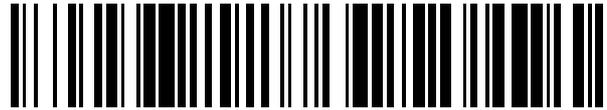


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 654**

51 Int. Cl.:

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 35/34 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2004 E 04731094 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 1620140**

54 Título: **Preparaciones poliméricas reticuladas inyectables y usos de las mismas**

30 Prioridad:

05.05.2003 IL 15577403

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.01.2014

73 Titular/es:

**BEN-GURION UNIVERSITY OF THE NEGEV
RESEARCH AND DEVELOPMENT AUTHORITY
(100.0%)
P.O. BOX 653
84105 BEER-SHEVA, IL**

72 Inventor/es:

**COHEN, SMADAR y
LEOR, JONATHAN**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 440 654 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

Preparaciones poliméricas reticuladas inyectables y usos de las mismas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a preparaciones farmacéuticas inyectables que contienen una solución de alginato reticulado, solución de alginato que forma un hidrogel *in vivo*. La invención también se refiere a los diversos usos de las soluciones de alginato reticuladas inyectables y a métodos de tratamiento que usan las mismas, en particular la
10 reparación de daños en el tejido cardiaco y ablación de arritmias cardiacas y un kit para el tratamiento de tejido corporal que comprende estas soluciones.

Antecedentes de la invención

15 El infarto de miocardio (IM) da como resultado una pérdida aguda de miocardio y un aumento brusco de las condiciones de carga que induce la remodelación del ventrículo izquierdo (LV) [Sutton, M.G. y Sharpe, N. (2000) *Circulation* 101: 2981-2988; Mann, D.L. (1999) *Circulation* 100: 999-1008; Jugdutt, B.I. (2003) *Circulation* 108: 1395-1403]. La primera fase de remodelación del LV implica la expansión de la zona del infarto, que puede dar como resultado una ruptura ventricular precoz o formación de aneurismas. La remodelación tardía implica a todo el LV y
20 está asociada con la dilatación dependiente del tiempo, reclutamiento de la zona límite del miocardio en la cicatriz, distorsión de la forma ventricular e hipertrofia mural. Esto da como resultado un deterioro progresivo de la función de contráctil, insuficiencia cardiaca y muerte [Sutton, M.G. y Sharpe, N. (2000) *id ibid.*; Mann, D.L. (1999) *id ibid.*; Jugdutt, B.I. (2003) *id ibid.*]. El cese o la reversión de la remodelación de la cámara progresiva es un objetivo importante de la terapia para la insuficiencia cardiaca. Sin embargo, las intervenciones clínicas actuales para
25 minimizar los efectos devastadores de un ataque cardiaco frecuentemente no son suficientes para prevenir daños irreversibles, remodelación del LV y posterior desarrollo de insuficiencia cardiaca y muerte [Khand, A.U. y col. *Eur. Heart J.* 22: 153-164; Jessup, M. y Brozena, S. (2003) *N. Engl. J. Med.* 348: 2007-2018; Redfield, M.M. *N. Engl. J. Med.* 347: 1442-1444]. Sin embargo, en la última década, varios grupos de investigación que incluyen a los presentes inventores han mostrado que inyecciones directas de suspensiones celulares de miocitos cardiacos
30 fetales o neonatales en infartos de miocardio experimentales mejoraron la remodelación y la función del corazón [Etzion, S. y col. (2001) *J Mol Cell Cardiol*; 33: 1321-1330; Leor, J. y col. (2003) *Expert Opin. Biol. Ther.* 3: 1023-39]. Otros replicaron estos hallazgos alentadores mediante el uso de células derivadas de la médula ósea y mioblastos esqueléticos o células madre embrionarias. Informes recientes sugieren que las células madre cardiacas endógenas pueden ser capaces de proliferar en el miocardio en determinadas circunstancias, y pueden migrar de la médula
35 ósea al corazón y posiblemente contribuir a la reparación después de la enfermedad cardiaca [Beltrami, A.P. y col. (2003) *Cell*; 114: 763-776].

Los resultados prometedores del trasplante de células cardiacas en modelos animales se ha atribuido parcialmente a la reconstrucción de la matriz extracelular (ECM), que mantenía la estructura, grosor, y elasticidad de la pared del LV
40 [Etzion, S. y col. (2001) *J Mol Cell Cardiol*; 33: 1321-1330]. Sin embargo, los enfoques en trasplantes celulares pueden ser de poco beneficio clínico cuando la estructura cardiaca local no puede soportar la siembra celular porque está ausente o seriamente dañada. El concepto de ingeniería tisular podría resolver este problema mediante el uso de armazones de biomaterial en 3-D que reemplazan la infraestructura perdida o dañada (ECM) y que proporcionan un soporte temporal para células las autoimplantadas o implantadas [Leor, J. y col. *Circulation* (2000); 102: III56-61].

45 Anteriormente, los presentes inventores mostraron cómo la implantación de armazones de alginato sembrados con cardiomiocitos sobre el miocardio con infarto puede prevenir la remodelación y la disfunción del LV [Leor, J. y col. (2000) *id ibid.*]. Esta estrategia, sin embargo, podría estar limitada debido a una falta de células apropiadas, riesgo de intervención quirúrgica, anestesia general y acceso restringido al tabique del LV y a la pared inferior. El objetivo
50 del presente estudio fue investigar si la inyección de un nuevo biomaterial a base de alginato puede conservar de forma eficaz la estructura y la función del LV después del IM agudo mientras que proporciona armazones biológicos para la curación y la auto reparación. Aquí, los inventores presentan evidencias del uso de este enfoque y sugieren que este método tiene ventajas sobre las estrategias usadas habitualmente.

55 La inyección de biopolímeros se ha usado hasta ahora para apoyar y promover el injerto de células cotrasplantables.

Anteriormente, las formulaciones inyectables de alginato se basaban en formulaciones de geles de alginato cálcico de polimerización lenta [documento WO 94/25080]. Estas formulaciones se usaban para administrar un gran número de condrocitos por medio de inyección, con el fin de generar nuevo cartilago. El tratamiento endoscópico del reflujo
60 vesicoureteral se intentó mediante la inyección de alginato y condrocitos. Sin embargo, el comportamiento del sistema fue menos que satisfactorio.

Las composiciones inyectables que contienen células se produjeron mediante suspensión de células adecuadas en medio My99, mezclando la suspensión celular con una parte igual de una solución de alginato sódico al 2 %, y a
65 continuación añadiendo polvo de sulfato cálcico sólido para iniciar la reticulación del alginato para formar un gel. Dichas composiciones por lo general contienen alginato sódico al 1 % en un hidrogel con sulfato cálcico insoluble en

una cantidad de 200 mg por ml de suspensión. Una pequeña cantidad de cloruro cálcico se puede transportar en la composición a partir de la suspensión celular. La experiencia indica que dichas suspensiones tienen un periodo latente del orden de una hora, seguido de un rápido aumento de viscosidad para producir un gel relativamente duro, incluso quebradizo en una media hora desde el aumento de la viscosidad [documento WO 94/25080].

5 Sin embargo, la consistencia de las suspensiones celulares de hidrogel del tipo que se ha descrito anteriormente no es totalmente satisfactoria para el fin de inyección en pacientes que lo necesitan. En algunos casos, la suspensión de células e hidrogel se endurece antes de que se pueda inyectar en el paciente. En particular, las deficiencias de estas formulaciones inyectables de alginato y células que no permite su uso en ensayos clínicos es el rendimiento
10 inconsistente entre lotes, debido a la escasa distribución de los componentes durante la formulación.

La patente de Estados Unidos N° 6.134.334 describe vehículos farmacéuticos acuosos, no inyectables que contienen material de gelificación, que se pueden usar como un sistema de administración de fármacos, o específicamente como composiciones protectoras de córnea o como composiciones de protección de córnea
15 ablativa.

El documento WO 99/15211 describe una composición inyectable, que tiene una consistencia similar con la pasta de Teflón POLYTEF™ en la inyección.

20 La patente de Estados Unidos N° 5.709.854 describe soluciones inyectables de células y polímeros, que se gelifican *in vivo* y que se usan para promover la formación de tejidos. Específicamente, la solución inyectable de alginato se polimerizó usando sulfato cálcico. La solución de alginato era líquida solamente durante un periodo de tiempo limitado (entre 30 y 45 minutos, a 4 °C), contenía condrocitos, y se usó para la regeneración de cartílagos.

25 Se han descrito otras composiciones farmacéuticas poliméricas inyectables. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.129.761 describe hidrogeles que polimerizan lentamente que se usan para la administración de células por inyección. Específicamente, la publicación describe suspensiones de células y polímeros, en las que el polímero puede ser, *entre otros*, un alginato, y está destinado para mejorar la implantación de las células.

30 La patente de Estados Unidos N° 6.171.610 describe la generación de un nuevo tejido mediante composiciones líquidas de hidrogel que comprenden un hidrogel y células precursoras de tejidos.

