bajas tasas de éxito. Por ello, la búsqueda de nuevos materiales altamente biocompatibles para uso en la reparación de defectos óseos es una prioridad en el campo de la traumatología.

En este contexto, la holoturia es un animal perteneciente al filo de los equinodermos, clase *Holothuroidea* y, como tal, posee numerosos elementos calcificados inmersos

25 en sus tejidos externos, especialmente en la piel (Figura 1). A diferencia de otros equinodermos, la holoturia posee microestructuras denominadas espículas, osículos, osículos dérmicos, escleritos o corpúsculos calcáreos que son independientes unas de otras y permiten al animal una gran libertad de movimientos en condiciones

relajadas, y una gran resistencia cuando los tejidos se contraen y los osículos se acercan unos a otros.

En general, la morfología de estos osículos es propia de cada especie de holoturia y, de hecho, se utiliza para identificar las diferentes especies existentes en la naturaleza (Figura 2). Respecto a su composición, se trata de elementos constituidos fundamentalmente por carbonato cálcico mineralizado como calcita, y puede contener un 5 - 13% de carbonato magnésico en sustitución iónica.

Cada osículo es sintetizado por una o varias células del animal, las cuales se adhieren íntimamente a la superficie del osículo. Por ese motivo, la superficie y el tamaño de los osículos es, potencialmente, altamente biocompatible, lo cual apoya su utilización clínica como agente inductor de la regeneración ósea.

Actualmente los biomateriales que se emplean en medicina regenerativa para reparar tejido duro (óseo) son muy poco biocompatibles, lo que hace necesario desarrollar nuevos biomateriales que tengan poros de un tamaño adecuado y una rugosidad que los haga óptimos para ser empleados en medicina regenerativa.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Imágenes histológicas de distintos tejidos de *Holothuria sanctori* teñidos mediante hematoxilina y eosina en la que se aprecian abundantes osículos en el interior del tejido blando (se marcan algunos osículos con flechas). A: tejido branquial. B: epidermis. C: pared muscular.

Figura 2. Osículos de distintas especies de holoturia analizados mediante microscopía óptica. A: Osículos de tipo torre. B: Botones lisos y botones rugosos. C: Distintos tipos de osículos.

Figura 3. Tejidos artificiales de fibrina-agarosa con osículos dérmicos en su interior y fibroblastos humanos. Arriba: dos imágenes del tejido artificial no descalcificado teñido con hematoxilina-eosina en las que se observan las partículas en la base de la fibrina agarosa (FA). Abajo: tejidos artificiales descalcificados para su procesamiento histológico y teñidos con hematoxilina-eosina en los que se observa la morfología

normal de las células (flechas) y los espacios vacíos en los que se alojaban las partículas antes de la descalcificación. La imagen de abajo a la derecha muestra un tejido artificial tubulizado.

Figura 4. Análisis histológico de los tejidos artificiales tubulizados de fibrina-agarosa implantados en ratones desnudos. A: fibrina-agarosa sin osículos, B: fibrina-agarosa con 0.25% osículos, C: fibrina-agarosa con 0.5% osículos, D: fibrina-agarosa con 1% osículos, E: fibrina-agarosa con 2% osículos, F: fibrina-agarosa con 3% osículos.

Figura 5. Ensayos de funcionalidad in vivo. A la izquierda, se muestra la tibia del conejo en la que se han realizado 4 defectos, tratándose cada uno con un producto diferente. A la derecha, se muestra el resultado a los 60 días de la intervención.

Figura 6. Imagen histológica a bajo aumento de la tibia del conejo a los 60 días de la intervención quirúrgica.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención proponen emplear un biomaterial altamente biocompatible y que presenta mejores resultados en términos de regeneración ósea que otros materiales actualmente disponibles. Además, su origen natural, procedente de productos de la pesca altamente abundantes en la naturaleza, le aporta un potencial beneficio como potenciador del desarrollo de las comunidades pesqueras locales.

BIOMATERIAL DE LA INVENCION

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere a osículos de equinodermos, de ahora en adelante osículos de la invención, para su uso como medicamento o, alternativamente, para su uso en medicina.

Los autores de la presente invención han extraído y purificado los osículos de la piel de diversos géneros de holoturias pertenecientes al género *Holothuria* (fundamentalmente *H. tubulosa*, *H. helleri* y *H. sanctori*). Por tanto, más

preferiblemente los osículos son osículos dérmicos de organismos del género *Holothuria*.

El endoesqueleto de los equinodermos está compuesto por **osículos** de carbonato cálcico que se encuentran en una dermis que deriva del mesodermo y que se encuentra debajo de la epidermis. Por debajo de la capa de dermis hay capas musculares y el peritoneo del celoma.

Los osículos que componen el esqueleto son de calcita con pequeñas cantidades de carbonato de magnesio. Suelen presentar espinas (fijas o móviles) y también salientes (como tubérculos o gránulos). En las **holoturias**, los osículos son muy pequeños y estos animales poseen capas musculares muy bien desarrolladas.

Las holoturias u holoturoideos (*Holothuroidea*) conocidos vulgarmente como pepinos, cohombros, mojón de mar, pollaburro o carajos de mar, son una clase del filo Equinodermos que incluye animales de cuerpo vermiforme alargado y blando que viven en los fondos de los mares de todo el mundo.

En esta memoria, se entiende por organismos del *Phylum Echinodermata*, o equinodermos, a aquellos organismos celulares que pertenecen al superreino *Eukariota*, clado *Opisthokonta*, Reino *Metazoa*, clado *Eumetazoa*, clado *Bilateria*, clado *Deuterostomia*.

Los equinodermos comprenden varias clases: *Asteroidea* (estrellas de mar), *Ophiuroidea* (ofiuras), *Echinoidea* (erizos de mar), *Crinoidea* (lirios de mar o comátulas), *Concentricycloidea* (margaritas del mar) y *Holoturioidea* (holoturias).

Los organismos del género *Holothuria* pertenecen al superreino *Eukariota*, clado *Opisthokonta*, Reino *Metazoa*, clado *Eumetazoa*, clado *Bilateria*, clado *Deuterostomia*, *Phylum Echinodermata*, Superclase *Echinozoa*, Clase *Holothuroidea*, Orden *Aspidochirotida*, Familia *Holothuriidae*

La especie tipo del género es *Holothuria physalis* Linnaeus 1758

Alternativamente, *Holothuriidae* también se refiere a una familia de un organismo que tiene una secuencia nucleotídica homóloga de la región correspondiente al gen citocromo oxidasa I del ADN mitocondrial con una identidad de al menos un 70% con

la SEQ ID NO. 1, y más preferiblemente una identidad de al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con la SEQ ID NO: 1. Más preferiblemente, la secuencia homóloga de la región correspondiente al gen citocromo oxidasa I del ADN mitocondrial tiene una identidad del 100% con la SEQ ID NO: 1.

