

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 135**

51 Int. Cl.:

A61L 27/34 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
A61L 27/50 (2006.01)
C08L 85/02 (2006.01)
C08G 79/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2002 E 04020856 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 1488817**

54 Título: **Sustratos que contienen polifosfaceno con superficie microestructurada**

30 Prioridad:

11.01.2001 DE 10100961

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

29.08.2013

73 Titular/es:

**CELONOVA BIOSCIENCES GERMANY GMBH
(100.0%)
Söflinger Strasse 100
89077 Ulm, DE**

72 Inventor/es:

GRUNZE, MICHAEL, PROF. DR.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 421 135 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

Sustratos que contienen polifosfaceno con superficie microestructurada

La presente invención se refiere a sustratos que contienen polifosfaceno con una superficie de conformación como matriz para la producción de materiales biológicos implantables en un mamífero así como a sustratos que contienen polifosfaceno con superficie microestructurada.

El cultivo de células, en particular de células endoteliales, con el objetivo de dejar crecer órganos artificiales, es un avance comparativamente nuevo en la implantología. Una ventaja particular de esta técnica es la absoluta compatibilidad con el organismo que cabe esperar de los implantes que se producen de esta manera. Dado que las colecciones de células cultivada *ex vivo* en principio no presentan ni la forma ni una estabilidad mecánica deseada del implante posterior, tal como órganos, arterias, etc., tales implantes se conforman previamente en primer lugar sobre un sustrato de conformación. Los sustratos habituales, sobre los que se cultivan tales células y que representan el almacén de apoyo primario para un implante de este tipo, son por ejemplo polilactidas, polietilenglicoles, poliuretanos, teflón así como sustratos inorgánicos.

A partir del estado de la técnica se conocen y se investigan una pluralidad de materiales, que se usan para la producción de armazones de apoyo primarios o sustratos de apoyo de este tipo. Así, por ejemplo en el documento WO 98/56312 se conoce una envoltura expansible de ϵ -PTFE, que puede usarse también para el cultivo de venas artificiales. Otros materiales para este uso se describen en el documento EP-A-0 810 845, la patente de los Estados Unidos 4.883.699 y la patente de los Estados Unidos 4.911.691. Otros polímeros para el objetivo mencionado son por ejemplo poliácridonitrilo hidrolizado (patente de los Estados Unidos 4.480.642), poliéteres hidrófilos (patente de los Estados Unidos 4.798.876), diacrilatos de poliuretano (patente de los Estados Unidos 4.424.395). Asimismo se conocen distintos hidrogeles que pueden utilizarse como recubrimiento para este objetivo. La serie de materiales potencialmente aplicables puede completarse además mediante polivinilpirrolidona (PVP), poli(alcoholes vinílicos) (PVA), poli(óxido de etileno) (PEO) y poli(metacrilatos de hidroxietilo) p(HEMA). Así mismo, en el estado de la técnica se describe también la aplicación de una serie de materiales convencionales tales como poliuretanos, polietilenos y polipropilenos como posibles materiales para sustratos de este tipo. Igualmente se conocen mezclas de estos materiales entre sí. Una serie de distintos materiales se conoce a partir del documento EP-A-0 804 909.

Dado que las propiedades inherentes a estos materiales son diferentes, puede suponerse que cada uno de estos materiales o cada una de estas materias tratadas presentan propiedades particulares para aplicaciones determinadas en el cultivo de implantes artificiales. De este modo, por ejemplo PVA es muy soluble en líquido y se reabsorbe más rápidamente. Otros materiales presentan una buena compatibilidad con la sangre. A su vez, otros materiales son especialmente muy dúctiles. Sin embargo, lamentablemente, todos los materiales presentan desventajas en diferentes campos. PVA no muestra, por ejemplo, una compatibilidad con la sangre especialmente buena.