Las técnicas que se describen en estas referencias usan células necesariamente. Esto puede ser una desventaja considerable. Además, los procedimientos para preparar el polímero inyectable, por ejemplo el método que se describe en el documento WO 94/25080, son diferentes del método que se proporciona en la presente invención.
35

Un biopolímero inyectable que evita la remodelación negativa del LV y conserva la función cardíaca después del infarto del miocardio se describió en Karen L. Christman [International Conference on Engineering Tissue Growth, Pittsburg, Pensilvania, Estados Unidos, 17-20 de marzo de 2003]. El autor indicó que el pegamento de fibrina inyectable puede servir como un soporte de pared interna y/o almacén de ingeniería tisular para prevenir la remodelación ventricular perjudicial y el deterioro de la función cardíaca. Dado que esta publicación propone el uso de composiciones sin células, se debe de indicar que el pegamento de fibrina, *in vivo* se puede conservar como tal solamente durante aproximadamente 7 días, y además, es inmuno- y trombogénico. Estas son desventajas evidentes en los procesos bastante largos de regeneración tisular.
40
45

El documento WO97/44070 (de los presentes inventores) describe polisacáridos implantables, por ejemplo alginato, esponjas para su uso como una matriz, sustrato o almacén para el reemplazo o la reparación de tejido que ha sido retirado o dañado. Las esponjas que se describen en la presente publicación no son inyectables, y requieren intervención quirúrgica. Evitar la cirugía sería una ventaja importante.
50

La patente de Estados Unidos N° 5.776.445 describe un sistema de administración oftálmica que comprende un alginato que tiene una proporción en particular de ácido gúlcico, que experimenta un cambio a partir de la fase disuelta a una fase de gel después del contacto con el fluido lagrimal.

55 En la búsqueda de una composición para promover la reparación de tejidos dañados, los inventores encontraron que las soluciones poliméricas inyectables pueden ser útiles. Más específicamente, los presentes inventores desarrollaron un nuevo hidrogel, un alginato reticulado, que se puede mantener en forma líquida indefinidamente (en condiciones constantes) y solamente geles *in vivo*. Por lo tanto, puede servir como un material óptimo a usar para la reparación de tejidos.
60

Por lo tanto es un objeto de la presente invención proporcionar dicha solución inyectable, que contiene polímeros bioerosionables, no degradables enzimáticamente, no inmunogénicos, así como el método de preparación de los mismos. Dicho polímero es capaz de reticularse a través de enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno para crear una red estructurada que atrapa moléculas de agua.
65

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar composiciones que comprenden dichas soluciones inyectables en las que dicho polímero es alginato, particularmente alginato reticulado.

5 Además, otro objeto de la presente invención es el uso de dicho alginato reticulado en la preparación de soluciones inyectables para promover la reparación y regeneración de tejidos, particularmente para la reparación de tejido cardiaco dañado.

Estos y otros objetos de la invención se convertirán en evidentes a medida que la descripción transcurre.

10 Sumario de la Invención

15 Tal como se describe en el presente documento, los presentes inventores desarrollaron un biomaterial de alginato reticulado que fluye como líquido pero que aún mantiene suficiente consistencia hasta la inyección en la ubicación adecuada en el organismo, en el que forma un gel sólido. Más sorprendentemente, la inyección de este biomaterial de alginato reticulado promueve la regeneración del miocardio dañado y aumenta su función, sin la necesidad de cotrasplante celular. Por lo tanto, el uso de estas soluciones poliméricas inyectables para tratar infartos cardiacos puede ser un sustituto eficaz para los tratamientos basados en el trasplante de células embrionarias, en el tratamiento de infarto de miocardio (IM) e insuficiencia cardiaca crónica (CHF).

20 Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una solución de alginato reticulado, cuya respuesta elástica se hace igual o mayor que su respuesta viscosa cuando se aplican pequeñas frecuencias oscilatorias de deformación y revela comportamiento pseudoplástico en una relación de la ley de potencia.

25 En una realización, la solución de alginato está reticulada con cationes bi- o polivalentes (iones de calcio u otros) mientras que la mezcla se homogeniza para obtener un biomaterial de alginato reticulado homogéneo. Tal como se define en el presente documento, la solución reticulada habitual comprende un alginato al 0,1-4 % (p/v). Además, es estable al almacenamiento, es decir, mantiene su forma de solución y su inyectabilidad durante largos periodos de tiempo. Habitualmente, la solución de alginato reticulado es estable a temperatura ambiente o inferior a la temperatura ambiente, durante un periodo de al menos 24 horas, durante siete días, incluso durante un periodo tan largo como un año.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una solución de alginato reticulado cuya respuesta elástica se hace igual o mayor que su respuesta viscosa cuando se aplican pequeñas frecuencias oscilatorias de deformación y revela comportamiento pseudoplástico en una relación de ley de potencia, en la que dicho método comprende las etapas de:

35 (a) disolver alginato sódico en agua o en cualquier otro tampón acuoso adecuado;
(b) reticular la solución de alginato obtenida en la etapa (a) con un agente de reticulación adecuado, por adición de una solución acuosa de que dicho agente mientras que se agita intensamente hasta que se obtiene una
40 solución uniforme de alginato reticulado.

45 Por lo tanto, en una realización específica del método para preparar la solución de alginato reticulado de la invención, dicho agente de reticulación son iones de calcio, preferentemente iones de calcio que se proporcionan mediante una solución de gluconato cálcico al 2 % (p/v).

Por lo tanto, la presente invención también proporciona una solución de alginato reticulado preparada mediante el método que se describe en el presente documento.

50 La solución de alginato reticulado de la invención se puede usar para promover la reparación y regeneración de tejido cardiaco dañado.

55 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición que comprende como principio activo una solución de alginato reticulado tal como se define en la invención. Ejemplos de polímeros que se pueden usar en la solución de polímero reticulado (el principio activo comprendido en la composición) son polímeros formadores de hidrogel, tales como polisacáridos. Preferentemente, el polímero es un alginato.

60 Las preparaciones inyectables preparadas mediante el método de la invención son particularmente adecuadas para el tratamiento de tejido cardiaco dañado, después del infarto de miocardio, y/o para el tratamiento de enfermedades cardiacas crónicas. En particular, las preparaciones inyectables preparadas mediante el método de la invención están destinadas para el engrosamiento de la pared ventricular izquierda después de un suceso en el miocardio.

En una realización de la composición de la invención, dicho daño está seleccionado entre el grupo que consiste en infarto de miocardio, daño de miocardio isquémico, tóxico, inflamatorio o mecánico.

65 En otra realización, la composición de la invención es para uso en la prevención y/o tratamiento de afecciones que resultan del daño, remodelación y disfunción del miocardio, en la que dichas afecciones están seleccionadas entre el

grupo que consiste en remodelación del ventrículo izquierdo, expansión del infarto, insuficiencia cardiaca y regurgitación mitral isquémica. Como alternativa, la composición de la invención se puede usar en el tratamiento de arritmias focales o reentrantes, y en la angiogénesis terapéutica.

5 La composición de la invención también es para uso en la orientación de la quimiotaxis de células madre y su direccionamiento al miocardio dañado.

En una realización más, la composición de la invención además contiene opcionalmente agentes terapéuticos adicionales, en la que dichos agentes terapéuticos adicionales están seleccionados entre el grupo que consiste en
10 antibióticos, factores de crecimiento, fármacos antiinflamatorios, hormonas, fármacos antiapoptóticos, factores de estimulación del crecimiento y de células madre.

Incluso en una realización más de la composición de la invención, la composición comprende adicionalmente
15 células, preferentemente mioblastos, cardiomiocitos, fibroblastos, células endoteliales, precursores, células madre u otras células adecuadas que pueden promover la angiogénesis y la regeneración cardiaca.

Además, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de la solución de alginato reticulado de la invención en la preparación de una composición farmacéutica para promover la reparación y la regeneración de
20 tejido dañado. Preferentemente, dicho tejido es tejido cardiaco, más preferentemente la pared ventricular izquierda. Dicho daño puede provenir de diversas fuentes, por ejemplo infarto de miocardio, daño de miocardio isquémico, tóxico, inflamatorio o mecánico.

Por lo tanto, incluso en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de tratamiento de tejido
25 dañado, que comprende administrar una solución de alginato reticulado tal como se define en la invención a un sujeto que lo necesite.

En una realización, dicho tejido a tratar es tejido cardiaco, preferentemente, la pared ventricular izquierda. La solución o composición de alginato reticulado de la invención se debería administrar al miocardio dañado, para la
30 ablación del sustrato arritmogénico.

En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona un método para potenciar la expresión de SDF-1, que comprende administrar la solución o la composición de alginato reticulado tal como se define en la invención, a un sujeto que lo necesite.

35 En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de orientación de la quimiotaxis de células madre, o de dirección, al corazón dañado, que comprende administrar la solución de alginato, la solución de alginato reticulado o la composición tal como se define en la invención, a un sujeto que lo necesite.

Además en un aspecto adicional, la presente invención presenta un método para inducir neovascularización, que
40 comprende administrar la solución o la composición de alginato reticulado tal como se define en la invención, a un sujeto que lo necesite.

Además, incluso en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para inducir la angiogénesis
45 terapéutica, que comprende administrar la solución o la composición de alginato reticulado tal como se define en la invención, a un sujeto que lo necesite.

Además, la presente invención proporciona un método para prevenir afecciones seleccionadas entre el grupo que
50 consiste en remodelación del ventrículo izquierdo, expansión del infarto, insuficiencia cardiaca, regurgitación mitral isquémica, que comprende administrar la solución o la composición de alginato reticulado tal como se define en la invención, a un sujeto que lo necesite.

En un aspecto adicional más, la presente invención proporciona un método nuevo y alternativo para tratar arritmias
55 focales o reentrantes, que comprende administrar la solución o la composición de alginato reticulado tal como se define en la invención, al sitio de ablación de un sujeto que lo necesite.

Como tal, en un aspecto adicional final de la invención, se proporciona un método para mejorar la contractilidad del
miocardio, que comprende administrar la solución o la composición de alginato reticulado tal como se define en la invención, a un sujeto que lo necesite.

60 Un aspecto más de la presente invención es un método para inducir la proliferación de células cardiacas, que comprende poner en contacto dichas células, *in vivo* o *in vitro*, con la solución de alginato reticulado o la composición de la invención.

Por último, la presente invención proporciona un kit para reparar tejido dañado, que comprende:

65 (a) una solución de alginato reticulado tal como se define en la invención, o una composición del mismo;

- (b) medios para administrar la solución polimérica de (a) en el sitio cardiaco de un paciente que lo necesite;
 (c) manual de instrucciones para saber cómo usar dicha solución polimérica.

