

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 955**

51 Int. Cl.:
A61L 27/56 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04724075 .9**
96 Fecha de presentación: **29.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1605984**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.12.2005**

54 Título: **MATRIZ POROSA.**

30 Prioridad:
27.03.2003 GB 0307011

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.02.2012

73 Titular/es:
REGENTEC LTD
BIOCITY NOTTINGHAM PENNYFOOT STREET
NOTTINGHAM NG1 1GF, GB

72 Inventor/es:
FRANCE, Richard, Melville y
QUIRK, Robin, Andrew

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 373 955 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Matriz porosa.

Esta invención se refiere a un procedimiento para la producción de una matriz de estructura de tejido.

5 Muchas solicitudes de patentes describen el uso de geles o soles, especialmente hidrogeles, para su uso como estructuras de tejido. Por ejemplo, el documento WO 00/ 23054 describe el uso de de microesferas de alcohol polivinílico en la oclusión de vasos sanguíneos o embolizaciones. Los documentos WO 99/ 15211 y WO 00/ 64977 describen el uso de hidrogeles como estructura de tejido. Los hidrogeles se implantan en un paciente para el soporte del crecimiento de tejido y/o su reparación.

10 El uso de hidrogeles como estructura de tejido es problemático porque aunque los geles por sí mismos pueden llenar adecuadamente la cavidad en la que se insertan, tienen propiedades de difusión malas y como tal los fármacos, nutrientes u otros factores que se suministran al tejido no se difunden adecuadamente a través del gel. Este problema se agrava cuando se siembra el gel con células vivas ya que la mala difusión de nutrientes puede conducir a una muerte celular prematura, dando como resultado posiblemente el fracaso del tratamiento. Otro problema asociado con estructuras de gel es que los procedimientos de reticulación usados para estabilizar o solidificar los geles, especialmente *in situ*, pueden dañar las células atrapadas.

15 También se conocen en la técnica estructuras basadas en polímeros insolubles en agua, por ejemplo, el documento WO 99/ 25391 describe el uso de poli(láctido-co-glicólido) (PLGA) como estructura de polímero para la regeneración de tejido, especialmente tejido óseo. Los polímeros se procesan para formar una estructura porosa. Como con los hidrogeles, los polímeros insolubles en agua se implantan en un paciente para el soporte del crecimiento de tejido y/o su reparación.

20 Sin embargo, la desventaja de estos polímeros insolubles en agua es que sólo pueden llenar cavidades con una forma abierta y los procedimientos de conformado de los materiales aún no se han perfeccionado. Adicionalmente, cuando la estructura se va a sembrar con células, la siembra es ineficaz (se llenan pocos poros con células) o las células se dañan por la estructura durante el procedimiento de siembra, y las células de tejido circundantes también se pueden dañar por los procedimientos de implantación.

25 El documento WO 99/11196 describe el uso de una matriz particulada como estructura de tejido, teniendo las partículas una reticulación interna para estabilizar la estructura de la partícula.

30 De modo similar, el documento PCT/GB02/02813 describe una matriz porosa abierta de material particulado para su uso *in vivo* en o sobre un tejido diana en medicina, comprendiendo la matriz partículas reticuladas entre sí para definir poros entre ellas.

El documento US5502092 describe un procedimiento para la producción de una matriz porosa que comprende un polímero bioabsorbible (primera fase) y una ayuda de adaptación volumétrica (segunda fase) que se retira para proporcionar una estructura porosa por lixiviación o por medio de sublimación.

El documento US-A-4997443 describe una matriz porosa obtenida por la retirada de un gel polimérico reversible.

35 El documento WO0220645 describe matrices de polímero preparadas mezclando dos o más polímeros (dos o más fases) con un fluido supercrítico, tal como dióxido de carbono, que se retira para obtener una matriz porosa.

La presente invención proporciona un procedimiento para la producción de una matriz porosa como se describe en las presentes reivindicaciones.

40 Ventajosamente, este procedimiento permite que la matriz se conforme o se conforme parcialmente antes de su inserción en o sobre el tejido diana.

El término "fluido", como se usa en el presente documento pretende definir cualquier sustancia que fluye y por lo tanto incluye líquidos y sólidos (por ejemplo, en forma de polvo o gránulo o grano, o sólidos plásticos) que pueden fluir y conformar el contorno de su recipiente.

45 El término "solidificar" como se usa en el presente documento pretende definir que la fase se vuelve sólida o semi-sólida.

50 La primera fase puede ser una fase de vehículo porque la fase lleva o contiene el material de la segunda fase, o puede ser una fase de recubrimiento que cubra el material de la segunda fase. Preferentemente, la primera fase no está en un estado líquido o completamente licuado pero es, o se vuelve, suficientemente fluida para mezclarse con y para llevar o cubrir la segunda fase. Por ejemplo, la primera fase puede ser fluida pero pegajosa y cubrir el material particulado de la segunda fase. De forma alternativa, tanto la primera como la segunda fase pueden estar en forma particulada o de polvo y mezclarse juntas. En este caso, de nuevo es deseable que la primera fase sea blanda o pegajosa o de otro modo que pueda cubrir cualquier material particulado de la segunda fase.

Preferentemente, la primera fase se transforma desde un estado fluido a un estado sólido o semisólido en el cambio de un único parámetro, por ejemplo, temperatura, pH, introducción de un agente de reticulación, fijación o gelificación, presencia/ausencia de luz, curado ultravioleta o bajo condiciones anaerobias. Lo más preferentemente, la primera fase se transforma debido a un cambio en la temperatura o el pH, o a la introducción de un agente de reticulación, ajuste o gelificación. Cuando se usa la temperatura, se prefiere que la temperatura sea suficiente para que la fase se vuelva viable pero que no dañe los tejidos circundantes cuando se use. Se puede aplicar a cualquier fase una etapa de sinterización previa a su uso. La segunda fase es preferentemente una fase sólida, pero se puede usar una fase líquida, especialmente cuando el líquido es una emulsión o una suspensión de material particulado. Cuando la matriz porosa se va a usar como una matriz de estructura de tejido, la segunda fase opcionalmente contiene células para la formación de tejido nuevo.