5

SEQ ID NO: 1

Holothuria tubulosa cytochrome oxidase I (COI) gene, partial cds; mitochondrial (GenBank: GU797718.1)

ataggagggtttggaaaatgactcatacctttaatgataggagctcccgatatggcctccctcgaatgaaaaacatga
 10 gcttctgggtaatccccccatcctttatactactcttagcctcagcaggagtagaaagagggtccggcacagggtggaca
 atttaccctccattgtccagaaacattgccacgccggaggatcagtcgacctggctatTTTTccctacatttgccgga
 gcttcatcaatactagcctcaattaacttcataacaacaatcataaaaatgcggaccccaggagtaacctcgaccgg
 ctcccactattcgtatggtctgtttcataacagcattcctactactactcagactcccagttctagcaggagcaataaaa
 tgctcttaacagaccgaaacataaaaacaaccttctcgaccccgctggaggaggagaccctatactattccaacattt
 15 attctggtttttggacatccagaagtctacattctaactctacctggattcgggatgatatcccacgtgataaccca

El término "identidad", como se usa aquí, se refiere a la proporción de nucleótidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas cuando se comparan. Los métodos de comparación de las secuencias son conocidos en el estado del arte, e incluye, pero no se limita a, BLASTP, BLASTN, y FASTA (S.F. Altschul *et al.*, "Basic Local Alignment
 20 Search Tool", *J. Mol Biol.* 1990, 215, 403-410).

El término "secuencia de nucleótidos homóloga", como se usa en este documento, se refiere a una secuencia que es equivalente al fragmento de la región correspondiente al gen citocromo oxidasa I del ADN mitocondrial de secuencia SEQ ID NO: 1 de *Holothuria* sp, preferiblemente *Holothuria tubulosa*. La expresión "una secuencia que
 25 es equivalente" significa una secuencia de nucleótidos que está dentro del citocromo b o región equivalente en esa especie de *Holothuria* en particular, y realiza la misma función. La persona experta es capaz de identificar estas regiones equivalentes con protocolos de rutina.

El término "% de identidad", como se entiende en esta invención, se refiere al
 30 porcentaje (%) de identidad entre dos o más secuencias de nucleótidos o

aminoácidos. El % de identidad es un recuento del número de posiciones sobre la longitud de la alineación de dos secuencias donde todos los nucleótidos o aminoácidos en esa posición son idénticos. El % de identidad se calcula en base a secuencias homólogas de la misma longitud.

- 5 Los autores de la presente invención han demostrado que los osículos de equinodermos pueden emplearse en el tratamiento de pacientes con graves lesiones del hueso que requieran el implante de materiales potenciadores de la regeneración ósea.

Por tanto, otro **aspecto** de la invención se refiere a osículos de equinodermos para
10 aumentar, restaurar o reemplazar parcial o completamente la actividad funcional de un tejido u órgano enfermo o dañado. En una realización preferida, el tejido enfermo o dañado es un tejido óseo. Más preferiblemente, los osículos son osículos dérmicos de organismos del género *Holothuria*.

El término “medicamento”, tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a
15 cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales

COMPOSICIONES Y TEJIDO ARTIFICIAL DE LA INVENCION

Otro **aspecto** de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante
composición de la invención, que comprende los osículos de la invención. Más
20 preferiblemente los osículos son osículos dérmicos de organismos del género *Holothuria*.

Las composiciones de la invención pueden comprender otros componentes útiles para la finalidad médica de la invención, principalmente para la regeneración de tejidos. Por tanto, en otra realización preferida, la composición de la invención además comprende
25 fibrina y agarosa. En otra realización aún más preferida, la composición de la invención además comprende una célula.

La composición de la invención puede, por tanto, comprender una o más células, dando lugar a un tejido artificial.

Por tanto, otro **aspecto** de la invención se refiere a un tejido artificial, de ahora en adelante tejido artificial de la invención, que comprende:

- a) el biomaterial o la composición de la invención, y
- b) al menos una célula.

5 En una realización preferida de la invención, la célula es una célula humana. En otra realización preferida, la célula se selecciona de entre: condrocitos de cartílago hialino, elástico o fibroso humano, células hepáticas, células epiteliales (por ejemplo, queratinocitos), fibroblastos o células vasculares, entre otras, o cualquiera de sus combinaciones.

10 Tal y como se muestra en los ejemplos, el biomaterial de la invención se puede emplear para reparar o reemplazar total o parcialmente el hueso que no solidifica, o que forma una pseudoartrosis (injerto óseo para regeneración de tejido perdido de hueso, o como sustituto óseo).

La reparación o reemplazamiento del hueso como consecuencia de una lesión o
15 fractura se asemeja mucho al proceso de osteogénesis normal del esqueleto, aunque difiere en algunos aspectos tales como la inflamación y el aumento de fuerzas mecánicas en los adultos. Se puede dividir en etapas secuenciales que involucran varios tipos celulares y factores de crecimiento:

1.- Respuesta inflamatoria: hematoma, cascada proinflamatoria con liberación de
20 citoquinas (principalmente IL-1, IL-6 y TNF- α).

2.- Expresión y liberación de proteínas morfogénicas óseas (BMP) por parte de células osteoprogenitoras cercanas a la fractura, y liberación de citoquinas que reclutan células mesenquimales.

3.- Si la fractura es mecánicamente estable, las células osteoprogenitoras se
25 diferencian a osteoblastos para regenerar el hueso. Si es inestable, se diferencia a condrocitos para formar una capa de colágeno que actúa como puente entre los extremos de la fractura, constituyéndose así lo que se conoce como callo blando; luego es calcificado para formar un callo óseo y posteriormente se remodela para formar hueso laminar.

En este proceso de reparación participan coordinadamente diferentes tipos celulares (células osteoprogenitoras, fibroblastos, macrófagos, condroblastos, osteoblastos, osteoclastos).

5 Por tanto, en otra realización más preferida, la célula y/o la población celular se selecciona de la lista que consiste en: fibroblastos, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, condroblastos, condrocitos, células madre mesenquimales, o cualquiera de sus combinaciones.

10 En otra realización preferida de la invención, la célula es una célula madre. Más preferiblemente, la célula madre se selecciona de entre: células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre adultas o combinaciones de las mismas. Aún más preferiblemente, es una célula madre mesenquimal. Más preferiblemente, la célula madre mesenquimal se obtiene a partir de médula ósea, tejido adiposo, hígado, bazo, testículos, sangre menstrual, fluido amniótico, páncreas, periostio, membrana
15 sinovial, músculo esquelético, dermis, pericitos, hueso trabecular, cordón umbilical, pulmón, pulpa dental y sangre periférica.

Si se desea, la célula de cualquier aspecto de la invención puede modificarse genéticamente mediante cualquier método convencional incluyendo, a modo de ilustración, sin limitación, procesos de transgénesis, deleciones o inserciones en su
20 genoma que modifiquen la expresión de genes que son importantes por sus propiedades básicas (proliferación, migración, diferenciación, etc.), o mediante la inserción de secuencias de nucleótidos que codifiquen proteínas de interés como, por ejemplo, proteínas con propiedades terapéuticas. Por tanto, en otra realización preferida, la célula de cualquier aspecto de la invención ha sido modificada
25 genéticamente.

En ciertos casos, la progenie de una sola célula clonal puede expandirse mediante numerosos pases, sin que aparentemente sufra ninguna anomalía cromosómica, o la pérdida de sus propiedades de crecimiento y diferenciación.