5 En otra realización del kit proporcionado por la invención, dichos medios para administrar el polímero reticulado pueden ser uno cualquiera de una jeringa con una aguja 18-27 G, cualquier sistema adecuado de administración cardiaca percutánea que incluye un dispositivo de administración cardiaca con un alambre de guía, que incluye obtención del mapa electromecánico o catéteres guiados por MRI, y cualquier dispositivo cardiaco percutáneo diseñado para evaluar el miocardio a través de la cavidad ventricular izquierda, el sistema arterial o coronario venoso.

10

Breve descripción de las Figuras

Figuras 1A-B: Efecto de la adición de iones de calcio sobre la viscosidad de cizalla constante de una solución acuosa de alginato de LF 5/60 al 1 % (p/v) (viscosidad de LF 5/60 = 0,04 Pa.s).

15

- Fig. 1A: Iones de calcio al 0,3 % (p/v).
 Fig. 1B: Iones de calcio al 0,4 % (p/v).
 Abreviaturas: visc., viscosidad; V.C., Velocidad de Cizalla.

20 **Figura 2:** Efecto de la adición de iones de calcio sobre la viscosidad de cizalla constante de una solución acuosa de alginato (viscosidad de LVG = 0,13 Pa.s).
 Abreviaturas: visc., viscosidad; V.C., Velocidad de Cizalla.

25 **Figuras 3A-C:** Espectros mecánicos de solución de alginato de LF 5/60 al 1 % (p/v) y el efecto de reticulación de iones de calcio.

- Fig. 3A: Sin iones de calcio.
 Fig. 3B: Iones de calcio al 0,3 % (p/v).
 Fig. 3C: Iones de calcio al 0,4 % (p/v).
 Abreviaturas: Frec., frecuencia

30

Figuras 4A-B: Espectros mecánicos de solución de alginato de LVG al 1 % (p/v) y el efecto de reticulación de iones de calcio.

- Fig. 4A: Sin iones de calcio.
 Fig. 4B: Iones de calcio al 0,3 % (p/v).
 Abreviaturas: Frec., frecuencia

35

Figuras 5A-H: Remodelación del LV por ecocardiografía.

40

- Fig. 5A: modo M de dimensión diastólica del LV (alginato).
 Fig. 5B: modo M de dimensión diastólica del LV (control).
 Fig. 5C: dimensión sistólica del LV (alginato).
 Fig. 5D: dimensión sistólica del LV (control).
 Fig. 5E: área diastólica del LV (alginato).
 Fig. 5F: área diastólica del LV (control).
 Fig. 5G: área sistólica del LV (alginato).
 Fig. 5H: área sistólica del LV (control).
 Abreviaturas: B., medida inicial; 2 me., 2 meses.

50

Figuras 6A-F: Remodelación del LV por ecocardiografía en 2-D.

- Fig. 6A: AW2-D (alginato).
 Fig. 6B: AW2-D (control).
 Fig. 6C: dimensión diastólica en 2-D del LV (alginato).
 Fig. 6D: dimensión diastólica en 2-D del LV (control).
 Fig. 6E: dimensión sistólica en 2-D del LV (alginato).
 Fig. 6F: dimensión sistólica en 2-D del LV (control).
 Abreviaturas: B., medida inicial; 2 me., 2 meses.

60

Figuras 7A-D: Función del LV por ecocardiografía.

- Fig. 7A: reducción fraccionada del LV (alginato).
 Fig. 7B: reducción fraccionada del LV (control).
 Fig. 7C: cambio del área fraccionada del LV (alginato).
 Fig. 7D: cambio del área fraccionada del LV (control).

65

Abreviaturas: B., medida inicial; 2 me., 2 meses; T., tiempo.

Figuras 8A-D: El biomaterial de alginato induce neoangiogénesis intensiva y aumentar el espesor de la cicatriz.

- 5 Fig. 8A: Inyección de biomaterial de alginato en miocardio normal. Los anticuerpos α -SMA identifican la neoangiogénesis (flecha) y miofibroblastos.
 Fig. 8B: la inyección de biomaterial de alginato en miocardio con infarto puso de manifiesto los numerosos miofibroblastos que pueblan la cicatriz y que aumentan el espesor de la cicatriz (aumento de x 12,5).
 Fig. 8C: Mayor aumento de la Fig. 8B (x 100) que muestra neovascularización intensiva (tinción de color marrón).
 10 Fig. 8D: El mayor aumento de la Fig. 8B (x 200) puso de manifiesto muchos miofibroblastos y neovascularización intensiva (tinción de color marrón).
 Abreviatura: Norm., normal.

Figuras 9A-C: Las inyecciones de biomaterial de alginato en miocardio con infarto potencian la expresión de SDF-1-quimioattractor de células madre. El examen microscópico de las platinas del microscopio, inmunoteñidas con anticuerpo anti-SDF-1, pusieron de manifiesto una fuerte expresión de proteína SDF-1 (color marrón) en células endoteliales, SMC, fibroblastos e inesperadamente, en cardiomiocitos en la zona límite.

- 15 Fig. 9A: Tinción de anti-SDF-1 de muestras a partir del grupo tratado con biomaterial de alginato reticulado, x 200.
 Fig. 9B: Tinción de anti-SDF-1 de muestras a partir del control (tratado con medio de cultivo), x 200.
 Fig. 9C: Tinción de anti-SDF-1 de platinas de microscopio partir del grupo tratado con biomaterial de alginato, centrándose en miocitos teñidos en la zona límite entre el miocardio con infarto y normal.
 Abreviatura: Cont., control.

Figura 10: Cuantificación de la angiogénesis (en número de vasos por área).
 Abreviaturas: Vas., vasos; Alg., alginato; cont., control.

Figuras 11A-B: La inyección de biomaterial de alginato induce la replicación celular y la regeneración en el miocardio con infarto. Inmunotinción con anticuerpos anti Ki67 en la semana 8 después de la oclusión con LAD.

- 30 Fig. 11A: El cerdo que recibe inyección de alginato demostró alta frecuencia de células endoteliales (flechas) con actividad de ADN.
 Fig. 11B: El examen de la zona límite puso de manifiesto varios miocitos (flechas finas), células endoteliales y fibroblastos con tinción positiva de Ki67.
 Por el contrario, en animales que reciben solución salina (no se muestran los datos), hubo una alta frecuencia de células con morfología de fibroblastos y reactividad con Ki67 solamente dentro de la zona del infarto.
 Abreviaturas: mioc., miocardio; Inf., infarto.

Figuras 12A-D: La Ingeniería Inyectable de Tejidos invierte la Regurgitación Mitral Isquémica.

- 40 Fig. 12A: Esquema de regurgitación mitral isquémica con dilatación del anillo mitral.
 Fig. 12B: Esquema de regurgitación mitral isquémica con cambio en la geometría global del ventrículo izquierdo y fijación de la válvula mitral.
 45 Fig. 12C: La inyección de biomaterial a base de alginato en el segmento postero-lateral del LV con infarto (flecha) vuelve a colocar el músculo papilar desplazado hacia el anillo interior para aliviar la fijación y MR.
 Fig. 12D: Esquema de la inyección de alginato.

Figuras 13A-C: Las inyecciones de suspensión de alginato y mioblastos muestran que el polímero aumenta la retención celular en el sitio de inyección y potencia la angiogénesis.

- 50 Fig.13A: La inmunotinción con anticuerpos anti-desmina identificaron mioblastos multinucleados (tinción de color marrón, x 400).
 Fig. 13B: La sección teñida con H y E de corazón tratado con inyección de suspensión de mioblastos con solución de alginato puso de manifiesto neoangiogénesis y vasos funcionales rellenos con células de glóbulos rojos (x 400).
 Fig. 13C: Supervivencia y ubicación de mioblastos dentro del miocardio después de 4 semanas. La inmunotinción con anticuerpos de cadena pesada de miosina rápida, antiesqueléticos, puso de manifiesto miocitos estriados esqueléticos (flechas) en el sitio de inyección (x 400).

Figura 14: Las inyecciones de biomaterial de alginato potencian la dirección de células madre al miocardio con infarto. La inmunotinción con HLA-DR para precursores humanos (color marrón) puso de manifiesto que las células precursoras CD133+ infundidas se dirigieron y colonizaron el sitio en el que se inyectó el biomaterial de alginato reticulado, en el tejido de cicatriz (una semana después de la transfusión).

Descripción detallada de la invención

Las siguientes abreviaturas se usan en la presente solicitud:

5	BMP:	proteína morfogénica ósea
	bFGF:	factor básico de crecimiento de fibroblastos
	CHF:	insuficiencia cardíaca crónica
	2-D:	dos dimensiones
	DDW:	agua de doble destilación
10	ECM:	matriz extracelular
	EDA:	área diastólica terminal
	ESA:	área sistólica terminal
	GPC:	Cromatografía de Permeación en Gel
	IGF:	factor de crecimiento de tipo insulina
15	LA:	aurícula izquierda
	LAD:	descendente anterior izquierda
	LV:	ventrículo izquierdo
	LVEF:	fracción de eyección del LV
	LVID:	dimensión interna del LV
20	MALLS:	dispersión de luz láser en múltiples ángulos
	MHC:	cadena pesada de miosina
	MI:	infarto de miocardio
	Nm:	Número molecular
	MR:	regurgitación mitral
25	Pm:	Peso molecular
	PD:	polidispersión
	PM:	músculos particulares
	SDF:	factor derivado de células del estroma
	SMA:	actina del músculo liso
30	TGF:	factor de crecimiento de transformación
	VEGF:	factor de crecimiento endotelial vascular
	WMSI:	índice de puntuación de movimiento de la pared

35 Los resultados prometedores en el trasplante de células cardíacas o ingeniería tisular en modelos animales se han atribuido parcialmente a la reconstrucción de la matriz extracelular (ECM), que mantiene la estructura, espesor, y elasticidad de la pared del LV. Los inventores han investigado si la manipulación de ECM con inyecciones de biomaterial a base de alginato reticulado puede mantener de forma eficaz la estructura y la función del LV a la vez que proporcionan un armazón para curación y auto reparación.