Sin embargo, los presentes inventores han encontrado que se puede usar la matriz como una estructura de tejido sin la necesidad de introducir células. Cuando se sitúa la estructura de tejido (sin células) en o sobre un sitio en el que se necesita, se pueden atraer células endógenas locales o favorecer su crecimiento sobre, en o cerca de la estructura provocando el nuevo crecimiento del tejido existente. Este efecto está potenciado por la presencia de factores de crecimiento apropiados que están presentes en la estructura. Esta situación es particularmente útil ya que hay una posibilidad mucho más baja de rechazo, o de otra reacción inmunitaria, del nuevo tejido que cuando se introduce tejido no endógeno. Por tanto, se puede reducir la necesidad de tratar un paciente con inmunodepresores y se pueden reducir los problemas asociados a ellos. Adicionalmente, esta técnica es útil en pacientes que ya son inmunodeprimidos tales como pacientes de cáncer, niños, ancianos, mujeres embarazadas o personas que padecen sida o hepatitis B.

La primera y segunda fases usadas en la invención se pueden preparar a partir de materiales similares, con propiedades de solidificación o ajuste diferentes. Por ejemplo, la primera y segunda fases se pueden preparar a partir de polímeros similares con pHs de gelificación diferentes o temperaturas de fusión o puntos de transición vítrea diferentes.

En general, uno o ambas de las fases de la invención comprenderán uno o más polímeros. Ejemplos de polímeros sintéticos utilizables en la presente invención incluyen: poli(-hidroxiácidos) especialmente ácidos poliláctico o poliglicólico, copolímeros de poliláctico poliglicólico, copolímeros de poliláctico polietilenglicol (PEG); otros poliésteres que incluyen poli(ϵ -caprolactona), poli(3-hidroxibutirato), poli(s-ácido caproico), poli(p-dioxanona) y poli(fumarato de propileno); poli(orto-ésteres) incluyendo polímeros de adición de poli(ol/acetales de diceteno (como se describe en Heller ACS Symposium, Serie 567, 292-305, 1994); polianhídridos incluyendo poli(anhídrido sebácico) (PSA), poli(carboxibiscarboxifenoxifenoxihexano) (PCPP), poli[bis(p-carboxifenoxi)metano] (PCPM) y copolímeros de SA, CPP y CPM (como se describe por Tamada y Langer en Journal of Biomaterials Science Polymer Edition, 3; 315-353, 1992 y por Domb en el Capítulo 8 de Handbook of Biodegradable Polymers, ed. Domb A. J. y Wiseman R. M., Harwood Academic Publishers); poli(aminoácidos); poli(pseudoaminoácidos) (incluyendo los descritos por James y Kohn en las páginas 389-403 de Controlled Drug Delivery Challenges and Strategies, American Chemical Society, Washington, DC); polifosfacenos incluyendo: derivados de poli[(dicloro)fosfaceno], polímeros de poli[(organo)fosfacenos] (descritos por Schacht en Biotechnology and Bioengineering, 52, 102-108, 1996); polifosfatos; copolímeros de bloque de polietilenglicol polipropileno (por ejemplo, los vendidos con el nombre comercial Pluronic™).

También se pueden usar polímeros naturales, tales como seda, elastina, quitina, quitosano, fibrina, fibrinógeno, polisacáridos (incluyendo pectinas), alginatos, colágeno, poli(aminoácidos), péptidos, polipéptidos o proteínas.

También se pueden usar copolímeros preparados a partir de los monómeros de estos polímeros, como un posible mezclado aleatorio de estos polímeros o mezclas o combinaciones de los mismos.

Los polímeros se pueden reticular por una variedad de procedimientos incluyendo por ejemplo: reticulación UV de polímeros de acrilato, reacción de adición de Michael de polímeros de tiolato o acrilato, polímeros de tiolatos reticulados por medio de sulfonas de vinilo, reticulación por medio de succinatos o sulfonas de vinilo, reticulación por medio de hidrazinas, gelación inducida térmicamente, reticulación enzimática (por ejemplo, la adición de trombina a fibrinógeno), reticulación por medio de la adición de sales o iones, (especialmente iones de Ca^{2+}), reticulación por medio de isocianatos, (por ejemplo, diisocianato de hexametileno).

En una realización preferida, se usan poliésteres de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA). Estos polímeros están aprobados para la administración parenteral por la FDA. Debido a que el PLGA se degrada por medio de hidrólisis no enzimática en las etapas iniciales, las tasas de degradación *in vivo* se pueden predecir a partir de datos *in vitro*. El PLGA se degrada a ácidos láctico y glicólico, sustancias que se hallan de forma natural en el cuerpo.

Sin embargo, los poliésteres pueden ser el sistema de polímero de elección para algunas realizaciones. Cuando el material de poliéster se ha roto en pesos moleculares de aproximadamente 5000 Daltons, el material se puede captar por las células, incluyendo macrófagos, de modo que se puede asociar algo de inflamación con la rotura de estos polímeros.

Se pueden sintetizar copolímeros con aminoácidos, por ejemplo ácido glicólico y glicina, o ácido láctico y lisina (Barrera y col. (1993) J. Am. Chem. Soc., 115, 11010-11011 y Cook y col. (1997) J. Biomed. Mat. Res., 35, 513-523). Estos pueden ser útiles para inmovilizar otras moléculas, por ejemplo por medio de restos de s-amino de lisilo. Se

pueden usar estos polímeros para unir péptidos a las superficies usando enlaces covalentes. Por ejemplo, se pueden unir péptidos a poli(ácido láctico-co-lisina) usando 1,1-carbonil-diimidazol (CDI, Aldrich) como agente de enlace como se describe en la referencias anteriores.

5 Manipulando la proporción molar de ácido láctico y glicólico y el peso molecular de los copolímeros, se pueden obtener patrones de degradación diferentes. El poli-L-láctido tiene un tiempo de degradación *in vitro* de meses a años. El tiempo de degradación largo se debe a su alta cristalinidad, que protege el polímero de la penetración de agua. El poli-glicólido tiene un tiempo de degradación de uno a varios meses, mientras que el poli-D,L-láctido es amorfo y tiene un tiempo de degradación de uno a varios meses. El D,L-PLGA tiene un tiempo de degradación *in vitro* de semanas a meses. Cuando se incrementa la proporción de ácido glicólico, la tasa de degradación se incrementa. Los homopolímeros de ácido s-caproico pueden permanecer intactos durante periodos de 2-3 años de implantación.