30 Por tanto, si se desea, las células de cualquier aspecto de la invención se pueden expandir clonalmente usando un método adecuado para clonar poblaciones celulares. Por ejemplo, una población proliferada de células puede recolectarse

físicamente y sembrarse en una placa separada (o en los pocillos de una placa de "múltiples pocillos"). Otra opción es que las células se pueden subclonar en una placa de "múltiples pocillos" en una relación estadística para facilitar la operación de colocar una sola célula en cada pocillo (por ejemplo, de aproximadamente 0,1 a 5 aproximadamente una célula / pocillo o incluso aproximadamente 0,25 a 0,5 células / pocillo, como 0,5 células / pocillo). Por supuesto, las células pueden clonarse a baja densidad (por ejemplo, en una placa de Petri u otro sustrato adecuado) y aislarse de otras células usando dispositivos tales como anillos de clonación. La producción de una población clonal se puede expandir en cualquier medio de cultivo adecuado. En 10 cualquier caso, las células aisladas se pueden cultivar hasta un punto adecuado en el que se pueda evaluar su fenotipo de desarrollo. Otro aspecto de la invención se refiere a una población de células aisladas, en adelante población de células de la invención, que comprende al menos una célula de cualquier aspecto de la invención, preferiblemente una célula adulta. En una realización preferida, la población celular de la invención comprende al menos el 20%, preferiblemente el 40% e incluso más 15 preferiblemente el 50%, 60%, 80%, 90%, 95% o 99% de células de la invención. En una realización preferida, la población celular de la invención comprende al menos el 20%, preferiblemente el 40% e incluso más preferiblemente el 50%, 60%, 80%, 90%, 95% o 99% de células de la invención.

20 Por tanto, en una realización aún más preferida, es una población celular.

La célula de la invención, o la población celular de la invención, puede ser de origen autólogo, alogénico o xenogénico. Preferiblemente, son de origen autólogo.

El término "célula madre adulta" significa que la célula madre se aísla de un tejido u órgano de una persona o animal en un estado de crecimiento después del estado 25 embrionario. Preferiblemente, las células madre de la invención se han aislado en un estado posnatal. Preferiblemente, se han aislado de un mamífero y, más preferiblemente, de un ser humano, incluidos neonatos, jóvenes, adolescentes y adultos.

El término "condrocito" empleado en la presente invención hace referencia a un tipo 30 celular presente en el cartílago, responsable de la producción y mantenimiento de la matriz cartilaginosa, la cual comprende fundamentalmente colágeno y

proteoglucanos. La organización de este tipo celular en el cartílago difiere en función del tipo de cartílago y el tejido en donde se encuentre. En referencia al hueso o al cartílago, las células madre mesenquimales (de origen mesodérmico) se diferencian hacia el linaje osteocondrogénico. Dichas células madre mesenquimales no
5 diferenciadas proliferan y se acumulan en un conjunto denso de células condrogénicas (cartílago) en el centro de condricificación. Estas células condrogénicas se diferencian a condroblastos capaces de sintetizar la matriz extracelular del cartílago, que comprende proteoglucanos, glucosaminoglucanos de bajo potencial osmótico y fibras. A continuación, los condroblastos quedan confinados en un espacio pequeño o laguna
10 que ya no está en contacto con la matriz de nueva creación y que contiene líquido extracelular. El condroblasto en dicho estadio es el condrocito, que es generalmente inactivo pero aún pueden secretar y degradar la matriz dependiendo de las condiciones.

El término "osteocito" empleado en la presente invención hace referencia a un tipo
15 celular formado a partir de la diferenciación del osteoblasto, que a su vez deriva de células osteoprogenitoras. El osteocito, junto con el osteoclasto, constituye el elemento celular del tejido óseo. El osteocito se caracteriza por presentar un citoplasma ligeramente alargado y basófilo, con una enorme cantidad de prolongaciones citoplásmicas, retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi poco
20 desarrollados, presentando pequeñas gotas de lípidos y pequeñas cantidades de glucógeno. Este tipo celular tiene la capacidad de segregar o reabsorber la matriz ósea que le rodea. A pesar de la distancia que hay entre los osteocitos, y de la cantidad de matriz que los separa, estos permanecen en contacto a través de pequeños canales presentes a lo largo del hueso, de modo que la comunicación de los osteocitos
25 es importante para controlar la cantidad de hueso que se forma y deteriora. Los osteocitos derivan de osteoblastos que quedan atrapados en las lagunas de la matriz.

El término "osteoclasto" hace referencia a aquellas células responsables de resorción de la matriz ósea. Son células polinucleadas de gran tamaño que se localizan en las superficies óseas firmemente asociadas a la matriz ósea. Los osteoclastos se forman
30 por la fusión de varias células mononucleares derivadas de una célula madre sanguínea de la médula ósea mostrando muchas propiedades de los macrófagos. Los osteoclastos se caracterizan por disponer de una porción de su membrana "arrugada",

en forma de cepillo, rodeada de un citoplasma libre de orgánulos, llamada "zona clara" con la que se adhiere a la superficie del hueso mediante integrinas, unos receptores especializados del hueso. El proceso de resorción se inicia cuando el aparato de Golgi de la células excreta lisosomas con enzimas capaces de producir un microambiente ácido por debajo de la membrana arrugada como consecuencia del transporte de protones mediante la bomba de protones ATP-dependiente, el intercambio Na^+/H^+ y la anhidrasa carbónica. Las enzimas lisosomales de los osteoclastos implicadas en este proceso son cistein-proteasas como la catepsina y sobre todo, la fosfatasa ácida tartrato-resistente (esta última se utiliza como marcador del fenotipo osteoclástico).

Las enzimas lisosomales solo son liberadas en la zona clara en las proximidades del borde arrugado, produciéndose en este área las reacciones de degradación de la matriz que deben producirse antes de que el medio ácido disuelva las sales minerales del hueso. La resorción osteoclástica depende de una serie de factores reguladores externos como la hormona paratiroidea, la $1,25$ -dihidroxitamina D_3 y la calcitonina.

Otros factores que afectan la funcionalidad de los osteoclastos son los glucocorticoides y las prostaglandinas.

El término "proliferación" o "expansión" en el contexto de la presente invención se emplea para hacer referencia a un aumento en el número celular, derivado de la división celular.

El término "sujeto" incluye cualquier animal, en particular, animales vertebrados, preferiblemente mamíferos, tales como ratones, ratas, caballos, cerdos, conejos, gatos, ovejas, perros, vacas, seres humanos, etc. El término mamífero, como se entiende aquí, se refiere a cualquier organismo del superreino *Eukaryota*, reino *Metazoa*, Phylum *Chordata*, clase *Mammalia*. Por tanto, las células que se emplean en el tejido artificial de la invención pueden pertenecer a cualquier animal, preferiblemente un mamífero. En otra realización incluso más preferida, el mamífero es el ser humano.

Otro **aspecto** se refiere a la composición de la invención o al tejido artificial de la invención para su uso en medicina, o alternativamente, para su uso como medicamento.

Otro **aspecto** de la invención se refiere a la composición de la invención o al 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. Más preferiblemente, el tejido enfermo o dañado es el tejido óseo.