40 Sorprendentemente, los inventores han encontrado que, tal como se muestra en los siguientes Ejemplos, la atenuación de la dilatación del LV y la disfunción del miocardio después de infarto de miocardio por inyección de una solución de alginato reticulado, inyectada al miocardio con infarto en un modelo en ratas, fue comparable con la conseguida con el trasplante de cardiomiocitos embrionarios.

45 Por lo tanto, el uso de soluciones inyectables de alginato para tratar infartos cardíacos puede ser un reemplazo eficaz para el uso de las células embrionarias difíciles de obtener, en el tratamiento del infarto de miocardio (MI) y de la insuficiencia cardíaca crónica (CHF).

50 Con esta finalidad, los presentes inventores desarrollaron un biomaterial de alginato reticulado que fluye como líquido pero que a su vez de mantiene una consistencia suficiente hasta la inyección en la ubicación deseada en el organismo, en la que forma de un gel sólido. El alginato reticulado se puede mantener indefinidamente en su forma fluida fuera del organismo, a temperaturas que varían entre 0 °C y 30 °C, preferentemente a temperatura ambiente (que es entre 21 °C y 25 °C), y solamente en el sitio de inyección forma una matriz de gel sólido o semisólido.

55 En base a su comportamiento reológico (tal como se detalla a continuación), el biomaterial de alginato reticulado desarrollado en el presente documento se define como redes de entrecruzamiento, que se distingue de los geles covalentes fuertes en que no tienen articulaciones permanentes, dependen fuertemente de la frecuencia, tienen híbridos G'-G'', y fluyen como un líquido a frecuencias bajas (tal como se muestra en el Ejemplo 1).

60 Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una solución de alginato reticulado, cuya respuesta elástica se hace igual o mayor que su respuesta viscosa cuando se aplican pequeñas frecuencias oscilatorias de deformación y revela un comportamiento pseudoplástico en una relación de ley de potencia.

65 Un comportamiento pseudoplástico es característico de una disolución en la que a velocidades de cizalla más bajas, la disolución es más viscosa que un Fluido Newtoniano, y a velocidades de cizalla más elevadas es menos viscosa. Una disolución que presenta una relación de ley de potencia es una cuya viscosidad disminuye a medida que su

velocidad de cizalla aumenta.

Para conseguir una disolución con dichas propiedades, se prepara la disolución de alginato reticulado de la invención frente a una disolución precursora de alginato que presenta comportamiento Newtoniano y cuya respuesta viscosa es mayor que su respuesta elástica cuando se aplican pequeñas frecuencias oscilatorias de deformación.

Una disolución de alginato que presenta un comportamiento Newtoniano también se menciona como un fluido Newtoniano, es decir, un fluido que tiene una viscosidad constante a todas las velocidades de cizalla a una temperatura y presión constantes, y en el que la velocidad de deformación es directamente proporcional a la tensión aplicada al fluido. Después de la reticulación, la respuesta elástica de la disolución se convierte en mayor o igual que su respuesta viscosa cuando se aplican pequeñas frecuencias oscilatorias de deformación.

Dichas pequeñas frecuencias oscilatorias de deformación aplicadas están dentro del límite viscoelástico de 0,01-100 Hz, que está preferentemente dentro del intervalo de aproximadamente 0,1-10 Hz.

Tal como se ilustra en el Ejemplo 1, dicho alginato puede ser de diversos Pm, preferentemente en el intervalo entre 10 K y 300 K Dalton, más preferentemente entre 25 K y 250 K Dalton.

La reticulación de puede ser a través de uno cualquiera de enlaces covalentes, iónicos y de hidrógeno, para crear una red estructurada que atrapa moléculas de agua.

En una realización, la solución de alginato está reticulada con cationes bi- o polivalentes (iones de calcio u otros) que la mezcla se homogeniza para obtener un biomaterial de alginato reticulado homogéneo.

Tal como se define en el presente documento, la solución habitual de alginato reticulado comprende un 0,1-4 % (p/v) de alginato, preferentemente un 0,5-2 % de alginato. Además, es estable al almacenamiento, es decir, mantiene su forma de inyectabilidad en disolución durante largos periodos de tiempo. Habitualmente, la solución de alginato reticulado es estable a temperatura ambiente o más bajas que la temperatura ambiente, durante un periodo de al menos 24 horas, preferentemente al menos siete días, más preferentemente hasta un año.

El término inyectabilidad, tal como se usa en el presente documento, se debe tomar en el sentido de que la solución mantiene sus propiedades fluidas y se puede administrar por inyección (con una jeringa y aguja), cateterización (a través de catéteres o shunts), o cualquier sistema adecuado de administración cardiaca percutánea que incluye un dispositivo de administración cardiaca con un alambre de guía, que incluye obtención del mapa electromecánico o catéteres guiados por MRI, así como y cualquier dispositivo cardiaco percutáneo diseñado para evaluar el miocardio a través de la cavidad ventricular izquierda, el sistema arterial o coronario venoso, y cualquier método adecuado y medios para administración de un fluido en cualquier parte del organismo de un sujeto que lo necesite, particularmente métodos no quirúrgicos. Por lo tanto, la solución de alginato reticulado de la invención se puede administrar a un sujeto que lo necesite mediante uno cualquiera de los medios que se han detallado anteriormente en el presente documento.

El biomaterial de alginato reticulado es capaz de fluir y se puede inyectar a tejidos corporales (por ejemplo, miocardio con infarto) a través de una aguja de 18-27 G. Como alternativa, se puede usar otro sistema adecuado de administración cardiaca, tal como se ha descrito anteriormente. En el sitio de inyección (in vivo), el biomaterial reticulado forma un gel y se convierte en sólido o semisólido.

Es importante indicar que, tal como se menciona en el presente documento, un gel consiste en una red entremezclada con un líquido, habitualmente agua en el caso de un hidrogel. Dos criterios comunes que definen un gel son que: (i) debe contener un líquido, y (ii) debe tener una red que se extienda por toda la muestra.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una solución de alginato reticulado cuya respuesta elástica se convierte en igual o mayor que su respuesta viscosa cuando se aplican pequeñas frecuencias oscilatorias de deformación y pone de manifiesto comportamiento pseudoplástico en una relación de ley de potencia, en la que dicho método comprende las etapas de:

- (a) disolver alginato sódico en agua o en cualquier otro tampón acuoso adecuado;
- (b) reticular la solución de alginato obtenida en la etapa (a) con un agente de reticulación adecuado, por adición de un volumen adecuado de una solución acuosa de dicho agente a la vez que se agita de forma intensiva hasta que se obtiene una solución uniforme de alginato reticulado.

La reticulación se puede conseguir usando iones, alterando el pH o cambiando la temperatura. Los agentes de reticulación iónicos incluyen cationes metálicos, tales como calcio, cobre, aluminio, magnesio, estroncio, bario, estaño, cinc, cromo, cationes orgánicos di-, tri- y tetrafuncionales. Se pueden usar poliones tales como poli (aminoácidos), poli (etilenimina), poli (vinilamina), poli (alilamina), y polisacáridos catiónicos.

Por lo tanto, en una realización específica del método para preparar la solución de alginato reticulado de la invención, dicho agente de reticulación son iones de calcio, preferentemente iones de calcio que se proporcionan en una solución de gluconato cálcico al 2 % (p/v).

- 5 Se debe indicar que el grado de reticulación determinará la velocidad de erosión del depósito sólido formado *in vivo* después de la inyección. La concentración del polímero en la solución inyectable depende de su peso molecular y del grado de reticulación pretendido. El diseño de la preparación debería tener en cuenta los factores necesarios para conseguir una fase de transición líquido/sólido adecuada tal como Pm y concentración del polímero, y la concentración del agente de reticulación. Dicho diseño está dentro de las habilidades de una persona experta en la farmacéutica. El Ejemplo 1 es una ilustración de condiciones preferentes para conseguir la solución de polímero de la invención.

El alginato reticulado a usar por la invención debería ser un alginato biocompatible, que es capaz de gelificar *in vivo*.

- 15 Tal como se muestra en los siguientes Ejemplos, la solución de alginato reticulado de la invención es no inmunogénica, dado que ninguno de los animales experimentales inyectados presentó ningún signo de reacción inmune hacia el alginato reticulado.

20 Por lo tanto, en esencia, la presente invención proporciona un método para preparar una solución de alginato reticulado cuya respuesta elástica se convierte en igual o mayor que su respuesta viscosa cuando se aplican pequeñas frecuencias oscilatorias de deformación y pone de manifiesto comportamiento pseudoplástico en una relación de ley de potencia, en la que dicho método comprende las etapas de:

- 25 (a) disolver alginato sódico en agua o en cualquier otro tampón acuoso adecuado;
(b) reticular la solución de alginato obtenida en la etapa (a) con iones de calcio, por adición de un volumen adecuado de una solución de gluconato cálcico al 2 % (p/v) mientras que se agita de forma intensiva, hasta que se obtiene una solución uniforme.

30 Opcionalmente, la solución de alginato obtenida en la etapa (a) se puede filtrar a través de una serie de filtros de membrana adecuados, tales como por ejemplo filtros de nailon de 1,2, 0,45 y 0,2 μm , y a continuación continuar con la etapa (b).

35 Por lo tanto, la presente invención también proporciona una solución de alginato reticulado preparado mediante el método que se describe en el presente documento.

Inesperadamente, los inventores encontraron que la inyección del biomaterial de alginato reticulado por sí misma podría promover la regeneración de miocardio dañado y aumentar su función sin la necesidad de un cotrasplante de células.