ϵ -PTFE es por ejemplo muy dúctil y presenta también una buena compatibilidad con la sangre, sin embargo este material es realmente difícil de manejar y la producción de sustratos de apoyo de este material requiere una serie de etapas de procesamiento determinadas (véase el documento WO 96/00103). También, la superficie así obtenida del sustrato de apoyo de ϵ -PTFE es muy porosa, de modo que las células crecen muy intensamente en este material y al separar el material celular cultivado como implante del sustrato de apoyo es casi inevitable un daño. En el caso de otros materiales pueden conseguirse propiedades elásticas, que son importantes en algunos casos para un sustrato de apoyo de este tipo, sólo mediante la adición de plastificantes, que reducen la compatibilidad con la sangre y con el organismo y mediante el lavado de los "plastificantes" representan adicionalmente una influencia desventajosa del cultivo celular.

Las mayores dificultades conocidas, que aparecen en un cultivo de células para implantes, son por lo tanto por un lado reacciones con el sustrato de apoyo o con los productos de degradación que se generan en este caso. De este modo se conoce por ejemplo, que con la disolución o la reabsorción y la descomposición de algunas de las sustancias conocidas a partir del estado de la técnica pueden aparecer reacciones inflamatorias en el receptor (van der Gießen, Circulation volumen 94, N° 7, 1996). Esto resulta o bien por la compatibilidad parcialmente deficiente de tales sustratos de apoyo o bien por la reacción sobre productos de descomposición que se generan con la descomposición de las sustancias mencionadas. Además pueden aparecer fisuras y rupturas en el implante recién cultivado, cuando el implante cultivado se retire del sustrato de apoyo. Este efecto desventajoso se funda en particular en que las células que crecen para el implante establecen una unión muy estrecha con el sustrato de apoyo, en particular con por ejemplo polilactita, y mediante la estructura de poros, que se genera o bien por la disolución o bien la naturaleza superficial fundamental del sustrato de apoyo, se encarnan con el sustrato de apoyo, de modo que es prácticamente imposible una separación sin daño del implante cultivado.

Además, para el cultivo sin problemas de los implantes mencionados, desempeñan un papel fundamental en particular células, el comportamiento frente a bacterias y proteínas, que se depositan sobre las superficies de los sustratos de apoyo, dado que estas deposiciones pueden llevar esencialmente a inflamaciones en el paciente y a otros problemas en el crecimiento y el cultivo de las células.

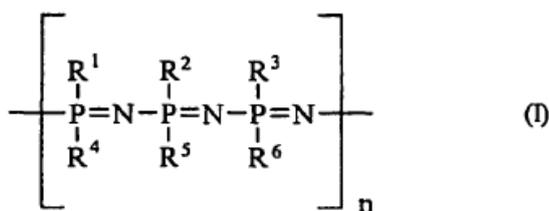
En particular en la producción de implantes de vasos sanguíneos, las fisuras mencionadas, que pueden generarse al separar el implante de vaso sanguíneo cultivado del sustrato de apoyo, son un aspecto esencial. Estas fisuras son por ejemplo puntos de partida para una formación de trombos reforzada en el receptor o paciente y otras deposiciones (proteínas, macrófagos, etc.), que pueden llevar a un riesgo para el receptor o paciente después del implante.

El documento WO 99/45096 da a conocer un recipiente de cultivo de plástico que está previsto para el cultivo de cultivos celulares y de tejidos. La superficie de crecimiento es microestructurada y tiene elevaciones, cuya altura es menor de 110 μm .

El documento WO 01/80919 da a conocer un polímero antitrombogénico y compatible con el organismo y su uso para la producción de envolturas y láminas como parte componente de dispositivos terapéuticos para impedir la proliferación celular excesiva.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención se basa en proporcionar un nuevo sistema para la producción de implantes a partir de material biológico, que permita un crecimiento lo más selectivo posible de las células deseadas así como que garantice una separación esencialmente libre de daño del implante cultivado a partir de las células deseadas del sustrato de apoyo utilizado.

Este objetivo se consigue mediante las formas de realización señaladas en las reivindicaciones. En particular se proporciona un sustrato con una superficie microestructurada, que comprende al menos parcialmente un polímero biocompatible con la siguiente fórmula general (I)



en la que n representa de 2 a ∞ , R^1 a R^6 son iguales o diferentes y significan un resto alcoxilo, alquilsulfonilo, dialquilamino o ariloxilo o un resto heterocicloalquilo o heteroarilo con nitrógeno como heteroátomo, y en el que la estructura superficial presenta un orden de magnitud en el intervalo de 10 nm a 100 μm .