- 5 En una realización preferida de este aspecto, la composición o el tejido artificial de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, la composición de la invención además comprende al menos un principio activo o agente terapéutico. Dicho agente terapéutico se selecciona, preferiblemente, de entre un agente analgésico (en el tratamiento de la inflamación y
10 del dolor) o un agente antiinfeccioso (en la prevención de infección). Aún más preferiblemente comprende excipientes farmacéuticamente aceptables.

En particular, ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos de utilidad de acuerdo a la invención incluyen las siguientes categorías terapéuticas: analgésicos, como los medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos, agonistas opiáceos y salicilatos;
15 agentes anti-infecciosos, tales como antihelmínticos, antianaeróbicos, antibióticos, antibióticos aminoglucósidos, antibióticos antifúngicos, cefalosporinas, antibióticos macrólidos, diversos antibióticos beta-lactámicos, penicilinas, antibióticos quinolonas, antibióticos sulfonamidas, antibióticos de tetraciclina, antimicobacterianos, antimicobacterianos antituberculosos, antiprotozoarios, antiprotozoarios
20 antimaláricos, agentes antivirales, agentes anti-retrovirales, escabicidas, agentes anti-inflamatorios, corticosteroides antiinflamatorios, antipruriginosos/anestésicos tópicos locales, antiinfecciosos, antimicóticos tópicos antiinfecciosos, antivirales tópicos antiinfecciosos, agentes electrolíticos y renales, tales como agentes acidificantes, agentes alcalinizantes, diuréticos, inhibidores de la anhidrasa carbónica, diuréticos,
25 diuréticos de asa, diuréticos osmóticos, diuréticos ahorradores de potasio, diuréticos de tiazida, suplementos de electrolitos, y agentes uricosúricos, enzimas, tales como enzimas pancreáticas y las enzimas trombolíticas, agentes gastrointestinales, tales como antidiarreicos, antieméticos, gastrointestinales agentes anti-inflamatorios gastrointestinales, el salicilato de agentes anti-inflamatorios, antiácidos anti-úlceras
30 gástrica, agentes inhibidores de la bomba de ácido antiulcerosos agentes, mucosa gástrica antiulcerosos agentes bloqueantes H₂, antiulcerosos, agentes colestilíticos digestants, eméticos, laxantes y ablandadores de heces y agentes procinéticos,

anestésicos generales como los anestésicos inhalatorios halogenados anestésicos inhalatorios, anestésicos intravenosos, barbitúricos, benzodiazepinas anestésicos intravenosos anestésicos por vía intravenosa de opiáceos y anestésicos intravenosos agonistas, hormonas y modificadores hormonales, como abortivos, agentes corticosteroides suprarrenales, agentes suprarrenales, los andrógenos, antiandrógenos, inmunobiológicos agentes, tales como inmunoglobulinas, inmunosupresores, toxoides, y vacunas; anestésicos locales, tales como amida de los anestésicos locales y de los anestésicos locales de tipo éster, agentes musculoesqueléticos, tales como anti-gota agentes antiinflamatorios, corticosteroides anti-inflamatorios, agentes, compuestos de oro anti-inflamatoria agentes inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), agentes anti-inflamatorios salicilato, minerales y vitaminas, como la vitamina A, vitamina B, vitamina C, vitamina D, vitamina E y vitamina K.

En una realización particular, los agentes terapéuticos útiles según las categorías anteriores incluyen: (1) analgésicos en general, tales como lidocaína o sus derivados, y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) analgésicos, incluyendo diclofenaco, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno y, (2) analgésicos opiáceos agonistas, como la codeína, fentanilo, hidromorfona y la morfina, (3) analgésicos de salicilato, como la aspirina (ASA), (4) bloqueadores H1 antihistamínicos, tales como terfenadina, clemastina y (5) agentes anti-infecciosos, tales como mupirocina; (6) antianaeróbicos anti-infecciosos, tales como cloranfenicol y clindamicina; (7) antifúngicos antibióticos antiinfecciosos, tales como anfotericina B, clotrimazol, fluconazol y ketoconazol; (8) contra el antibiótico macrólido -infecciosos, tales como la azitromicina y eritromicina; (9) diversos beta-lactámico antiinfecciosos, tales como aztreonam y imipenem; (10) antibiótico de penicilina antiinfecciosos, tales como nafcilina, oxacilina, penicilina G, penicilina V y; (11) quinolona antibióticos antiinfecciosos, tales como ciprofloxacina y norfloxacina; (12) antibiótico tetraciclina antiinfecciosos, tales como doxiciclina, minociclina y tetraciclina; (13) antituberculosos antimicobacterianos antiinfecciosos, tales como isoniazida (INH), rifampicina y; (14) antiprotozoarios antiinfecciosos, como atovacuona y dapsona; (15) antipalúdicos antiprotozoarios antiinfecciosos, tales como cloroquina y pirimetamina; (16) anti-retrovirales antiinfecciosos, tales como ritonavir y zidovudina; (17) contra el antiviral -

infeccioso agentes, tales como aciclovir, ganciclovir, interferón alfa, y rimantadina; (18) antifúngicos tópicos antiinfecciosos, tales como anfotericina B, clotrimazol, miconazol, nistatina y; (19) antivirales tópicos antiinfecciosos, tales como el aciclovir; (20) agentes electrolíticas y renales, como la lactulosa; (21) diuréticos de asa, como la furosemida, 5 (22) diuréticos ahorradores de potasio, como triamtereno; (23) diuréticos tiazídicos, tales como hidroclorotiazida (HCTZ), (24) agentes uricosúricos, tales como probenecid; (25) enzimas, tales como RNasa y DNasa; (26) antieméticos, tales como proclorperazina; (27) salicilato gastrointestinales inflamatorias anti-agentes, tales como sulfasalazina; (28) de la bomba gástrica de ácido anti-inhibidor agentes de 10 úlceras, tales como el omeprazol; (29) bloqueantes H₂, agentes anti-úlceras, tales como cimetidina, famotidina, nizatidina y ranitidina; (30) digestivos, tales como pancrelipase; (31) agentes procinéticos, tales como la eritromicina (32; éster) anestésicos locales, tales como benzocaína y procaína; (33) musculoesqueléticos corticosteroides anti-inflamatorios, agentes, tales como beclometasona, 15 betametasona, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, y prednisona; (34) musculoesqueléticos antiinflamatorios inmunosupresores, tales como azatioprina, ciclofosfamida y metotrexato; (35) musculoesqueléticos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como diclofenaco, ibuprofeno, ketoprofeno, ketorlac, y naproxeno; (36) minerales, tales como hierro, calcio y magnesio; (37) Los compuestos 20 de vitamina B , tales como la cianocobalamina (vitamina B12) y la niacina (vitamina B3); (38) compuestos de vitamina C, tales como ácido ascórbico, y (39) compuestos de vitamina D, tales como calcitriol.