10 Preferentemente, al menos una de las fases comprende además un plastificante, ejemplos de éste incluyen polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, policaprolactona, oligómeros de bajo peso molecular de esos polímeros o plastificantes convencionales tales como los usados extensamente para materiales plásticos de productos que incluyen pero no se limitan a adipatos, fosfatos, ftalatos, sabacatos, acelatos y citratos. También se pueden usar plastificantes que son los mismos que los polímeros usados para formar la primera o la segunda fases, tales como poliláctidos, láctido-co-glicólido, etc.

En general, la segunda fase comprenderá las células de tejido necesarias para sembrar o formar la estructura de tejido. Se pueden sembrar las células en un material particulado comprendido, incorporado o cargado dentro de la segunda fase.

20 Es posible usar cualquier célula animal en la estructura de tejido de la presente invención. Ejemplos de células que se pueden usar incluyen pero no se limitan a células óseas, osteoprogenitoras (por ejemplo, de hueso), células de cartílago, músculo, hígado, riñón, piel, endotelio, células del intestino o intestinales, o células especializadas tales como células cardiovasculares, cardiomiocitos, células pulmonares u otras células de pulmón, células placentarias, amnióticas, coriónicas o fetales, células madre, condrocitos, o células reprogramadas de otras partes del cuerpo tales como adipocitos reprogramados para convertirse en células de cartílago.

25 Cuando se usan células madre, preferentemente son células madre no embrionarias como las de médula ósea adulta o la córnea u otras células madre endógenas, tomadas preferentemente del paciente que se va a tratar.

30 Los presentes inventores han señalado en experimentos que las células osteoprogenitoras en un entorno *in vitro* bajo determinadas condiciones producirán cartílago además de hueso, lo que facilita la osificación endocondrial que permitirá la ingeniería de tejidos de una interfase de hueso-cartílago.

Las partículas que se pueden usar en la segunda fase para contener o introducir las células pueden ser del tipo descrito en la solicitud de patente pendiente de tramitación PCT/GB02/02813.

35 Cuando se usa un material particulado en la segunda fase, se prefiere que las partículas sean porosas. Preferentemente, la porosidad de la partícula es al menos de un 10 %, y más preferentemente está por encima de un 40 %, e idealmente incluso puede ser tan alta como de un 70 a un 97 %. Un intervalo de trabajo conveniente puede ser de entre un 50 a un 95 %. En cualquier caso, se prefiere que el tamaño de poro de la partícula sea al menos suficiente para recibir las células que se van a mantener en él. Las células se pueden añadir a la matriz en, o antes de, la implantación de la matriz o después en el caso de reclutamiento de células endógenas *in situ*.

40 En general, las partículas serán micropartículas; aunque cuando se vayan a usar células grandes las partículas pueden estar en el intervalo de mm.

Las partículas se pueden crear usando fluidos supercríticos.

45 Idealmente, el tamaño de poro es del orden de 10 - 80 μm de diámetro. Esto significa que el tamaño de partícula en general es del orden de 50 μm a 1 mm de diámetro o preferentemente de 250- 500 μm . Cuando se puede observar, el tamaño de partícula global será una función del tamaño de poro. Esto es, la aplicación final de la matriz dictará el tamaño de la matriz, de las partículas y el tamaño de poro. Por ejemplo, cuando la matriz no se vaya a cargar con células, el tamaño de poro se hace menos crítico, siempre que la difusión aún pueda producirse a través de la matriz. Adicionalmente, la pérdida de empaquetado incrementa el tamaño de poro de modo que la transferencia de nutriente u otro sea mejor, y viceversa. Sin embargo, el tamaño de poro no siempre es una función del tamaño de célula ya que se pueden sembrar poros grandes con células minúsculas. El uso de estas partículas proporciona la ventaja de asegurar que la matriz global retenga un nivel de porosidad suficiente para el crecimiento celular y por tanto para acomodar el tejido en crecimiento. Preferentemente, las partículas son rugosas al menos en su superficie exterior de modo que todavía se pueden formar poros entre partículas empaquetadas próximas. Adicionalmente, la provisión de una superficie rugosa a la partícula mejora la adhesión de las células a la partícula.

55 La matriz puede comprender fases adicionales que usan, por ejemplo, otra fase de polímero o una fase inorgánica. Los ejemplos de materiales inorgánicos comprendidos en la fase o en cada fase adicional incluyen biovidrios, cerámica, hidroxipatitas, vidrios, vitrocerámica y materiales compuestos.

Se pueden añadir factores útiles para la promoción de crecimiento de tejido y el desarrollo a cualquiera o ambas fases o se pueden usar para recubrir las partículas. Adicionalmente, se pueden añadir diferentes factores a cada una de las fases o al o a cada recubrimiento. Los factores que se pueden añadir de forma útil incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento epidérmico, de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento del fibroblasto básico, factor de crecimiento del endotelio vascular, factor de crecimiento similar a insulina, factor de crecimiento del nervio, factor de crecimiento del hepatocito, factores de crecimiento y transformación y proteínas morfogenéticas óseas, citocinas incluyendo interferones, interleucinas, proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), estrógeno, testosterona, cinasas, quimiocinasas, glucosa u otros azúcares, aminoácidos, factores de calcificación, dopamina, oligopéptidos ricos en amina, tales como dominios de unión a heparina hallados en proteínas de adhesión como fibronectina y laminina, otras aminos tamoxifeno, cis-platino, péptidos y determinados toxoides. Adicionalmente, se pueden añadir fármacos, hormonas, enzimas, nutrientes u otros agentes o factores terapéuticos o mezclas de los mismos a una o ambas fases. De nuevo, se pueden añadir diferentes fármacos, hormonas, enzimas, antibióticos, nutrientes u otros agentes o factores terapéuticos o mezclas de los mismos a cada una de las fases.

Sin embargo, como se menciona anteriormente, los presentes inventores han encontrado que se puede usar la matriz como una estructura de tejido sin la necesidad de introducir células. Cuando se sitúa la estructura de tejido (sin células) en o sobre un sitio en el que se necesita, se pueden atraer células endógenas locales o favorecer su crecimiento sobre, en o cerca de la estructura. Este efecto está potenciado por la presencia de uno o más de los factores de crecimiento descritos anteriormente en la estructura.