40 En consecuencia, la solución de alginato reticulado de la invención se puede usar para promover la reparación y regeneración de tejido cardíaco dañado.

45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición que comprende como principio activo una solución de alginato tal como se define en la invención.

50 Las preparaciones inyectables preparadas mediante el método de la invención son particularmente adecuadas para el tratamiento de tejido cardíaco dañado, después de infarto del miocardio, y/o para el tratamiento de enfermedades cardíacas crónicas. En particular, las preparaciones inyectables preparadas mediante el método de la invención están destinadas a engrosar la pared ventricular izquierda después de un suceso en el miocardio.

En consecuencia, la composición de la invención se puede usar para promover la reparación y regeneración de tejido dañado, preferentemente tejido cardíaco, especialmente la pared ventricular izquierda.

55 En una realización de la composición de la invención, dicho daño está seleccionado entre el grupo que consiste en infarto de miocardio, daño de miocardio isquémico, tóxico, inflamatorio o mecánico.

60 En otra realización, la composición de la invención es para su uso en la prevención y/o tratamiento de afecciones que resultan del daño, remodelación y disfunción del miocardio, en la que dichas afecciones están seleccionadas entre el grupo que consiste en remodelación del ventrículo izquierdo, expansión del infarto, insuficiencia cardíaca y regurgitación mitral isquémica.

65 Además, se espera que las preparaciones inyectables de la invención puedan ser adecuadas para el tratamiento del daño tisular que resulta de la arritmia. Usando obtención del mapa electroquímico, la preparación inyectable de la invención se puede usar para "bio-ablación", es decir ablación de arritmias cardíacas por inyección en focos y vías de arritmia.

La adaptación cardiaca a través de hipertrofia puede predisponer al paciente a insuficiencia cardiaca y potencialmente a arritmias letales. El mecanismo de las arritmias se describe como focal o reentrante. La reentrada es un concepto sencillo, y es el mecanismo de la mayor parte de las arritmias clínicamente importantes. Describe el avance de un frente de onda de activación eléctrica a través del músculo cardiaco sobre una ruta que conduce de nuevo a su punto de origen. Esto completa un ciclo de un circuito de reentrada, y siempre que existan determinadas condiciones críticas, la conducción continuará alrededor del circuito una y otra vez para producir una arritmia regular.

En cualquier afección en la que existe una variante estructural que proporciona una ruta de conducción circular similar - ya sea congénita (tal como taquicardia mediada por vía accesorio, taquicardia reentrante nodal auriculoventricular, y posiblemente aleteo auricular), o adquirida (tal como taquicardia ventricular después de infarto de miocardio) - existe el potencial de arritmias de reentrada. Por el contrario, cuando existe alteración generalizada, grave de las propiedades eléctricas del miocardio, tal como sucede en muchas formas de ataque cardiaco estructural, los frentes de onda reentrante pueden deambular sin rumbo a través del miocardio sin seguir una ruta fija y conduce a la fibrilación. El mecanismo que subyace a las arritmias focales es la actividad eléctrica espontánea, rápida, anómala de un grupo de células que se extienden al resto del miocardio. El objetivo de la ablación con catéter a través de inyección de biomaterial de alginato es eliminar la arritmia colocando y realizando ablación al punto más seguro y más accesible que cortará transversalmente e interrumpirá un circuito de reentrada o eliminará un foco. La técnica implica la introducción percutánea de catéteres de electrodos (cables aislados con electrodos en su punta, tanto como cables de estimulación temporal) en el corazón bajo vía fluoroscópica, para registrar las señales eléctricas a partir de las partes pertinentes en el corazón. Una vez que se establece el mecanismo de la arritmia, uno de los catéteres de electrodos se conduce un sitio crítico en el que la energía de ablación (corriente de radiofrecuencia, que es previsible, eficaz, y se tolera bien) se administra para crear una cicatriz localizada que interrumpirá la causa de la arritmia. En resumen, el alginato reticulado se inyecta en la vía de reentrada o foco de arritmia, produciendo fibrosis e interrupción del circuito de arritmia.

Por lo tanto, como alternativa, la composición de la invención se puede usar en el tratamiento de arritmias focales o reentrantes.

Otro uso de la composición de la invención está en la angiogénesis terapéutica.

La composición de la invención también es para uso en la orientación de la quimiotaxis de células madre y dirección al miocardio dañado.

En una realización más, la composición de la invención adicionalmente contiene opcionalmente agentes terapéuticos adicionales, en la que dichos agentes terapéuticos están seleccionados entre el grupo que consiste en antibióticos, factores de crecimiento, fármacos antiinflamatorios, hormonas, fármacos antiapoptóticos, factores de estimulación del crecimiento y de células madre.

Se pueden usar diversos factores de crecimiento como agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo factores de estimulación de la angiogénesis y factores de potenciación de la revascularización, por ejemplo factor básico de crecimiento de fibroblastos, (bFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de tipo insulina (IGF), miembros de la familia de TGF, proteínas morfogénicas óseas (BMP), factores de crecimiento derivados de plaquetas, angiopoyetinas, y otros factores tales como factores miogénicos, factores de transcripción, citoquinas, y productos genéticos de homeocaja.

Citoquinas, factores de crecimiento, y factores angiogénicos se pueden encapsular en micropartículas o nanopartículas biodegradables e incluir en biomateriales, tal como la solución de alginato reticulado de la invención, para potenciar la regeneración tisular. Los armazones son capaces de imitar matrices celulares, como la generada mediante la inyección de la solución de alginato reticulado de la invención, que gelifica *in vivo*, después de la inyección, y que tiene potencial de estimular el crecimiento de nuevo miocardio así como revascularización directa, tal como se muestra en los siguientes Ejemplos.

Incluso en una realización más de la composición de la invención, la composición comprende adicionalmente células, preferentemente mioblastos, cardiomiocitos, fibroblastos, células endoteliales, compuestos precursores, células madre u otras células adecuadas que pueden promover la angiogénesis y la regeneración cardiaca.

Tal como se muestra en el Ejemplo 6, la inyección de mioblastos junto con la solución de alginato reticulado de la invención potenció la retención de los mioblastos trasplantados en el sitio de inyección, indujo la angiogénesis y la formación de vasos funcionales. Los mioblastos diferenciados en las fibras multinucleadas revelaron el estrado esquelético.

La preparación de composiciones farmacéuticas es bien conocida en la técnica y se ha descrito en muchos artículos y libros de texto, véase por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro A. R. ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, y especialmente las páginas 1521-1712 en el mismo.

Aún en un aspecto más, la presente invención proporciona el uso de la solución de alginato reticulado de la invención en la preparación de una composición farmacéutica para promover la reparación y regeneración de tejido dañado. Preferentemente, el tejido es tejido cardiaco, más preferentemente la pared ventricular izquierda. Dicho daño puede ser que varias fuentes, por ejemplo infarto de miocardio, daño de miocardio isquémico, tóxico, inflamatorio o mecánico.

Por lo tanto, incluso en un aspecto más, se proporciona un método de tratamiento de tejido dañado, que comprende administrar una solución de alginato tal como se define en la invención a un sujeto que lo necesite. Preferentemente, dicho alginato es un alginato reticulado.

En una realización, dicho tejido a tratar es tejido cardiaco, preferentemente, la pared ventricular izquierda. El alginato reticulado o composición de la invención se debería administrar al miocardio dañado, para la ablación del sustrato arritmogénico.

En la presente invención, los inventores han mostrado, por primera vez, que la inyección de biomaterial a base de alginato en el miocardio con infarto en un modelo de rata de MI extenso atenúa la dilatación del LV y la disfunción del miocardio (Ejemplo 2). Los resultados proporcionan una prueba de concepto y una nueva opción de formación de armazones biomaterial inyectable para conservar la geometría y la función del LV, después del daño grave en el miocardio y para prevenir la disfunción del LV. Este trabajo sugiere una alternativa viable a las dificultades al conseguir el número apropiado de donantes funcionales de células para ingeniería de tejido cardiaco [Etzion, S. y col. (2001) *Am J Cardiovasc Drugs*; 1: 233-244]. Además, se puede usar junto con la administración celular para mejorar la retención, colonización y supervivencia celular, mediante la inclusión de neovascularización y expresión del factor de supervivencia de SDF-1.

El mecanismo de cómo la inyección de biomaterial de alginato da como resultado la reparación y la regeneración del tejido no está claro. Posiblemente, la inyección de la solución de alginato reticulado de la invención reduce la tensión en las paredes por estabilización del tamaño de la cámara y el aumento del espesor de la cicatriz. Este mecanismo podría inhibir la expansión del infarto y prevenir la formación de aneurismas en la región del miocardio. Como alternativa, los efectos favorables de la inyección de alginato pueden ir más allá de sus propiedades mecánicas de restricción y podrían estar parcialmente relacionados con la inducción de neovascularización y regeneración.

La ampliación y la deformación esférica del LV con un aumento simultáneo en la tensión de las paredes son los elementos fundamentales en la patogénesis de la remodelación del LV [Sutton y Sharpe (2000) *id ibid*; Mann (1999) *id ibid*]. Esta es la razón de la contención externa pasiva mediante implantes de injerto de malla, que tiene por objeto la dilatación y deformación progresiva rectificadora del ventrículo izquierdo. Varios estudios que usan modelos animales o pacientes con MI o cardiomiopatía dilatada han demostrado efectos beneficiosos de la contención cardiaca pasiva en la estructura función del miocardio [Kelley, S.T. y col. *Circulation* 1999; 99: 135-142; Pilla, J.J. y col. (2002) *Circulation*; 106: 1207-211; Saavedra, W.F. y col. (2002) *J Am Coll Cardiol*; 39: 2069-2076; Lembcke, A. y col. (2004) *Eur J Cardiothorac Surg*; 25: 84-90]. Además de restringir la ampliación cardiaca, supone que el efecto de cinturón reduce la tensión de la pared ventricular regional y el trabajo del miocardio. Es posible que el biomaterial inyectado reemplace la ECM dañada y proporcione armazones temporales hasta que las células que migran o implantadas produzcan su propia ECM y creen una cicatriz más fuerte.