En otra realización preferida, el agente terapéutico puede ser un factor de crecimiento u otra molécula que afecta a la diferenciación celular y/o proliferación, como por 25 ejemplo, pero sin limitarnos, el derivado de las plaquetas (PDGF), transformante (TGF), insulínico (IGF), hepático (HGF), epidérmico (EGF), endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), o cualquier de sus combinaciones. Los factores de crecimiento que inducen la diferenciación de estados finales son bien conocidos en la técnica, y puede ser seleccionado de cualquiera de esos factores que 30 se ha demostrado que induce un estado de diferenciación final. Los factores de crecimiento para uso en los métodos aquí descritos pueden, en ciertas realizaciones, ser variantes o fragmentos de un factor de crecimiento de origen natural. Por ejemplo,

una variante puede ser generada al hacer cambios de aminoácidos conservadores y prueba de la variante resultante en uno de los ensayos funcionales descritos anteriormente u otro ensayo funcional conocido en la técnica. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen alifático-hidroxilo en sus cadenas laterales es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen que contiene amida en las cadenas laterales es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina, y un grupo de aminoácidos que tienen que contiene azufre en las cadenas laterales es cisteína y metionina. Grupos preferidos de sustitución de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina.

Como los expertos en la técnica apreciarán, las variantes o fragmentos de factores de crecimiento de polipéptidos se pueden generar usando técnicas convencionales, tales como mutagénesis, incluyendo la creación de mutación de punto discreto (s), o por truncamiento. Por ejemplo, la mutación puede dar lugar a variantes que conservan sustancialmente la misma, o simplemente un subconjunto, de la actividad biológica de un factor de crecimiento polipeptídico de la que se derivó.

En otra realización preferida, el agente terapéutico puede ser Plasma Rico en Factores de Crecimiento PRGF (*Plasma Rich in Growth Factors*). Se basa en la utilización de las plaquetas como vehículo para la liberación controlada de distintas señales celulares que aceleran y optimizan la reparación de los tejidos dañados por diversas razones como puede ser un tratamiento quirúrgico, un traumatismo o una enfermedad.

Aun más preferiblemente, es el el agente terapéutico es el factor de crecimiento de fibroblastos básico.

El término "factor de crecimiento de fibroblastos básico" o "bFGF" (*basic fibroblast growth factor*) o "FGF2" o "FGF- β " hace referencia a un factor miembro de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos que permite el mantenimiento de células

madre embrionarias humanas no diferenciadas, y que estimula la proliferación de células de origen mesodérmico, así como de muchas células de origen neuroectodérmico, ectodérmico y endodérmico. bFGF está codificado por el gen FGF2. Esta proteína se activa durante el daño tisular o el desarrollo tumoral mediando procesos angiogénicos.

El término “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un vehículo que debe estar aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal o enumerado en la Farmacopea Estadounidense o la Farmacopea Europea, u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más concretamente en humanos.

El término “vehículo” se refiere a un diluyente, coadyuvante, excipiente o portador con el que se debe administrar el biomaterial o la composición de la invención. Obviamente, dicho vehículo debe ser compatible con dicho biomaterial y con otros componentes que pueda comprender la composición de la invención, por ejemplo, pero sin limitarnos, células.

Como se emplea aquí, el término “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” o “ingrediente farmacéuticamente activo” significa 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.

La composición farmacéutica de la invención, si se desea, se puede almacenar hasta el momento de su aplicación mediante los procedimientos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. Esta composición farmacéutica también se puede almacenar junto a medicamentos adicionales, útiles en el tratamiento en enfermedades, en una forma activa que comprende una terapia combinada.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y las variantes de la misma no pretenden excluir otras características técnicas,

suplementos, componentes o pasos. Para los expertos en la técnica, otros objetos, ventajas y características de la invención se entenderán en parte a partir de la descripción y en parte a partir de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar la presente
5 invención.

EJEMPLOS DE LA INVENCION

La invención consiste en la obtención y utilización de osículos dérmicos de holoturia para el tratamiento de lesiones óseas. Para ello, en primer lugar, se procedió a extraer
10 y purificar los osículos de la piel de diversos géneros de holoturias pertenecientes al género *Holothuria* (en nuestro medio, fundamentalmente, *H. tubulosa*, *H. helleri* y *H. sanctori*).

Para la extracción, varios ejemplares de holoturia fueron sumergidos en una solución de hipoclorito sódico al 1-2% durante 6h en un decantador o embudo de decantación.
15 Tras ello, se recuperó el componente depositado en la parte inferior del decantador, el cual se lavó varias veces con abundante agua corriente. Las partículas así recogidas se purificaron a continuación con una solución al 5-10% de peróxido de hidrógeno en agua, lavándose varias veces con abundante agua corriente.

Tras confirmar la presencia de los osículos mediante visualización directa en un
20 microscopio de contraste de fases o luz polarizada, se procede a su esterilización mediante tratamiento con etanol 70% durante 20 minutos, dejándose secar a continuación en una cabina de flujo laminar estéril. Estas partículas también pueden esterilizarse mediante cualquier otro método, incluyendo el autoclavado.

Dependiendo de la especie escogida, el producto obtenido contendrá botones, torres,
25 placas u otros tipos de osículos.

Para determinar la biocompatibilidad de los osículos dérmicos, se realizaron ensayos a diferente nivel:

1) Análisis de biocompatibilidad *ex vivo* en cultivos celulares puestos en contacto indirecto con los osículos.

2) Análisis de biocompatibilidad *ex vivo* en sistemas tridimensionales consistentes en tejidos artificiales de fibrina-agarosa y osículos dérmicos con células humanas en su interior.

3) Análisis de biocompatibilidad *in vivo* de tejidos artificiales de fibrina-agarosa y osículos dérmicos con células humanas en su interior.

4) Análisis de eficacia *in vivo* en un modelo animal de lesión ósea.

La metodología utilizada y los principales resultados obtenidos en cada caso, se resumen brevemente a continuación:

10

1) Contacto indirecto con los osículos. En primer lugar, se cultivaron fibroblastos humanos en la base de un inserto de membrana porosa para cultivo celular, depositándose a continuación los osículos dérmicos en la parte superior del sistema. De este modo, las células no contactaban directamente con las partículas, pero sí con cualquier metabolito o agente tóxico que éstas pudieran liberar.

Los resultados mostraron que las células eran viables, no existiendo ninguna alteración morfológica o funcional derivada de la presencia de los osículos dérmicos, y sugieren que éstos son altamente biocompatibles.

2) Sistemas tridimensionales *ex vivo*. En este caso, se generaron biomateriales de fibrina-agarosa que contenían diferentes concentraciones de osículos dérmicos (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 1, 2 y 3% p/v) con células humanas en su interior (fibroblastos). Estos tejidos fueron sometidos a nanoestructuración una vez generados, y algunos de ellos se tubulizaron para fabricar cilindros macizos concéntricos mediante enrollamiento del material sobre sí mismo. El resultado mostró que las células mantenían su viabilidad en el interior de los tejidos artificiales, no habiéndose detectado ningún tipo de alteración morfológica o funcional en las mismas. Es importante destacar que las partículas se concentraron fundamentalmente en la base del biomaterial de fibrina-agarosa, probablemente debido a su tendencia a decantar en medios líquidos (Figura 3).