El tejido formado según el procedimiento de la presente invención se puede usar *in vivo* como tejido implantado o *in vitro* como cultivos de tejido. Por ejemplo, los tejidos se pueden usar *in vivo* para reemplazar tejidos enfermos retirados, dañados o que no funcionan o *in vitro* como cultivo de tejido. Ventajosamente, la presente invención permite la producción o generación de un tejido de cultivo tridimensional que es útil como herramienta de búsqueda tal como en el estudio de difusión o captación de fármacos o en el uso de células secretoras que a menudo requiere que las células estén en una disposición tridimensional para que se produzca la secreción.

Cuando se va a usar la matriz en un tejido, se introduce preferentemente en el tejido antes de la solidificación.

En una realización preferida, cuando se va a usar el tejido *in vivo*, se prefiere que la primera fase se transforme en un estado sólido o semisólido a o próximo a la temperatura corporal del animal, o a o próximo al pH del tejido apropiado. De forma alternativa, se pueden usar agentes de ajuste para acelerar la solidificación. En cualquier caso, se prefiere que las condiciones necesarias para provocar la solidificación de la primera fase no sean perjudiciales para cualquiera de las células incorporadas en ella.

En una realización preferida de la invención, la primera fase comprende un polímero que tiene una temperatura de transición vítrea baja (T_g) o un polímero con punto de fusión, por ejemplo, por debajo de 45 °C, preferentemente, por debajo de 40 °C e idealmente a o por debajo de 37 °C, y la segunda fase comprende un polímero que tiene una temperatura de transición vítrea más alta o un punto de fusión, por ejemplo > 55 °C. La primera fase se calienta por encima de 45 °C, preferentemente por encima de 40 °C e idealmente por encima de 37 °C para hacer que el polímero sea pegajoso o completamente licuado, la segunda fase se introduce en la primera fase y se mezcla. La mezcla se deja enfriar. Cuando las células van a estar presentes en la matriz, se pueden añadir a la segunda fase antes de su introducción en la primera fase o más preferentemente antes de la solidificación de la matriz. Cualquier fase puede comprender además factores de crecimiento u otros compuestos farmacológicamente activos para lograr un efecto de liberación controlada en su uso.

La estructura de poro está formada por espacios entre las partículas de la o de cada fase o por la licuefacción incompleta de la primera fase además de la porosidad inherente de las propias partículas.

En una segunda realización, la matriz se forma preferentemente por gelación. En esta realización, la primera fase comprende un material que se gelifica con relación a la temperatura, por ejemplo agarosa, o al pH, por ejemplo acrilimida, o con la adición de un agente de ajuste o de gelificación, tal como la adición de trombina a fibrinógeno para producir un gel de fibrina. La primera fase se lleva a un estado fluido o líquido y después se mezcla con una segunda fase, no gelificante, preferentemente sólida. La mezcla se deja enfriar o gelificar. Se pueden añadir células a la segunda fase antes de mezclarla con la primera, o después de mezclar pero antes de que se produzca la gelificación total del gel.

Ahora se describirán las realizaciones de la invención con referencia los siguientes ejemplos y como se ilustran por las figuras 1 a 3 de los dibujos adjuntos, en los que

La figura 1 es una gráfica que muestra el crecimiento celular sobre 15 % de PEG₁₀₀₀/PLGA reticulado con temperatura medido usando un ensayo de reducción de resazurina. Los valores muestran las unidades fluorescentes relativas del producto de reacción reducido después de la sustracción de controles libres de células (n=3, ± DE);

La figura 2 es una gráfica que muestra el crecimiento celular en piezas de P_DL_A poroso reticulado enzimáticamente medido usando el ensayo de reducción de resazurina. Los valores muestran las unidades fluorescentes relativas del producto de reacción reducido después de la sustracción de controles libres de células (n=3, ± DE), y

La figura 3 es una gráfica que muestra el crecimiento celular en micropartículas de P_{DL}LA reticulado enzimáticamente sembradas con fibroblastos dérmicos humanos medido usando el ensayo de reducción de resazurina. Los valores muestran las unidades fluorescentes relativas del producto de reacción reducido después de la sustracción de controles libres de células (n=3, ± DE).

5 **Ejemplo 1**

Reticulación por medio de solidificación provocada por temperatura.

En este ejemplo, la primera fase comprende partículas de mezcla de poli(etilenglicol)/poli(DL-láctido) (10 % en peso de polietilenglicol) y la segunda fase comprende partículas de poli(DL-láctido) porosas preparadas por procedimientos de lixiviación de particulado convencionales. Los dos componentes se mezclan juntos (a un intervalo de proporciones de entre 20:80 y 80:20) y después se calienta hasta 60 °C para producir un material maleable, que se conforma por el cirujano y se aplica en el lugar del defecto. En este ejemplo, la primera fase no se licúa totalmente pero se vuelve un semi-sólido "pegajoso" a la temperatura de procesamiento (por encima de la temperatura de transición vítrea de los polímeros). En otro ejemplo, la primera fase (de una composición de mezcla de polímeros diferentes) se puede licuar totalmente (por encima de la transición de fusión de los polímeros) a 40-60 °C, después de esto, las partículas porosas de la segunda fase se mezclan junto con la primera fase aún líquida. Después, se conforma el material y se aplica al lugar del defecto por el cirujano.

Ejemplo 1A

Solidificación provocada por temperatura

Otros ejemplos de composiciones de mezcla de polímeros, sus temperaturas de transición vítrea (medidas usando calorimetría de barrido diferencial) y temperaturas de reticulación se muestran en la tabla a continuación.

Material	Temperatura de transición vítrea (°C)	Temperatura de reticulación (°C)
P _{DL} LA	48	75-80 °C.
15 % de PEG ₃₄₀₀ /P _{DL} LA	23	55-65 °C
20 % de poli(caprolactona diol ₅₃₀)/P _{DL} LA	23	50-55 °C
15 % de PEG ₄₀₀ /P _{DL} LA	15	45 °C
20 % de PEG ₁₀₀₀ /P _{DL} LA	8	37-40 °C.
10 % de DL-láctido/P _{DL} LA	46	65-70 °C.
PLGA	43	70 °C.
PLGA 15 % PEG ₁₀₀₀ /PLGA	16	37-40 °C.

Ejemplo 1b

Reticulación provocada por temperatura con siembra de células.