Un nuevo hallazgo excitante en el presente estudio es la fuerte expresión de SDF-1 en la zona de infarto y límite de corazones tratados con inyección de alginato. SDF-1 es un regulador fundamental en la dirección y quimiotaxis de células madre. Este efecto sugiere que el biomaterial inyectado activa un sistema de señalización que atrae células madre al sitio indicado, que participan en la neovascularización y la regeneración del miocardio.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención también proporciona un método para potenciar la expresión de SDF- 1, que comprende administrar la solución o la composición de alginato reticulado tal como se define en la invención, a un sujeto que lo necesite.

Aparentemente, las células madre que circulan se dirigen a los sitios de alta concentración de SDF- 1, tal como se demuestra claramente mediante experimentos *in vitro* que muestran la capacidad de trans migración hacia gradientes de SDF-1 [Kollet, O. y col. *Blood* 2001; 97: 3283-3291; Lapidot, T. y Petit, I. (2002) *Exp Hematol*; 30: 973-981]. La inyección de SDF- 1 humano en el bazo y la médula ósea de ratón es inmunodeficiente es condujo a una rápida dirección de células madre humanas trasplantadas en el bazo y en la médula ósea [Kollet y col. (2001) *id ibid*]. Otros datos concuerdan con el concepto de SDF- 1 de que la dirección de células madre no está restringida solamente a la médula ósea sino que también se puede encontrar en el corazón dañado [Askari, A.T. y col. *Lancet* 2003; 362: 697-703; Pillarisetti, K. y Gupta, S.K. *Inflammation* 2001; 25: 293-300]. Por lo tanto, SDF- 1 puede desempeñar un papel importante en desencadenar estos efectos de dirección. SDF- 1, a través de CXCR4, induce la angiogénesis *in vivo*. [Salcedo, R. y col. *Am J Pathol* 1999; 154: 1125-1135; Tachibana, K. y col. *Nature* 1998; 393: 591-594; Salvucci, O. y col. *Blood* 2002; 99: 2703-2711]. SDF- 1 y CXCR4 potencian directamente la supervivencia celular [Broxmeyer, H.E. y col. (2003) *J. Leukoc. Biol.* 73: 630-638; Yamaguchi J- I y col. (2003) *Circulation* 107: 1322-1328]. Yamaguchi y colaboradores [Yamaguchi y col. (2003) *id ibid*] mostraron que el efecto de SDF- 1 en la neovascularización de que resulta de su capacidad para potenciar el reclutamiento y la incorporación de células precursoras endoteliales

trasplantadas (EPC). En otro estudio, Askari y colaboradores mostraron que el trasplante de fibroblastos cardiacos modificados genéticamente expresan SDF- 1 combinados con la movilización de células madre mediante el factor de estimulación de la colonia de granulocitos puede restaurar la función deprimida del miocardio [Askari y col. (2003) *id ibid.*]. Además, SDF- 1 potencia directamente la supervivencia/antiapoptosis de células precursoras a través de CXCR4 [Broxmeyer, H.E. y col. (2003) *id ibid.*; Yamaguchi J- I y col. (2003) *id ibid.*].

Por lo tanto, en otro aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para orientar la quimiotaxis de células madre, o la dirección, al corazón dañado, que comprende administrar la solución o la composición de alginato reticulado tal como se define en la invención, a un sujeto que lo necesite.

Un componente integral del proceso de remodelación es el desarrollo de neoangiogénesis dentro de la cicatriz del infarto de miocardio. En circunstancias normales, la contribución de la neoangiogénesis a la red del lecho capilar del infarto es insuficiente para mantener el ritmo de crecimiento de los tejidos necesarios para la compensación contráctil, y es incapaz de soportar las mayores demandas del miocardio hipertrofiado pero viable. La falta relativa de oxígeno y nutrientes a los cardiomiocitos hipertrofiados podría ser un factor etiológico importante en la muerte del miocardio viable de otro modo, dando como resultado la extensión progresiva del infarto y el reemplazo fibroso. Dado que la reperfusión tardía del lecho vascular del infarto en modelos tanto de seres humanos como de animales beneficia de modo significativo la remodelación ventricular, la neoangiogénesis podría mejorar la función cardiaca mediante la pérdida de miocitos cardiacos hipertrofiados pero viables de otro modo.

El examen microscópico de los corazones tratados (Figura 8A-D) reveló que la inyección de alginato reclutaba muchos miofibroblastos y promovía la angiogénesis intensiva en el miocardio con infarto. Es probable que la restauración del flujo sanguíneo hacia la región de periinfarto puede estar asociada con una mejor curación global del infarto [Kocher, A.A. y col. (2001) *Nat Med*; 7: 430-436]. El papel beneficioso del armazón de la neoangiogénesis como una 'fuerza eréctil' proporcionado por un lecho vascular coronario relleno con sangre ha sido sugerido originalmente por Salisbury y col. [Salisbury, P.F. y col. (1960) *Circ Res*; 8: 794-800] y apoyado adicionalmente por resultados de estudios de Braunwald [Braunwald, E. *Circulation* 1989; 79: 441-444]. Además, Hale y Kloner informaron de cicatrices más gruesas (que muestran una mayor resistencia a la tensión radial) en infartos de ratas reperfundidas anteriormente [Hale, S.L. y Kloner, R.A. *Am Heart J* 1988; 116: 1508-1513].

En su conjunto, la neovascularización después de MI extenso podría prevenir la muerte celular, mantener la viabilidad y evitar la remodelación y disfunción del LV [Kocher y col. (2001) *id ibid.*; Abbate, A. y col. *J Cell Physiol* 2002; 193: 145-153; Abbate, A. y col. *Circulation* 2002; 106: 1051-1054]. Podría proporcionar armazón biológico y restricción pasiva que evite la dilatación y disfunción del LV.

En vista de los resultados que se han analizado anteriormente, en un aspecto adicional, la presente invención presenta un método para inducir la neovascularización, que comprende administrar la solución o la composición de alginato reticulado tal como se define en la invención, a un sujeto que lo necesite.

Los esfuerzos para reducir la extensión del daño muscular del MI agudo han sido satisfactorios en muchos aspectos, pero aún permanece el problema de cicatrización posterior al infarto, remodelación, dilatación, y posterior insuficiencia cardiaca. Desafortunadamente, los beneficios de estrategias contemporáneas que limitan el infarto, tales como los tratamientos de reperfusión precoz, fibrinolítico sofisticado y antiplaquetario, y la protección del miocardio, todos están aproximando sus límites aparentes. En consecuencia, los investigadores están desarrollando enérgicamente nuevas estrategias rígidas a la sustitución del miocardio con infarto viejo con tejido nuevo, en lugar de centrarse exclusivamente en imitar o evitar el daño original. La angiogénesis terapéutica ha surgido como un enfoque potencialmente nuevo para tratar insuficiencia cardiaca isquémica sintomática no susceptible a enfoques percutáneos o quirúrgicos convencionales. Dichos pacientes "sin opción" pueden representar tanto como un 12 % de todos los mencionados para el tratamiento de la enfermedad coronaria oclusiva. Mediante la inducción de formación de nuevos vasos una acción colateral, la angiogénesis terapéutica potencia la perfusión y la viabilidad tisular isquémica, curando y evitando el daño progresivo en el miocardio.

Por lo tanto, incluso en un aspecto adicional más, la presente invención proporciona un método para inducir la angiogénesis terapéutica, que comprende administrar la solución o la composición de alginato reticulado tal como se define en la invención, a un sujeto que lo necesite.

Los términos neovascularización y angiogénesis se usan en el presente documento indistintamente.

Además, la presente invención proporciona un método para prevenir afecciones seleccionadas entre el grupo que consiste en remodelación del ventrículo izquierdo, expansión del infarto, insuficiencia cardiaca, regurgitación mitral isquémica, que comprende administrar la solución o la composición de alginato reticulado tal como se define en la invención, a un sujeto que lo necesite.

En un aspecto adicional más, la presente invención proporciona un método nuevo y alternativo para tratar arritmias focales o reentrantes, que comprende administrar la solución de alginato reticulado o la composición tal como se define en la invención, al sitio de ablación de un sujeto que lo necesite.

5 El alginato reticulado de la presente invención se puede usar para mejorar la función sistólica, que se define por las características de contracción muscular cardíaca, tales como fuerza, presión máxima, potencia, tiempo de eyección, gasto cardíaco, etc.

10 Como tal, en un aspecto adicional final de la invención, se proporciona un método para mejorar la contractilidad del miocardio, que comprende administrar la solución o la composición de alginato reticulado tal como se define en la invención, a un sujeto que lo necesite.

15 Curiosamente, los presentes inventores han demostrado que después de inyección de la solución de alginato reticulado de la invención, se indujo la proliferación de cardiomiocitos. Esto se ilustró en el Ejemplo 4, en el que anticuerpos reactivos frente a Ki67, un marcador de la proliferación celular, reaccionó positivamente en los corazones con infarto. Esto sugiere que la solución de alginato reticulado de la invención es capaz de inducir proliferación celular, o división celular, y, en consecuencia, síntesis de ADN. En otras palabras, la solución de alginato reticulado activa la reentrada del tejido circundante en el ciclo celular.

20 Por lo tanto, un aspecto más de la presente invención es un método para inducir la proliferación celular cardíaca, que comprende poner en contacto dichas células, *in vivo* o *in vitro*, con la solución de alginato reticulado o la composición de la invención.