3) Sistemas tridimensionales *in vivo*. Una vez generados los diferentes tejidos artificiales de fibrina-agarosa-osículos con fibroblastos humanos en su interior, se procedió a su implante subcutáneo en ratones desnudos (inmunodeficientes) para determinar su biocompatibilidad *in vivo*. En este caso, se utilizaron tejidos artificiales tubulizados. Los resultados a los 12 días del implante (Figura 4) mostraron adecuada biocompatibilidad *in vivo*, con ausencia de signos de necrosis, tumoración, infección, hemorragia o rechazo. Únicamente se observó un proceso normal de biointegración del biomaterial de fibrina-agarosa.

4) Eficacia *in vivo* en un modelo animal de lesión ósea. Para determinar el potencial regenerativo de los osículos de holoturia, se utilizó un modelo animal de lesión ósea (Figura 5). En concreto, se utilizó la tibia del conejo Wistar de laboratorio, realizándose una lesión cortical ósea en cuatro puntos de la tibia utilizando una fresa de 4 mm de diámetro. Tras ello, se trató cada lesión de forma diferente: la lesión más proximal se dejó sin tratar (control no reparado), la siguiente, se trató con un biomaterial de fibrina-agarosa nanoestructurado que contenía un 1% de osículos de holoturia en su interior, y las dos lesiones más distales se trataron con partículas de holoturia directamente inyectadas en el orificio con una jeringuilla. 60 días más tarde, se sacrificaron los animales y se procedió a su análisis.

A nivel macroscópico y clínico, los resultados muestran una adecuada reparación de las tres lesiones tratadas con osículos de holoturia, con o sin biomateriales asociados, mientras que el orificio sin biomaterial parecía tener defectos en su superficie.

A nivel microscópico, una vez descalcificadas las tibias, se observó mayor regeneración y adecuada estructura ósea en los defectos óseos reparados con osículos de holoturia que en el control que se dejó sin tratar (Figura 6).

Todos estos resultados nos permiten concluir que la utilización de los osículos de holoturia favorece la generación y reparación ósea.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un osículo de equinodermo para su uso como medicamento.
- 2.- El osículo según la reivindicación anterior, donde el osículo es un osículo dérmico
5 de organismos del género *Holothuria*.
- 3.- El osículo según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para aumentar, restaurar o reemplazar parcial o completamente la actividad funcional de un tejido u órgano enfermo o dañado.
- 4.- Una composición que comprende el osículo según cualquiera de las
10 reivindicaciones 1-3, fibrina y agarosa.
- 5.- La composición según la reivindicación 4 para su uso como medicamento.
- 6.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, para aumentar, restaurar o reemplazar parcial o completamente la actividad funcional de un tejido u órgano enfermo o dañado.
- 15 7.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 8.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, que además comprende otro principio activo.
- 9.- Un tejido artificial que comprende:
20 - un osículo según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-8,
- al menos una célula.
- 10.- El tejido artificial según la reivindicación 9, donde la célula se selecciona de la lista que consiste en: fibroblastos, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, condroblastos, condrocitos, células madre mesenquimales, o cualquiera de sus
25 combinaciones.

- 11.- El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 9-10, donde la célula es una célula madre que se selecciona de la lista que consiste en: células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre adultas o combinaciones de las mismas.
- 5 12.- El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, donde la célula es un fibroblasto.
- 13.- El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 9-12, que además comprende otro principio activo.
- 10 14.- La composición según la reivindicación 8, o el tejido artificial según la reivindicación 13, donde el otro principio activo se selecciona de la lista que consiste en: un agente analgésico, un agente antiinfeccioso, un factor de crecimiento, o cualquiera de sus combinaciones.
- 15.- El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 9-14, para su uso como medicamento.
- 15 16.- El tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 9-15, para aumentar, restaurar o reemplazar parcial o completamente la actividad funcional de un tejido u órgano enfermo o dañado.
- 20 17.- El osículo según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, la composición cualquiera de las reivindicaciones 4-8, el tejido artificial según cualquiera de las reivindicaciones 9-16, para aumentar, restaurar o reemplazar parcial o completamente la actividad funcional de un tejido u órgano enfermo o dañado, donde el tejido u órgano enfermo o dañado es el tejido óseo.