Se prepararon mezclas fundidas calentando los componentes (1,7 g de PLGA, 0,3 g de PEG₁₀₀₀) sobre una baldosa de cerámica colocada sobre una placa calentadora y mezclando físicamente los componentes en el estado fundido. Se enfrió el material, se retiró de la baldosa, e inmediatamente se cortó y se molió después de enfriar en nitrógeno líquido. Se almacenaron las mezclas molidas en un desecador de vacío antes de su uso. Se midieron las temperaturas de transición vítrea usando calorimetría de barrido diferencial, tomándose la temperatura desde el punto medio de la región de transición. Se midió la temperatura de transición vítrea de PLGA a 43 °C y la de la mezcla a 16 °C.

Se midió el crecimiento celular en el cultivo estático después de sembrar las estructuras (repetido por triplicado) con fibroblastos dérmicos humanos (y controles libres de células). Se presinterizó el material mezclado molido (80 mg de mezcla molido de 15 % de PEG₁₀₀₀/5050DL) en un molde de PDMS de 6 mm a 37 °C durante 15 minutos. Después, se añadió una suspensión de células al material (5x10⁵ fibroblastos dérmicos humanos (biopsia facial de donante de 50 años de edad, en p8) en 100 µl de medio completo) y se comprimió el material con una espátula y se sinterizó durante 1 hora más a 37 °C. Después, se retiraron las estructuras de los moldes de PDMS y se colocaron en medio de cultivo completo. Se prepararon los controles libres de células sustituyendo 100 µl de medio completo para la suspensión celular. Se cultivaron las estructuras durante 17 días (cultivo estático) en medio completo con cambios de medio completo cada 3-4 días.

Se midieron el crecimiento celular y la proliferación usando un ensayo de reducción de resazurina (figura 1) con lecturas tomadas cada 3-4 días. Se retiraron del cultivo las estructuras, se lavaron en PBS y se colocaron en 1 ml de una solución de resazurina de 10 µg/ml en medio libre de suero durante 1 hora. Después, se alicuotó la solución (3 x 150 µl) en una placa de 96 pocillos y se leyó la intensidad de fluorescencia en un lector de placas con una frecuencia de excitación de 530 nm y una frecuencia de emisión de 590 nm.

Ejemplo 2

Solidificación por gelación

En este ejemplo, la primera fase se compone de una solución de Pluronic F127 (20 % en peso de tampón o medio), que experimenta una transición de líquido a gel por encima de 25 °C. La segunda fase comprende partículas porosas de poli(DL-láctido) preparadas por procedimientos de lixiviación de particulado convencionales. Se mezclan los dos componentes (sobre un intervalo grande de posibles proporciones, por ejemplo 100 µl de fase 1 con 100 mg de fase 2) y se mantiene como un líquido por debajo de la temperatura ambiente. Después se suministran los componentes por medio de inyección en el lugar del defecto, en el que el material gelifica después de alcanzar 37 °C.

Ejemplo 3

15 Solidificación por gelación

En este ejemplo, la primera fase comprende una solución de fibrinógeno (por ejemplo de entre 30 a 200 mg/ml en tampón o medio), que se gelifica después de la adición de trombina. La segunda fase comprende partículas porosas de poli(DL-láctido) preparadas por procedimientos de lixiviación de particulado convencionales. Se mezclan los dos componentes (sobre un intervalo grande de posibles proporciones, por ejemplo 100 µl de fase 1 con 100 mg de fase 2) y se mantiene como un líquido en una jeringuilla lista para inyección. Después de la inyección en el lugar del defecto, se mezclan (usando una jeringuilla de doble cilindro) con una solución de trombina (proporcionando una concentración de trombina final de, por ejemplo, entre 1- 1000 Unidades/ml), lo que da como resultado la reticulación y gelación de la primera fase.

Ejemplo 3a

25 Reticulación de piezas de P_{DL}LA porosas cargadas de células (piezas grandes de 1-2 mm)

Se produjeron piezas de P_{DL}LA porosas por moldeado con disolvente y lixiviación de particulado, usando una fracción de peso de sal de un 80 %. Se mezcló una solución de un 45 % en peso de P_{DL}LA en DCM (900 mg en 2 ml) con 3,6 g de partículas de sal (fracción de 63-106 µm de tamaño después de moler y tamizar, tamaño promedio = 88 ± 27 µm). Después, se vertió la solución de polímero con sal sobre una baldosa de cerámica y se dejó durante toda una noche para que el disolvente se evaporara. Se retiró el compuesto de sal de polímero de la baldosa y se cortó a mano en piezas de 1-2 mm de tamaño. Se lixivió la sal de las piezas por inmersión en agua y se agitó durante toda una noche.

Se midió el crecimiento celular en el cultivo estático después de sembrar las estructuras (repetido por triplicado) con fibroblastos dérmicos humanos (y controles libres de células). Se recubrieron las piezas de P_{DL}LA porosas (2 x 120 mg) en suero (2 ml) por medio de agitación suave durante 1 hora. Se llevó a cabo la siembra de células colocando 120 mg de P_{DL}LA recubierto de suero en 1 ml de una suspensión celular y agitando suavemente durante 1 hora (1,2x10⁶ c/ml en medio libre de suero, fibroblastos dérmicos humanos, biopsia facial de donante de 50 años de edad, en p8). Se colocaron los controles libres de células en medio libre de suero durante 1 hora. Después de la unión de las células, se lavaron las piezas HBSS libre de Ca²⁺. Se añadió una solución de fibrinógeno + trombina (160µl de 100 mg/ml de fibrinógeno con 10 U/ml de trombina) a las piezas y se mezcló, se retiró el exceso de líquido y después se dejó que las piezas se reticularan durante 15 minutos. Se cultivaron las estructuras durante 17 días (cultivo estático) en medio completo (DMEM suplementado con suero de ternero fetal) con cambios de medio completo cada 3-4 días.

Se midieron el crecimiento celular y la proliferación usando un ensayo de reducción de resazurina (figura 2) con lecturas tomadas cada 3-4 días. Se retiraron del cultivo las estructuras, se lavaron en PBS y se colocaron en 1 ml de una solución de resazurina de 10 µg/ml en medio libre de suero durante 1 hora. Después, se alicuotó la solución (3 x 150 µl) en una placa de 96 pocillos y se leyó la intensidad de fluorescencia en un lector de placas con una frecuencia de excitación de 530 nm y una frecuencia de emisión de 590 nm.