Por último, la presente invención proporciona un kit para reparar tejido dañado, que comprende:

25 (a) Una solución de alginato reticulado tal como se define en la invención, o una composición del mismo;
 (b) medios para administrar la solución de alginato reticulado en el sitio cardíaco de un paciente que lo necesite;
 (c) manual de instrucciones para saber cómo usar dicha solución polimérica.

30 En otra realización del kit proporcionado por la invención, dicho medio para administrar el alginato reticulado puede ser uno cualquiera de una jeringa con una aguja de 18-27 G, cualquier sistema de administración cardíaca percutánea adecuada que incluye un dispositivo de administración cardíaca con un alambre de guía, que incluye obtención del mapa electromecánico o catéteres guiados por MRI, y cualquier dispositivo cardíaco percutáneo diseñado para evaluar el miocardio a través de la cavidad ventricular izquierda, el sistema arterial o coronario
 35 venoso.

Una importante ventaja de este concepto de ingeniería tisular *in situ*, tal como se presenta en el presente documento, es la posibilidad de introducir el implante, o el material precursor que lo formará (tal como la solución de alginato reticulado de la presente invención), con un enfoque basado en catéter, evitando de este modo la necesidad
 40 de toracotomía quirúrgica. Por lo tanto, el presente trabajo sugiere que la inyección de alginato es una nueva opción que puede crear el medio para la dirección, colonización y auto reparación de células madre.

La presente invención se define mediante las reivindicaciones, cuyo contenido se va a leer como incluido dentro de la divulgación de la memoria descriptiva.

45 Se debe entender que la presente invención, desvelada y descrita, no está limitada a los ejemplos, etapas de procesos, y materiales en particular que se desvelan en el presente documento ya que dichas etapas de procesos y materiales pueden variar en cierto modo.

50 También se debe entender que la terminología usada en el presente documento se usa con el fin de describir solamente realizaciones en particular y no pretende ser limitante dado que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas. Se debe indicar que, tal como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno" y "el" incluyen referencias en plural a menos que el contenido lo indique claramente de otro modo.

55 A lo largo de toda la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen a continuación, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que la palabra "comprenden", y variaciones tales como "comprenden" y "que comprende", implican la inclusión de un número entero indicado o etapa o grupo de números enteros o etapas pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

60 Los siguientes Ejemplos son representativos de técnicas usadas por los inventores en la realización de aspectos de la presente invención. Se debería observar que mientras que estas técnicas son a modo de ejemplo de realizaciones preferentes para la práctica de la invención, los expertos en la materia, a la vista de la presente divulgación, reconocerán que se pueden hacer numerosas modificaciones sin apartarse del espíritu y del alcance pretendido de
 65 la invención.

Ejemplos

Procedimientos Experimentales

5 El presente estudio se realizó de acuerdo con las directrices de The Animal Care and Use Committee de la Universidad de Ben-Gurion y Sheba Medical Center, Universidad de Tel-Aviv, que se ajusta a las normas de la American Heart Association y la "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (Departamento de Salud y Servicios Humanos, Publicación de NIH N° 85-23).

10 Preparación del biomaterial de alginato reticulado

Alginato sódico (Pm que varía entre 3 - 300 kDa, FMC Biopolymers, Drammen, Noruega) se disolvió en agua de doble destilación (DDW), hasta una concentración final de un 2 % (p/v). La solución de alginato se reticula con iones de calcio por adición de solución de gluconato cálcico al 2 % (p/v) (ácido D-glucónico, sal hemicálcica, Sigma), mientras que se agita intensamente hasta que se obtuvo una solución más lisa. La viscosidad de la solución de alginato reticulado se puede manipular cambiando la relación de peso de iones de calcio y alginato, así como mediante la selección juiciosa del peso molecular y la composición del polímero (relación de M/G), sin embargo, en todos los casos, la solución de alginatos reticulados fue de una viscosidad que permitió que pudiera inyectar. La reticulación se realizó con un homogeneizador.

Una solución habitual para inyección de alginato reticulado está compuesta de alginato al 1 % (p/v) y un 0,3 % (p/v) de gluconato cálcico y se prepara, por ejemplo, por mezcla de 1 ml de alginato al 2 % (p/v), 0,3 ml de solución de gluconato cálcico al 2 % (p/v) y 0,7 ml de agua, para producir una composición de 2 ml de alginato reticulado. El alginato reticulado se coloca a continuación a 4 °C hasta su uso. En cerdos, se inyectan entre 1-5 ml del alginato reticulado de la invención. En seres humanos, se pueden inyectar entre 0,2 y 5 ml del alginato reticulado, aunque la cantidad y la frecuencia óptimas de inyección la determinará el profesional a cargo del paciente en tratamiento.

El proceso desarrollado por los inventores difiere básicamente de los métodos anteriores usados para preparar geles de alginato. En un método, se prepararon geles de alginato mediante una adición gota a gota de solución de alginato sódico a una solución concentrada de CaCl_2 . Este proceso implica una reticulación rápida y extensa de las gotitas de alginato, principalmente sobre la superficie de la gota. Dado que los iones de calcio se difunden en las gotas, el alginato cambia rápidamente de una solución viscosa a un gel sólido altamente reticulado. Dicha formulación se usa normalmente para encapsulación celular y a menudo implica otra reacción entre el alginato y el polímero cargado positivamente para formar una membrana semipermeable [Lim, F. y Sun, A. M. (1980) Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 210: 908-910]. Por el contrario, en el método de la presente invención, la solución de iones de calcio se dispersa con la solución acuosa de alginato usando mezcla vigorosa, produciendo una red homogénea de entrecruzamiento del biomaterial alginato, que se mantiene mediante la reticulación del calcio.

En el método que se describe en el documento WO 94/25080, que se aplica en su mayor parte para alginato inyectable, se añade sulfato cálcico en forma de partículas sólidas a la solución de alginato. Por consiguiente, la velocidad de gelificación del alginato depende de la solubilidad del sulfato cálcico, que a su vez depende del tamaño de partícula de la sal. Habitualmente, las partículas de sal tienen una gran variedad de distribución por tamaño que afecta a su velocidad de solubilidad (cuanto más pequeña es la partícula más rápido se disuelve). Esto da como resultado un proceso incontrolable de la gelificación del alginato y la formación de geles no homogéneos. Por el contrario, el método desarrollado por los presentes inventores permite la fabricación de una red interpenetración homogénea, tal como se muestra en los estudios de reología.

GPC-MALLS para determinar el peso molecular del alginato

50 Se separaron muestras en un sistema cromatográfico que comprende una bomba Waters 606 seguido de dos columnas de Permeación en gel PSS Suprema conectadas en serie. Descripción de la columna: dimensiones 300 x 8 mm², tamaño de partícula 10 mm, porosidad de 3000 y 10.000 Å. El caudal fue 0,5 ml/min. Las columnas se mantuvieron a una temperatura constante de 25 °C dentro de un horno controlado K-4 de Techlab. El sistema cromatográfico estaba unido a un fotómetro de dispersión de luz láser en múltiples ángulos (MALLS) DSP Dawn (Wyatt Technology Corporation) equipado con un láser de He/Ne funcionando a 632,8 nm, un elemento de refracción de K5 y 18 detectores en los ángulos 14-163°. La concentración se controló mediante un refractómetro interferométrico calibrado de Optilab DSP (Wyatt Technology Corporation). El procesamiento de datos y el cálculo de la masa molar se realizaron con la versión 4.7 del software ASTRA de Wyatt. Cada muestra se inyectó tres veces para asegurar la reproducibilidad. Se encontró que el dn/dc del alginato, medido con el Optilab DSP, controlado por software para dn/dc de Wyatt, era de 0,155 ml/g (tampón acuoso). Se prepararon soluciones acuosas de tampón a partir de agua ultrapura (0,055 µs/cm, USF SERAL Purelab RO75 seguido de USF SERAL Purelab UV) complementado con NaNO_3 0,1 M, NaN_3 al 0,02 % (p/v) e imidazol 10 mM. El tampón se valoró con NaNO_3 a pH 7,0 y se filtró a través de un filtro de 0,1 µm (Gelman Sciences VacuCap 60).

65

Mediciones reológicas

Las mediciones reológicas se hicieron en un reómetro de tensión controlada CLS50 de CarriMed (CarriMed Instruments Ltd. Dorking, Reino Unido) funcionando en el modo de cono-placa (ángulo del cono 1° y 4° con diámetros de 60 y 40 mm respectivamente). Se realizaron experimentos de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud (0,1-10 Hz) dentro del límite viscoelástico lineal. Se realizaron exploraciones de frecuencias con la tensión más baja posible para evitar daños en la muestra. La linealidad de la respuesta se controló continuamente para determinar la viscoelasticidad lineal.

10 Modelo en Ratas de MI e Inyección

El modelo de MI se ha descrito anteriormente por los inventores [Etzion y col. (2001) *id ibid.*; Leor y col. (1996) *id ibid.*]. Ratas Sprague-Dawley macho (~250 g) se anestesiaron con una combinación de 40 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilazina, se intubaron y se ventilaron mecánicamente. El hecho se abrió por toracotomía en el lado izquierdo, el pericardio se retiró y la arteria coronaria izquierda proximal se ocluyó permanentemente con una puntada intramural. Una semana después del infarto, las ratas se anestesiaron y, con una técnica estéril, se abrió el pecho. El área con infarto se identificó visualmente en la base de la cicatriz superficial y la acinesia del movimiento de la pared. Las ratas se seleccionaron para inyección de 100-200 µl de biomaterial a base de alginato o medio de cultivo sin suero usando una aguja de calibre 27. Después de las inyecciones en la cicatriz, la incisión quirúrgica se cerró con sutura.