En una forma de realización preferida de la presente invención, el polímero biocompatible según la fórmula (I) se proporciona como recubrimiento sobre el sustrato para la formación de la superficie de conformación. En esta forma de realización de acuerdo con la invención, el sustrato usado no tiene ninguna limitación particular y puede ser cualquier material, tal como plásticos, metales, aleaciones de metal y cerámicas. El recubrimiento biocompatible presenta por ejemplo un grosor de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1000 μm , preferentemente hasta aproximadamente 10 μm y de manera especialmente preferente hasta aproximadamente 1 μm . En otra forma de realización preferida de la presente invención, el sustrato con una superficie de conformación es un cuerpo moldeado a partir del polímero biocompatible según la fórmula (I).

El grado de polimerización del polímero biocompatible según la fórmula (I) se encuentra preferentemente en un intervalo de 20 a 200.000, más preferentemente de 40 a 100.000.

Preferentemente, al menos uno de los restos R^1 a R^6 en el polímero usado es un resto alcoxilo, que está sustituido con al menos un átomo de flúor.

Los restos alquilo en los restos alcoxilo, alquilsulfonilo y dialquilamino son por ejemplo restos alquilo de cadena lineal o ramificada con 1 a 20 átomos de carbono, pudiendo estar sustituidos los restos alquilo por ejemplo con al menos un átomo de halógeno, tal como un átomo de flúor.

Ejemplos de restos alcoxilo son grupos metoxilo, etoxilo, propoxilo y butoxilo, que pueden estar sustituidos preferentemente con al menos un átomo de flúor. Se prefiere especialmente el grupo 2,2,2-trifluoroetoxilo. Ejemplos de restos alquilsulfonilo son grupos metilo, etilo, propilo y butilsulfonilo. Ejemplos de restos dialquilamino son grupos dimetilo, dietilo, dipropilo y dibutilamino.

El resto arilo en el resto ariloxilo es por ejemplo un compuesto con uno o varios sistemas de anillo aromáticos, pudiendo esta sustituido el resto arilo por ejemplo con al menos un resto alquilo definido anteriormente. Ejemplos de restos ariloxilo son grupos fenoxilo y naftoxilo y derivados de los mismos.

El resto heterocicloalquilo es por ejemplo un sistema de anillo que contiene de 3 a 7 átomos, siendo al menos un átomo de anillo un átomo de nitrógeno. El resto heterocicloalquilo puede estar sustituido por ejemplo con al menos un resto alquilo definido anteriormente. Ejemplos de restos heterocicloalquilo son grupos piperidinilo, piperazinilo,

pirrolidinilo y morfolinilo y derivados de los mismos. El resto heteroarilo es por ejemplo un compuesto con uno o varios sistemas de anillo aromáticos, siendo al menos un átomo de anillo un átomo de nitrógeno. El resto heteroarilo puede estar sustituido por ejemplo con al menos un resto alquilo definido anteriormente. Ejemplos de restos heteroarilo son grupos pirrolilo, piridinilo, piridinolilo, isoquinolinilo y quinolino, y derivados de los mismos.

- 5 En una forma de realización preferida adicional de acuerdo con la invención, entre la superficie del sustrato y el recubrimiento biocompatible, construido a partir del derivado de polifosfaceno, está dispuesta una capa que contiene un promotor de la adhesión.

10 El promotor de la adhesión o espaciador contiene preferentemente un grupo terminal polar. Ejemplos de lo mismo son grupos hidroxilo, carboxi, carboxilo, amino o nitro. Pueden usarse también grupos terminales del tipo O-ED, significando O-ED un resto alcoxilo, alquilsulfonilo, dialquilamino o ariloxilo o un resto heterocicloalquilo o heteroarilo con nitrógeno como heteroátomo y pudiendo estar sustituido de manera diferente, por ejemplo con átomos de halógeno, en particular flúor.

15 En particular, el promotor de la adhesión puede ser por ejemplo un compuesto de organosilicio, preferentemente un silano terminado con amino o a base de aminosilano, alquenos terminados con amino, alquenos terminados con nitro y silanos o un ácido alquilsulfónico. Se prefiere especialmente aminopropiltrimetoxisilano.