Ejemplo 3b

Reticulación de piezas de P_{DL}LA porosas cargadas con células (piezas pequeñas de 250-500 µm)

Se produjeron piezas de P_{DL}LA porosas por moldeado con disolvente y lixiviación de particulado, usando una fracción de peso de sal de un 90 %. Se mezcló una solución de un 45 % de P_{DL}LA en DCM (900 mg en 2 ml) con 8,1 g de partículas de sal molidas (sin tamizar después de moler con una maja y un mortero). Después, se colocó la solución de polímero con sal sobre una baldosa de cerámica y se dejó durante toda una noche para que el disolvente se evaporara. Se retiró el compuesto de sal de polímero de la baldosa y se molió usando una maja y un mortero. Se lixivió la sal de las piezas por inmersión en agua y se agitó durante toda una noche. Después de lixiviar la sal, se tamizaron las piezas porosas y se retuvo una fracción de 250-500 µm.

Se recubrieron las piezas de P_{DL}LA porosas (40 mg) con suero por medio de agitación suave. Después, se lavaron las piezas en PBS. Se sembraron fibroblastos dérmicos humanos (de donante adulto en el paso 15) sobre piezas porosas colocando las piezas porosas en 1 ml de una suspensión celular (9x10⁵ células/ml) en medio libre de suero y agitando suavemente durante 1 hora.

- 5 Después de la unión de las células, se añadió una solución de fibrinógeno + trombina (100 mg/ml de fibrinógeno con 5 U/ml de trombina) a las piezas y se mezcló, se retiró el exceso de líquido y después se dejó que las piezas se reticularan durante 30 minutos.

- 10 Se midieron el metabolismo celular y el crecimiento en la estructura durante 72 horas. Se retiraron del cultivo las estructuras, se lavaron en PBS y se colocaron en 1 ml de una solución de resazurina de 10 µg/ml en medio libre de suero durante 1 hora. Después, se alicuotó la solución (3 x 150 µl) en una placa de 96 pocillos y se leyó la intensidad de fluorescencia en un lector de placas con una frecuencia de excitación de 530 nm y una frecuencia de emisión de 590 nm. El valor de RFU de las estructuras se incrementó desde 296 RFU hasta 569 RFU (después de restar el fondo) entre 24 y 72 horas.

Ejemplo 3c

- 15 Reticulación de micropartículas de P_{DL}LA y células

- 20 Se disolvieron 4 g de P_{DL}LA en 20 ml de diclorometano para producir una solución de un 20 % en peso. Se disolvió poli(alcohol vínicico) (hidrolizado en un 88 %) en agua destilada para dar una solución de un 0,05 % en peso que se filtró a través de un filtro de 0,45 µm. Se dispersó la solución de PVA con un homogeneizador a 6.000 rpm durante 5 minutos después de lo cual se inyectó la solución de P_{DL}LA/DCM en la solución de PVA dispersada. Se homogeneizó la mezcla durante 5 minutos adicionales antes de dejarla agitando durante toda una noche mientras que DCM se evaporaba. Después, se lavaron las micropartículas con agua destilada 3 veces usando una centrifuga antes de que se liofilizaran. Se midió el diámetro de las micropartículas a 200 nm (±10 µm) usando microscopía de campo claro y análisis de imagen.

- 25 Se resuspendieron fibroblastos dérmicos humanos (de biopsia facial de donante de 50 años de edad, en el paso 8) en una pequeña cantidad de medio completo (5x10⁵ células en 50 µl). Se mezcló esta suspensión celular con 100 µl de una solución de fibrinógeno/trombina (150 mg/ml de fibrinógeno en HBSS con 15 U/ml de trombina) y después se añadió esta solución a 200 mg de micropartículas y se mezcló. Se colocó la pasta resultante en un molde con forma de cubo de PDMS de 6 mm y se colocó a 37 °C durante 40 minutos para dejar que se completara la reticulación. Se prepararon los controles libres de células sustituyendo el medio de medio completo para la suspensión celular. Se cultivaron las estructuras durante 17 días (cultivo estático) en medio completo con cambios de medio completo cada 3-4 días.

- 30 Se midieron el crecimiento celular y la proliferación usando un ensayo de reducción de resazurina (figura 2) con lecturas tomadas cada 3-4 días. Se retiraron del cultivo las estructuras, se lavaron en PBS y se colocaron en 1 ml de una solución de resazurina de 10 µg/ml en medio libre de suero durante 1 hora. Después, se alicuotó la solución (3 x 150 µl) en una placa de 96 pocillos y se leyó la intensidad de fluorescencia en un lector de placas con una frecuencia de excitación de 530 nm y una frecuencia de emisión de 590 nm.

Ejemplo 4 (No es un ejemplo del procedimiento reivindicado)

Partículas porosas.

- 40 En este ejemplo, se producen partículas porosas grandes (≥ 500 µm y de hasta varios mm) por técnicas de lixiviación de sal convencionales. Se muele la sal usando una maja y un mortero, después se tamiza reteniéndose la fracción con tamaño apropiado. Idealmente, el tamaño de las partículas de sal será de 50-100 µm. Después, se mezclan las partículas de sal con poli(DL-láctido), en la fase fundida o bien en un disolvente apropiado. La carga de sal será de entre un 50 y un 90 % en peso. Después, se procesa el monolito sólido de compuesto de sal/polímero (después de enfriar o de extraer el disolvente) en partículas grandes moliendo o bien cortando.

- 45 Después se lixivia la sal del compuesto por agitación en agua al menos durante 24 horas.