FIGURAS

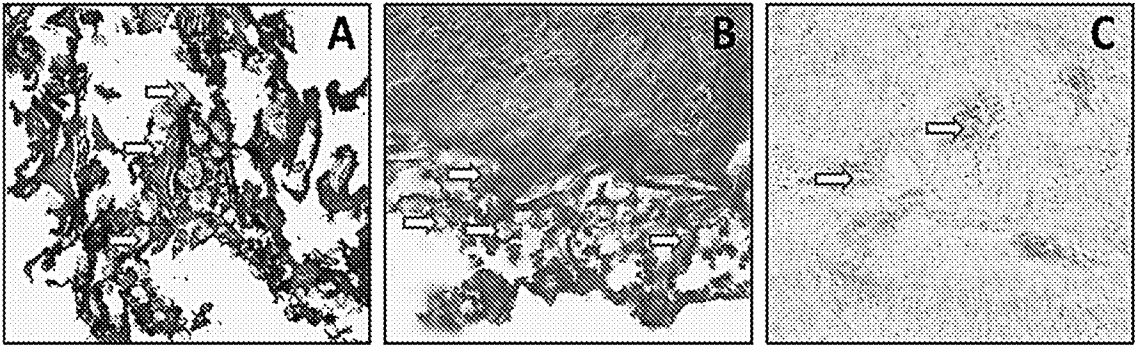


Fig. 1

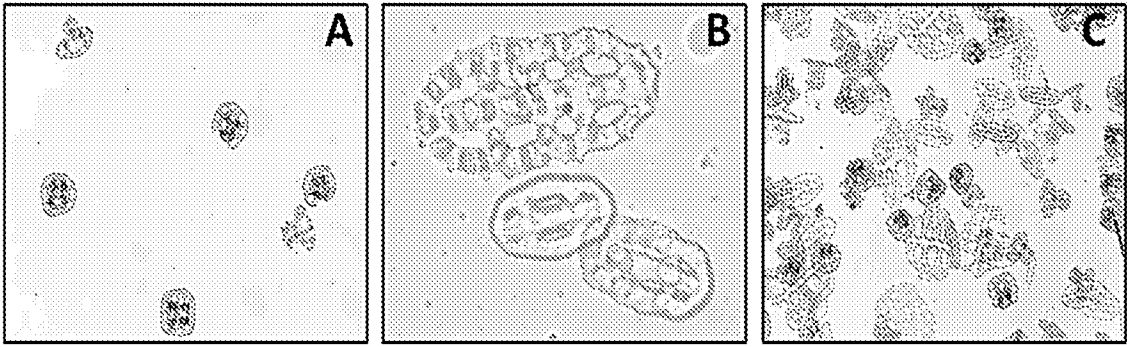


Fig. 2

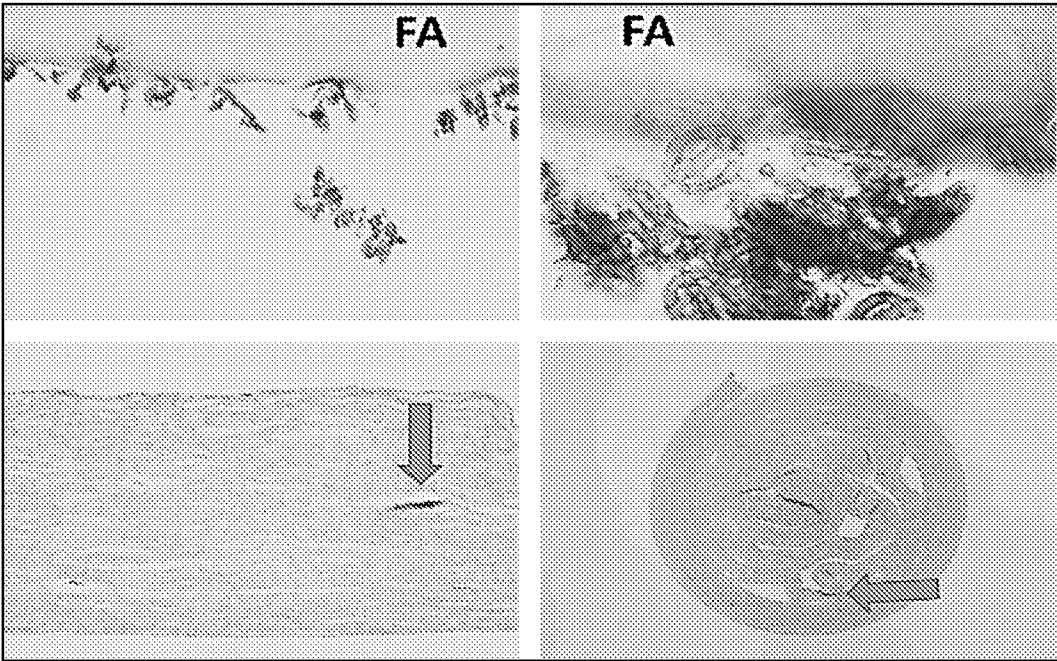


Fig. 3

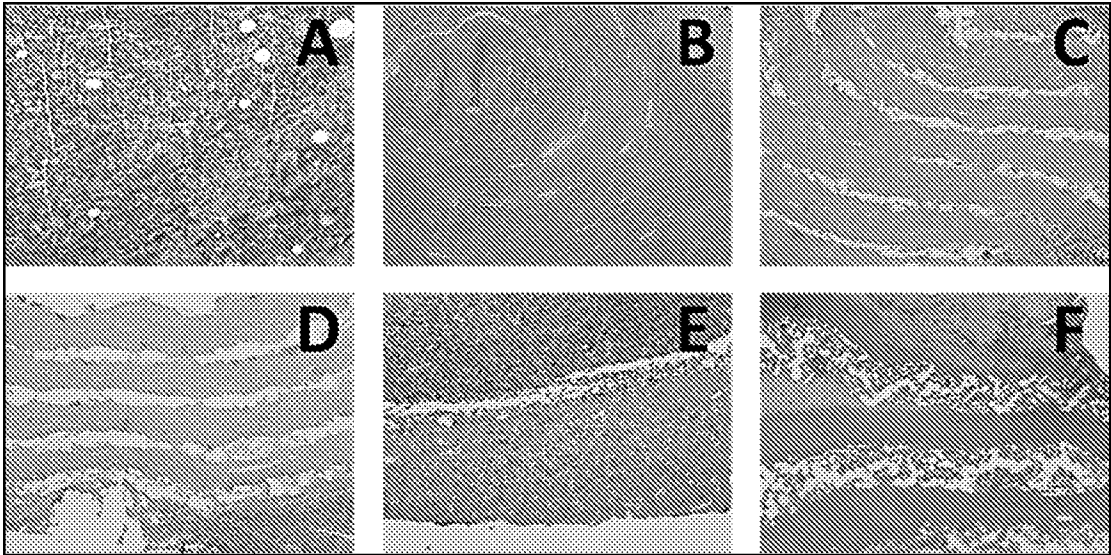


Fig. 4

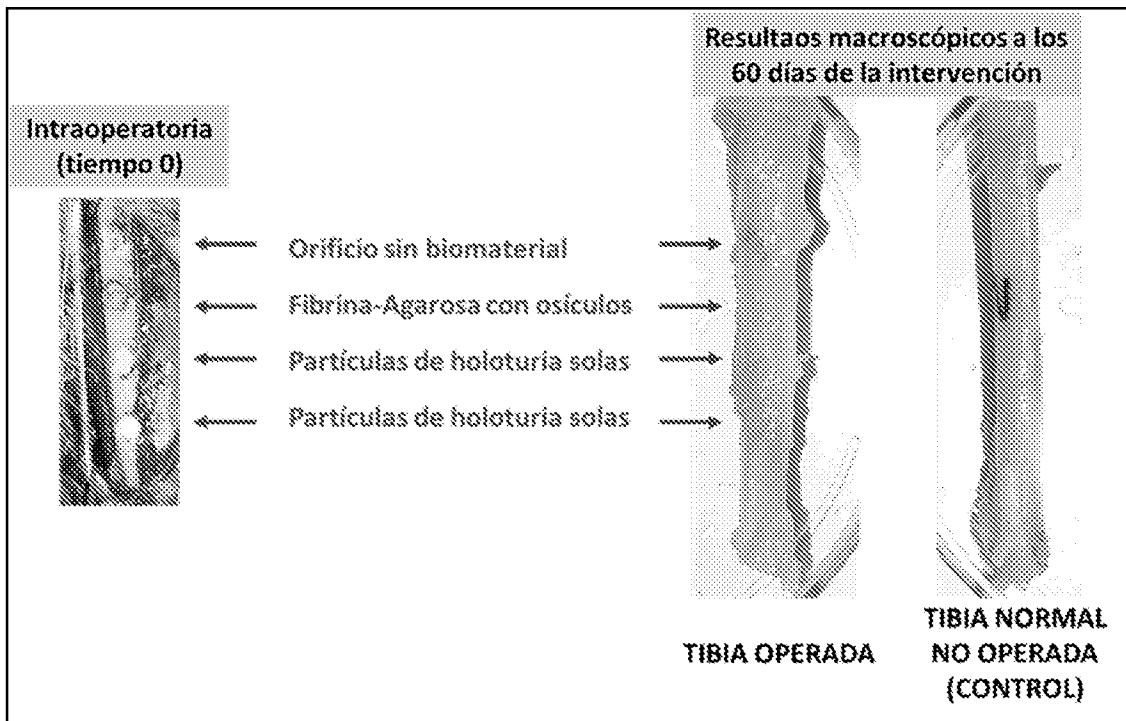


Fig. 5

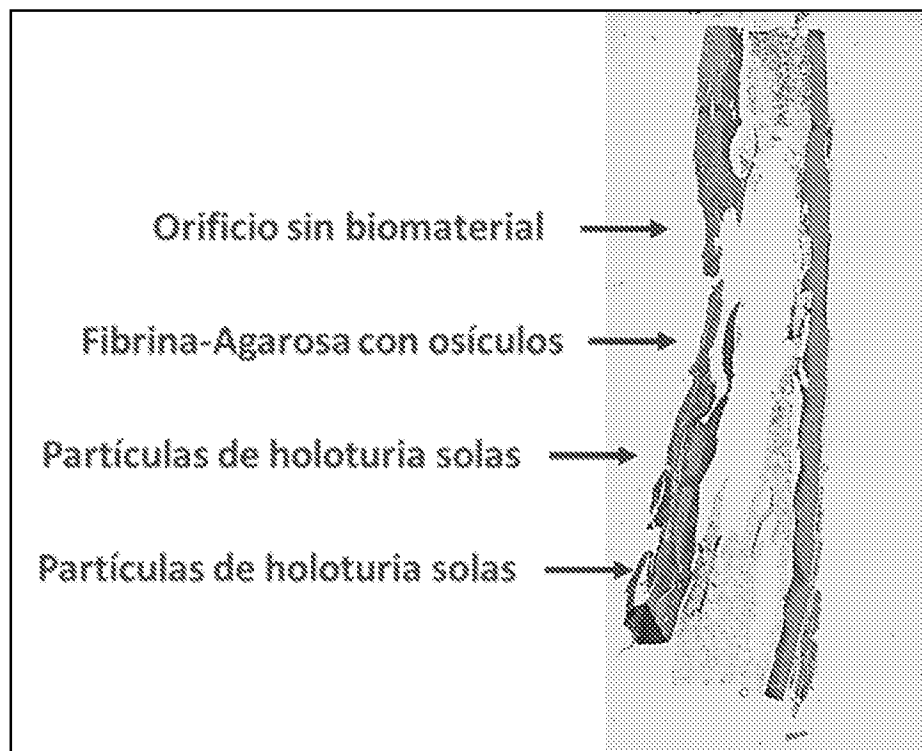


Fig. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2021/070889

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)

A61L, A61K, A61P

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, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP, INTERNET

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARTINA M <i>et al.</i> Developing macroporous bicontinuous materials as scaffolds for tissue engineering. Abstract; page 5610, right column, fourth paragraph; page 5611, left column, first, second, fifth and sixth paragraphs; page 5612; page 5614.	1-3
Y		4-17
Y	ES 2353990 A1 (FUNDACION PARA LA INVESTIGACION BIOSANITARIA DE ANDALUCIA ORIENTAL FIBAO <i>et al.</i>) 09/03/2011, abstract; page 4, lines 37-49; claims 1-15, 27.	4-17
A	CLARKE S A <i>et al.</i> Designs from the deep: Marine organisms for bone tissue engineering. abstract; page 614, right column, second paragraph; Table 3.	1-17

☒ 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
07/04/2022

Date of mailing of the international search report
(11/04/2022)

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer
S. González Peñalba

Telephone No. 91 3493025

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2021/070889

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EBRAHIMI H <i>et al.</i> <i>In vitro</i> study of antibacterial activities of ethanol, methanol and acetone extracts from sea cucumber <i>Holothuria parva</i> . Iranian Journal of Fisheries Sciences 2018., 30/11/2017, Vol. 17, N° 3, pages 542-551, ISSN 1562-2916(print) ISSN 1562-2916(electronic), <DOI: 10.22092/IJFS.2018.116472> abstract.	1-17
A	ALTHUNIBAT O Y <i>et al.</i> ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC PROPERTIES OF TWO SEA CUCUMBERS, HOLOTHURIA EDULIS LESSON AND STICHOPUS HORRENS SELENKA. Acta Biologica Hungarica Jan 2013., 31/12/2012, Vol. 64, N° 1, pages 10-20, ISSN 0236-5383(print) ISSN 1588-256X(electronic), <DOI: 10.1556/ABiol.64.2013.1.2>abstract.	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2021/070889

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L27/36 (2006.01)
A61L27/50 (2006.01)
A61L27/54 (2006.01)
A61L27/56 (2006.01)
A61K35/616 (2015.01)
A61P19/00 (2006.01)
A61P19/08 (2006.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2021/070889

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES2353990 A1	09.03.2011	PT2471902T T	02.08.2018
		US2019247541 A1	15.08.2019
		TR201809713T T4	23.07.2018
		DK2471902T T3	06.08.2018
		ES2677945T T3	07.08.2018
		JP2016165280 A	15.09.2016
		JP2013502915 A	31.01.2013
		JP6010460B B2	19.10.2016
		US2012269776 A1	25.10.2012
		WO2011023843 A2	03.03.2011
		WO2011023843 A3	07.07.2011
		EP2471902 A2	04.07.2012