El promotor de la adhesión mejora en particular la adherencia del recubrimiento sobre la superficie del sustrato mediante el acoplamiento del promotor de la adhesión con la superficie del sustrato, por ejemplo a través de enlaces iónicos y/o covalentes y mediante el acoplamiento adicional del promotor de la adhesión con el polímero descrito de la fórmula (I) del recubrimiento, por ejemplo a través de enlaces iónicos y/o covalentes.

20 La expresión "material biológico" comprende por ejemplo células eucariotas, asociaciones celulares de una o varias capas, tejido o componentes celulares de origen mamífero, en particular humano. En una forma de realización preferida, el donante del material biológico de partida es idéntico al receptor para el material biológico implantable. Ejemplos de material de partida biológico o material biológico son células endoteliales de diferente origen (por ejemplo de la piel, el prepucio, venas tales como aorta, tejido graso, ojo, red estomacal, cordón umbilical, varices o similar), células epiteliales de diferente origen (por ejemplo del estómago, intestino o similar), células óseas, todas las células adherentes o células en las que puede inducirse una adherencia, asociaciones celulares o tejido (por ejemplo piel artificial, cultivada en cultivo o tejido similar), tejido natural así como proteínas, moléculas de azúcar y lípidos. Con el uso del sustrato con superficie de conformación pueden producirse por lo tanto por ejemplo órganos, venas, huesos, cartílagos, vainas de mielina, etc. artificiales.

30 En un procedimiento para la producción de los sustratos definidos anteriormente con una superficie de conformación, se conoce en el estado de la técnica la aplicación de un recubrimiento de polímero biocompatible según la fórmula (I) sobre la superficie de un cuerpo moldeado o sustrato de apoyo.

Por ejemplo, la producción de los sustratos con superficie de conformación de acuerdo con una forma de realización preferida puede realizarse en general mediante las siguientes etapas:

35 (a) una disolución, que contiene al menos un compuesto de la fórmula general (I) en una concentración del 0,1 % - 99 %, se prepara en un disolvente, siendo este disolvente orgánico y polar. Por ejemplo, en este caso pueden usarse como disolvente acetato de etilo, acetona, THF, tolueno o xileno. Asimismo pueden usarse también mezclas de estos disolventes o pueden completarse con otros disolventes. Esta disolución se añade sobre un sustrato, que no muestra nada de adhesión o una baja adhesión frente al polímero, tal como por ejemplo vidrio, silicio, distintas cerámicas u otros materiales correspondientes, tales como polímeros (PDMS, teflón, PMMA, policarbonatos o silicona). Las superficies de los sustratos expuestos pueden estar también modificadas químicamente, por ejemplo mediante la introducción de determinados grupos funcionales (-NH₂, -OH, -COOH, -COH, -COOMe, -CF₃, etc.).

45 (b) la evaporación del disolvente puede desarrollarse sin medidas adicionales, sin embargo, en el mejor de los casos, la concentración del vapor de disolvente por encima del sustrato se ajusta de manera controlada, tal como también la presión y la temperatura. Al inicio de la primera fase de secado la atmósfera sobre el sustrato recubierto estará saturada vapor de disolvente, reduciéndose lentamente la concentración del vapor de disolvente entonces durante varias horas. La temperatura puede variar desde -30 °C hasta + 90 °C. La presión durante la primera fase de secado puede atravesar un gradiente desde presión normal hasta vacío de chorro de agua (2,67 kPa). Después de la primera fase de secado se seca adicionalmente el sustrato recubierto durante un tiempo determinado en vacío de bomba de aceite (1,33 Pa).

50 El sustrato recubierto con el polímero biocompatible según la fórmula (I) puede usarse entonces de manera adicional directamente, sin o después de una esterilización correspondiente. Dependiendo de la concentración de la disolución de polímero y de las condiciones mencionadas durante la primera fase de secado se obtienen distintos grosores de capa de 0,1 μm a 300 μm o más gruesos, preferentemente en el intervalo de 0,5 μm bis 30 μm, y de manera especialmente preferente de 5 μm.