En otro ejemplo, se puede procesar el compuesto de sal/polímero por técnicas de formación de espuma por gas convencionales usando, por ejemplo CO₂ supercrítico. En otro ejemplo, se pueden preparar piezas de polímero poroso por técnicas de formación de espuma por gas convencionales, usando, por ejemplo, CO₂ supercrítico.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de una matriz de estructura de tejido, comprendiendo la matriz una primera fase y una segunda fase contenida dentro de la primera fase, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - 5 - llevar el material de la primera fase, que se selecciona de un sólido plástico o un sólido que está en forma de polvo, gránulo o grano, a un estado fluido, en el que el término fluido define cualquier sustancia que fluye y en el que en esta etapa el material de la primera fase está parcialmente licuado, o se mantiene suficientemente fluido para que se pueda mezclar con y llevar o recubrir el material de la segunda fase, o se mantiene blando o pegajoso de modo que pueda recubrir el material de la segunda fase,
 - introducir el material de la segunda fase en la primera fase,
 - 10 - mezclar la primera y la segunda fases de modo que la segunda fase esté contenida dentro y distribuida a través de la primera fase, y
 - permitir que la primera fase solidifique para formar un estado sólido o semisólido con la segunda fase contenida dentro y distribuida a través de la primera fase para formar la matriz, teniendo dicha matriz una estructura porosa, en la que la estructura de poro se forma por la primera y/o segunda fase que comprende material particulado y estando presentes espacios entre partículas de la o de cada fase, además de cualquier porosidad inherente de las propias partículas.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la segunda fase comprende un material particulado.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la primera fase y la segunda fase comprenden ambas un material particulado.
- 20 4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la primera y segunda fase están en una forma particulada o de polvo cuando se mezclan.
5. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el tamaño de partícula del material particulado usado para la primera y/o segunda fase es de desde 50 µm hasta 1 mm en diámetro.
6. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la primera fase se transforma de un estado fluido a un estado sólido o semisólido por el cambio de un único parámetro.
- 25 7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la primera fase se transforma de un estado fluido a un estado sólido en respuesta a un cambio en la temperatura.
8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la transformación de la primera fase al estado sólido o semisólido se produce a la temperatura o próxima a la temperatura corporal de un animal.
- 30 9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el único parámetro es pH, introducción de un agente de ajuste, presencia/ausencia de luz, curado ultravioleta, curado infrarrojo o bajo condiciones anaerobias.
10. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la primera y segunda fase comprenden polímeros.
- 35 11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el polímero de la primera fase tiene una temperatura de transición vítrea más baja que el polímero de la segunda fase.
12. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el tamaño de poro es de 10 a 80 µm en diámetro.
13. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que las células están incluidas en la matriz antes de la solidificación.
- 40 14. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que las células se añaden a una fase.
15. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la primera fase es un material particulado sólido que en el estado fluido es pegajoso.
16. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la primera fase y la segunda fase están en forma particulada y en el que las partículas de la primera fase, cuando se mezclan con la segunda fase, recubren el material particulado de la segunda fase.
- 45 17. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la segunda fase comprende un material particulado sólido poroso.

18. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el material particulado poroso tiene una porosidad de desde un 10 hasta un 97 %.
19. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que la primera y segunda fases comprenden materiales similares con diferentes propiedades de solidificación.
- 5 20. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que la primera fase o la segunda fase o tanto la primera fase como la segunda fase comprende un polímero seleccionado de poli(α -hidroxiácidos), ácidos poliláctico o poliglicólico, copolímeros de poli-láctido poli-glicólido, copolímeros de poli-láctido polietilenglicol (PEG), poliésteres, poli ϵ -caprolactona), poli(3-hidroxi-butirato), poli(ácido s-caproico), poli(p-dioxanona), poli(fumarato de propileno), poli(ortoésteres), polímeros de adición de poliol/acetales de diceteno, polianhídridos, poli(anhídrido sebácico) (PSA), poli(carboxibiscarboxifenoxifenoxihexano) (PCPP), poli[bis(p-carboxifenoxi)metano] (PCPM),
10 copolímeros de SA, CPP y CPM poli(aminoácidos), poli(pseudoaminoácidos), polifosfacenos, derivados de poli[(dicloro)fosfaceno], polímeros de poli[(organo)fosfacenos], polifosfatos, copolímeros de bloque polietilenglicol polipropileno, polímeros naturales, seda, elastina, quitina, quitosano, fibrina, fibrinógeno, polisacáridos (incluyendo pectinas), alginatos, colágeno, poli(aminoácidos), péptidos, polipéptidos o proteínas, co-polímeros preparados a partir
15 de los monómeros de estos polímeros, mezclas aleatorias de estos polímeros o mezclas y combinaciones de los mismos.
21. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, en el que el polímero es biodegradable.
22. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 ó 21, en el que se provoca que el polímero experimente reticulación.
- 20 23. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se añade un plastificante a la primera fase o a la segunda fase o tanto a la primera fase como a la segunda fase.
24. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 23, en el que el plastificante es polietilenglicol.