		EP2471902 A4	25.06.2014
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2021/070889

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)

A61L, A61K, A61P

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, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP, INTERNET

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	MARTINA M <i>et al.</i> Developing macroporous bicontinuous materials as scaffolds for tissue engineering.	1-3
Y	Resumen; página 5610, columna derecha, cuarto párrafo; página 5611, columna izquierda, primer, segundo, quinto y sexto párrafos; página 5612; página 5614.	4-17
Y	ES 2353990 A1 (FUNDACION PARA LA INVESTIGACION BIOSANITARIA DE ANDALUCIA ORIENTAL FIBAO <i>et al.</i>) 09/03/2011, resumen; página 4, líneas37-49; reivindicaciones 1-15, 27.	4-17
A	CLARKE S A <i>et al.</i> Designs from the deep: Marine organisms for bone tissue engineering. resumen; página 614, columna derecha, segundo párrafo; Tabla 3.	1-17

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

* Categorías especiales de documentos citados:	"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.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"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.
"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).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
07/04/2022

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
11 de abril de 2022 (11/04/2022)

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 n°

PCT/ES2021/070889

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	EBRAHIMI H et al. <i>In vitro</i> study of antibacterial activities of ethanol, methanol and acetone extracts from sea cucumber <i>Holothuria parva</i> . Iranian Journal of Fisheries Sciences 2018., 30/11/2017, Vol. 17, N° 3, páginas 542-551, ISSN 1562-2916(print) ISSN 1562-2916(electronic), <DOI: 10.22092/IJFS.2018.116472> resumen.	1-17
A	ALTHUNIBAT O Y <i>et al.</i> ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC PROPERTIES OF TWO SEA CUCUMBERS, HOLOTHURIA EDULIS LESSON AND STICHOPUS HORRENS SELENKA. Acta Biologica Hungarica Jan 2013., 31/12/2012, Vol. 64, N° 1, páginas 10-20, ISSN 0236-5383(print) ISSN 1588-256X(electronic), <DOI: 10.1556/ABiol.64.2013.1.2> resumen.	1-17

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A61L27/36 (2006.01)
A61L27/50 (2006.01)
A61L27/54 (2006.01)
A61L27/56 (2006.01)
A61K35/616 (2015.01)
A61P19/00 (2006.01)
A61P19/08 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2021/070889

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
ES2353990 A1	09.03.2011	PT2471902T T	02.08.2018
		US2019247541 A1	15.08.2019
		TR201809713T T4	23.07.2018
		DK2471902T T3	06.08.2018
		ES2677945T T3	07.08.2018
		JP2016165280 A	15.09.2016
		JP2013502915 A	31.01.2013
		JP6010460B B2	19.10.2016
		US2012269776 A1	25.10.2012
		WO2011023843 A2	03.03.2011
		WO2011023843 A3	07.07.2011
		EP2471902 A2	04.07.2012
		EP2471902 A4	25.06.2014
-----	-----	-----	-----