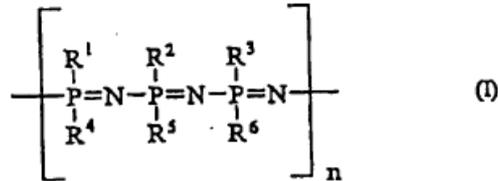
5 La presente invención se refiere a un sustrato con una superficie microestructurada, que comprende al menos parcialmente un polímero biocompatible según la fórmula (I), tal como se definió anteriormente, en el que las estructuras superficiales presentan un orden de magnitud en el intervalo de 10 nm a 100 μm . En una forma de realización preferida, el polímero biocompatible como recubrimiento con una superficie microestructurada exterior se encuentra sobre la superficie del sustrato.

10 La estructuración de la superficie no está sujeta a ninguna limitación particular. De este modo pueden producirse todas las estructuras que puedan generarse de mediante fotolitografía o con chorro de electrones o con chorro de iones o con el láser o por medio de otras técnicas. La microestructuración de la superficie del sustrato o del recubrimiento puede obtenerse también mediante "estructuración en fundido", llevándose un alambre delgado hasta la temperatura de fusión del polímero biocompatible, que entonces funde la estructura deseada mediante contacto directo en la superficie del recubrimiento o del cuerpo moldeado.

15 Mediante esta estructuración pueden conseguirse ventajas particulares, porque se graban estructuras en la superficie del recubrimiento o del sustrato, que hacen especialmente favorable el comportamiento de flujo de líquidos (por ejemplo zapa o efecto loto).

REIVINDICACIONES

1. Sustrato con una superficie de conformación microestructurada como matriz para la producción de materiales biológicos implantables en un mamífero, que comprende al menos parcialmente un polímero biocompatible con la siguiente fórmula general (I)



5 en la que n representa de 2 a ∞, R¹ a R⁶ son iguales o diferentes y significan un resto alcoxilo, alquilsulfonilo, dialquilamino o ariloxilo o un resto heterocicloalquilo o heteroarilo con nitrógeno como heteroátomo, y en el que las estructuras superficiales presentan un orden de magnitud en el intervalo de 10 nm a 100 μm.

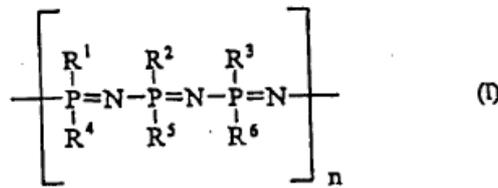
10 2. Sustrato de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polímero biocompatible está presente como recubrimiento con superficie microestructurada exterior sobre la superficie del sustrato.

3. Sustrato de acuerdo con la reivindicación 2, en el que entre la superficie del sustrato y el recubrimiento de polímero biocompatible está dispuesta una capa que contiene un promotor de la adhesión.

4. Sustrato de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el promotor de la adhesión es un compuesto que contiene un grupo terminal polar, en particular un compuesto de organosilicio.

15 5. Sustrato de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el compuesto de organosilicio es aminopropiltrimetoxisilano.

6. Uso de un sustrato con una superficie microestructurada, que comprende al menos parcialmente un polímero biocompatible con la siguiente fórmula general (I)



20 en la que n representa de 2 a ∞, R¹ a R⁶ son iguales o diferentes y significan un resto alcoxilo, alquilsulfonilo, dialquilamino o ariloxilo o un resto heterocicloalquilo o heteroarilo con nitrógeno como heteroátomo, y en el que las estructuras superficiales presentan un orden de magnitud en el intervalo de 10 nm a 100 μm, como sustrato con una superficie de conformación como matriz para la producción de materiales biológicos implantables en un mamífero.

7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el polímero biocompatible está presente como recubrimiento con superficie microestructurada exterior sobre la superficie del sustrato.

25 8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que entre la superficie del sustrato y el recubrimiento de polímero biocompatible está dispuesta una capa que contiene un promotor de la adhesión.

9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el promotor de la adhesión es un compuesto que contiene un grupo terminal polar, en particular un compuesto de organosilicio.

10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el compuesto de organosilicio es aminopropiltrimetoxisilano.