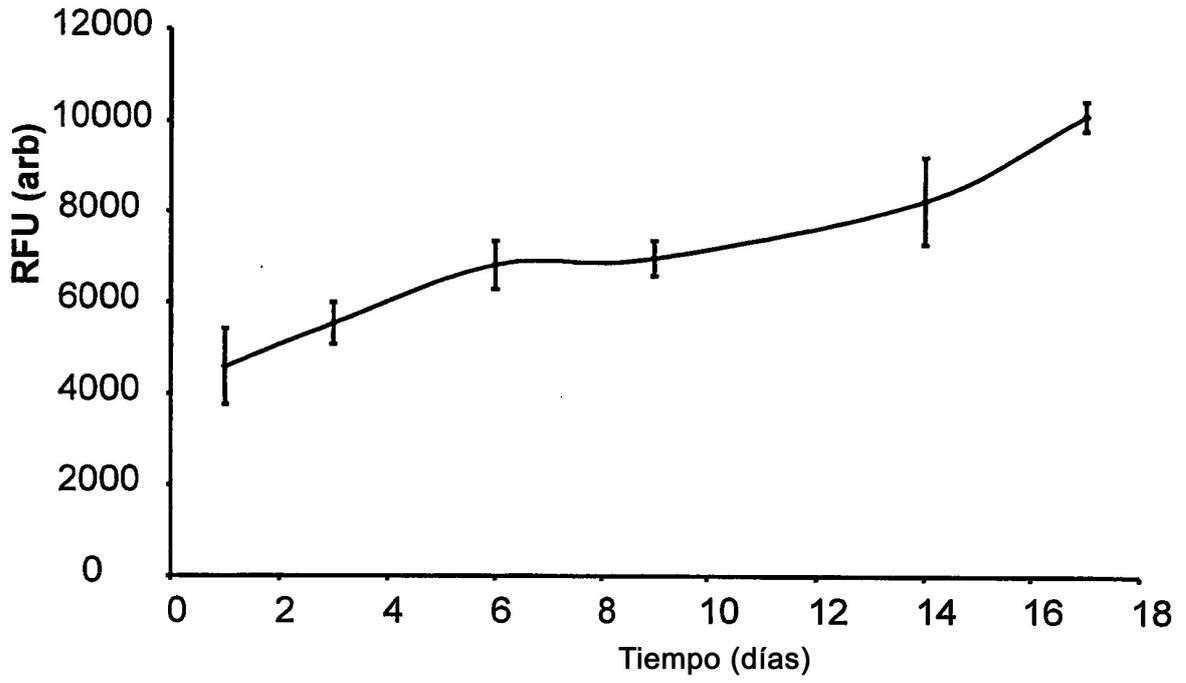


FIG 1

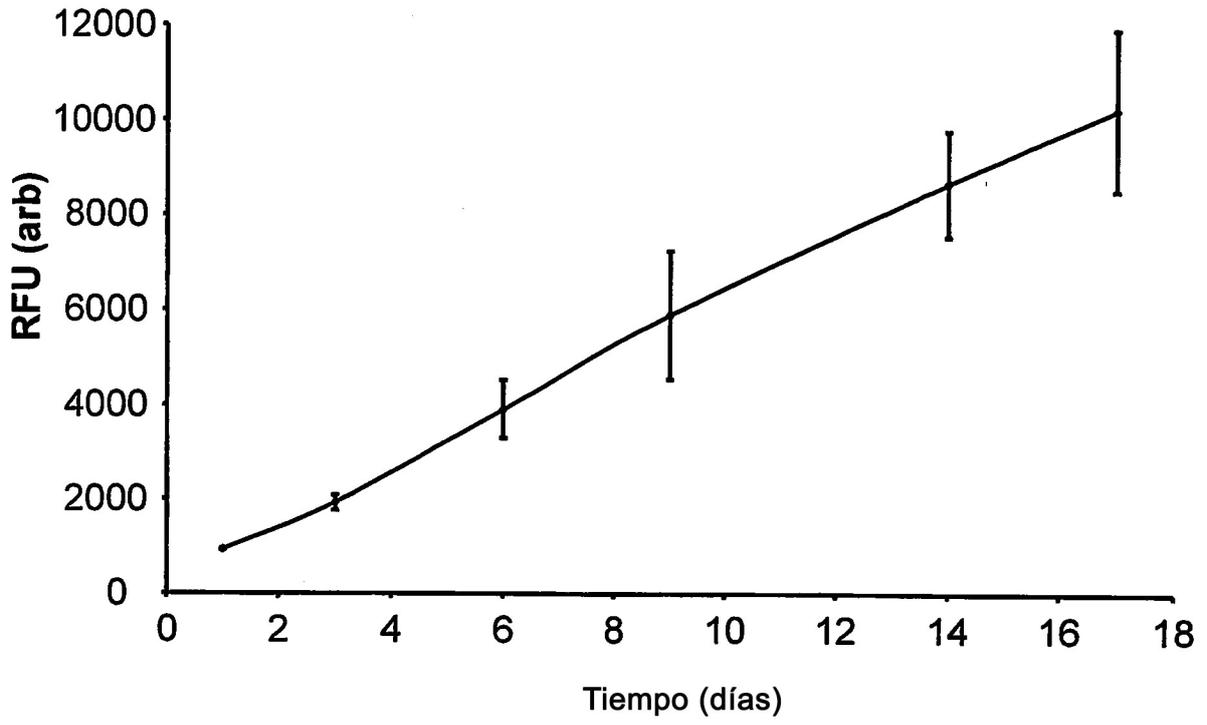


FIG 2

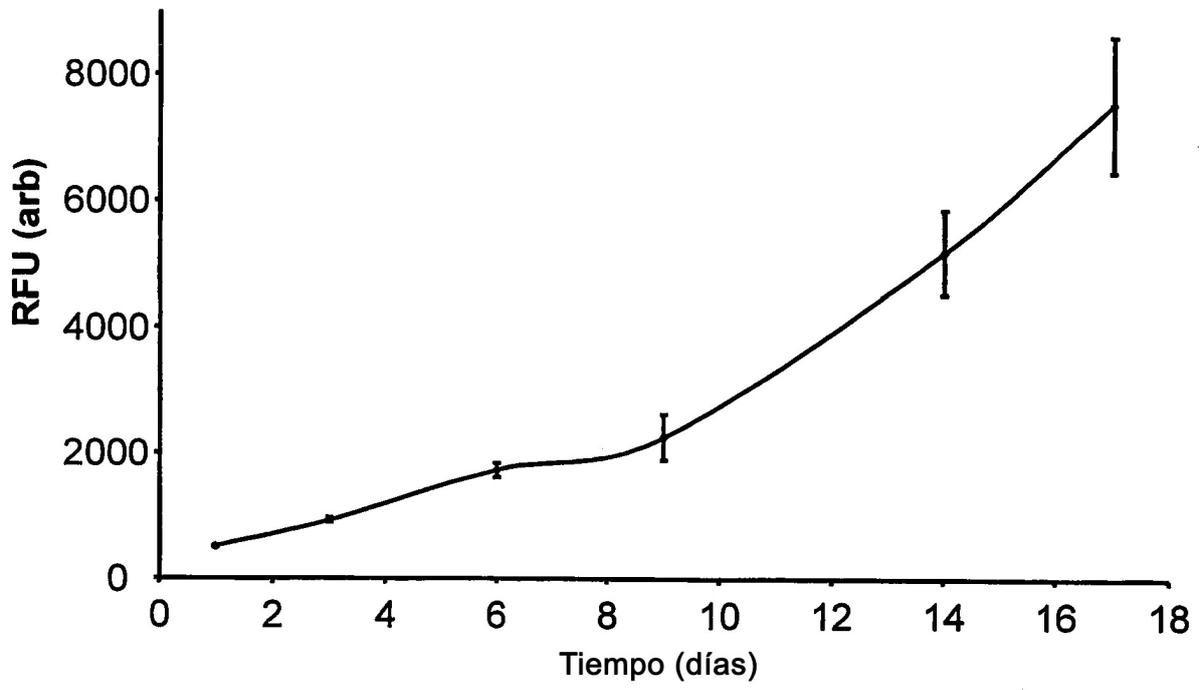


FIG 3