20 Examen Histológico e Inmunohistoquímico

Ocho semanas después de la inyección, los animales se sacrificaron con una sobredosis de fenobarbital. Se recogieron los corazones, y se procesaron para el examen histológico e inmunohistoquímico. Bloques adyacentes se embebieron en parafina, se seccionaron en cortes de 5 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Secciones en serie se inmunomarcaron con anticuerpos frente a isoforma α-actina del músculo liso (SMA), que está presente en cardiomiocitos embrionarios pero no en cardiomiocitos normales adultos [Leor, J. y col. (1996) *Circulation*; 94: II332-336], cadena pesada de miosina rápida (MHC) (Sigma), Ki67 (Novo-castra Ltd.), SDF- 1 (R&D systems).

30 Evaluación de la Neovascularización

El efecto de la inyección de alginato después de la neovascularización en el miocardio con infarto y con periinfarto se evaluó mediante tinción inmunohistológica de láminas representativas con anticuerpos anti-α-SMA (Sigma) a pericitos y arteriolas. Después de un examen a potencia baja, se fotografiaron cinco campos adyacentes consecutivos a partir de cada sección con un aumento de X 200, el número de vasos se evaluó a partir de fotomicrografías mediante análisis de imágenes computerizadas para contar el número de vasos y para calcular la densidad de los vasos (número medio de capilares y arteriolas/mm²) en los corazones de los grupos trasplantados y de control.

40 Ecocardiografía para Evaluar Remodelación y Contractilidad

Se realizó ecocardiografía transtorácica en todos los animales dentro de 24 horas después del MI (ecocardiograma de la medida inicial) y ocho semanas después. Informes anteriores han demostrado que la exactitud y la reproducibilidad de la ecocardiografía transtorácica en ratas [Etzion y col. (2001) *id ibid.*; Leor, J. y col. (2000) *id ibid.*; Litwin, S.E. y col. (1994) *Circulation*; 89: 345- 354; Schwarz, E.R. y col. (1998) *Basic Res. Cardiol.* 93: 477-486]. Los ecocardiogramas se realizaron con un sistema de ecocardiografía disponible en el mercado equipado con un transductor de agrupación en fase de 12 MHz (Hewlett Packard) tal como se ha indicado anteriormente. Los parámetros medidos fueron: espesor de la pared anterior del LV; dimensión diastólica final máxima del LV; dimensión sistólica final ventricular izquierda mínima en modo M y formación de imágenes en 2-D; y fracción de acortamiento como una medida de la función sistólica, que se calculó como FS (%) = [(LVIDd-LVIDs) / LVIDd] x 100, en la que LVID indica la dimensión interna del LV, s sistole, y d es diástole. El índice de cambio en el área del LV (%) se calculó como [(EDA-ESA) / ESA] x 100 en la que EDA indica área diastólica final del LV, ESA indica área sistólica final del LV [Mehta, P.M. y col. (1988) *J. Am. Coll. Cardiol.* 11: 630-636]. Se hizo un promedio de todas las medidas para tres ciclos cardiacos consecutivos y las realizó un técnico con experiencia que desconocía el grupo de tratamiento.

55 Producción de Infarto de Miocardio en Cerdos

Los métodos usados para producir un infarto de miocardio fueron los mismos que los que se han descrito anteriormente [Yau, T.M. y col. (2003) *Ann Thorac Surg* 75: 169-176; Watanabe, E. y col. (1998) *Cell Transplant* 7: 239-246]. En resumen, se usaron cerdos Sinclair hembra (mini), con un peso de 30-40 kg. Todos los procedimientos quirúrgicos en cerdos se realizaron con anestesia general y con control electrocardiográfico continuo. Los animales se medicaron previamente con ketamina (de 20 a 30 mg/kg, intramuscular) antes de la inducción anestésica con isoflurano al 4 %. La anestesia se mantuvo con un 1 % a un 2,5 % de isoflurano. La arteria femoral derecha se aisló y se canuló con una vaina para introducción. A través de ésta, un catéter cardiaco se puso en la

5 parte media de la arteria descendente anterior izquierda (LAD) una espiral de embolización (Boston Scientific, Estados Unidos) se extruyó desde el catéter con un alambre de guía y se colocó en la parte distal de LAD bajo guía fluoroscópica. Este método indujo un trombo que dio como resultado un infarto de miocardio en el ventrículo izquierdo que se confirmó con angiografía y electrocardiografía. Se proporcionó cardioversión DC eléctrica cuando fue necesario.

Producción de Regurgitación Mitral (MR)

10 La regurgitación mitral se produjo produciendo un MI posterior extenso después de embolización con espiral de la arteria coronaria circunfleja.

Inyección de Biomaterial de Alginato

15 La dirección del alginato se realizó de 7 a 10 días después del MI. Los cerdos se anestesiaron y con una técnica estéril se abrió el pecho. El área con infarto se identificó visualmente por la cicatriz superficial y la anomalía en el movimiento de la pared. Los cerdos se sometieron aleatoriamente a dos o tres inyecciones de alginato (hasta 2,5 ml), o solución salina como control (hasta 2,5 ml), en el miocardio con infarto. El aire se extendió a partir del techo y la incisión quirúrgica se cerró con sutura. En una serie inicial de experimentos piloto, los aspectos técnicos del procedimiento se refinaron. Ocho semanas después del trasplante, los cerdos se sometieron a eutanasia con sobredosis de fenobarbital. Los corazones se recogieron, se seccionaron y se procesaron para histología e inmunohistoquímica.

Evaluación Ecocardiográfica de Remodelación y Función del LV

25 Se realizó ecocardiografía, bajo anestesia, poco después del MI, antes del trasplante, en el día 10 después del MI y a los 30 y 60 días después, usando un transductor de agrupación en fase (2,5 MHz) con un sistema de ultrasonidos (Sonos 5500, Hewlett-Packard, Andover, Massachusetts). Las imágenes se registraron en cintas de video VHS. Se seleccionaron marcos diastólico final y sistólico final a partir de vistas convencionales apical y paraesternal.

30 La fracción de eyección global del LV (LVEF) se estimó visualmente. Se midieron volúmenes del LV mediante el trazado manual de la cavidad ventricular izquierda usando el algoritmo de Simpson modificado en un solo plano cuando > 80 % del límite del endocardio se pudo detectar en la vista apical tanto en la cámara 4, en la cámara 2, y con un solo plano cuando un 80 % del límite del endocardio se pudo detectar solamente en la vista apical de la cámara 4. La evaluación de miocardio regional y el índice de puntuación del movimiento de la pared se determinaron mediante la asignación de la puntuación segmentaria (1 = normal, 2 = hipocinesia, 3 = acinesia, 4 = discinesia) a cada uno de los 16 segmentos del ventrículo izquierdo, tal como lo recomienda la American Society of Echocardiography [Schiller, N.B. y col. (1989) J. Am. Soc. Echocardiogr. 2: 358-367]. Todas las puntuaciones del segmento se añadieron y se dividieron por el número de segmentos analizados para obtener el índice de puntuación del movimiento de la pared.

40 La función del LV se evaluó mediante el uso de 16 segmentos convencionales [Schiller, N.B. y col. (1989) J. Am. Soc. Echocardiogr. 2: 358-367]. Para cada segmento, el movimiento y el grosor de la pared sistólica se clasificaron visualmente usando el siguiente sistema de puntuación semicuantitativa (1-4): 1 = normal o hipercinesia; 2 = hipocinesia; 3 = acinesia; y 4 = discinesia. El índice de puntuación del movimiento de la pared ventricular izquierda (WMSI) se derivó usando la suma de las puntuaciones individuales dividida entre el número total de segmentos analizados. El índice de puntuación del movimiento regional se calculó con el mismo método para los segmentos del territorio de LAD media (territorio de la arteria relacionada con el infarto). Los estudios los interpretó un solo observador con experiencia, y todas las medidas las obtuvo fuera de línea un solo técnico.

50 MR se clasificó por obtención del mapa de flujo Doppler en color usando un algoritmo que integraba la expansión por inyección dentro de la excentricidad de inyección de la aurícula izquierda, y el tamaño del área proximal. MR se consideró leve cuando el área de inyección de regurgitación ocupaba < 20 % del área de LA en ausencia de una inyección de pared y una superficie de isovelocidad proximal visible sin desplazamiento de la medida inicial. Se consideró grave en todos los pacientes en los que el área de inyección era > 40 % del área de LA. La excentricidad de la inyección o un radio de convergencia de flujo proximal mensurable (0,6 mm en un paciente con un área de inyección < 20 %, y 0,9 mm en un paciente con 1 área de inyección entre un 20 % y un 40 %) aumentaron la clasificación de la MR en 1 grado.

Estudios morfológicos e histológicos

60 Después de completar los estudios invasivos de la función ventricular, el corazón se paró con cloruro potásico y se extirpó rápidamente. Las aurículas se retiraron y el corazón se pesó. Las arterias coronarias se perfundieron a continuación con 100 ml de formaldehído al 10 %, y el corazón se fijó en diástole con una presión intraventricular de 4 KPa (30 mm de Hg) en solución de formaldehído durante 7 días antes de seccionarlos para histología. Después de la fijación, los corazones se cortaron en láminas de 5 mm de grosor y se fotografió cada sección. La longitud media de la cicatriz en cada sección se calculó como la media de la longitud de la cicatriz en el pericardio y la longitud de la

cicatriz en el endocardio. El área cicatricial se calculó a continuación como la longitud media de la cicatriz para esa sección multiplicada por 0,5 cm. El área total de la cicatriz se calculó como la suma de las áreas de las cicatrices para todas las secciones. El grosor de la cicatriz se calculó en cada sección, y el volumen de la cicatriz se calculó como el área total de la cicatriz multiplicada por el grosor medio de la cicatriz. Un cubo de tejido desde el centro de la zona del infarto que medía 5 mm en cada lado se embebió en parafina y se cortó en secciones de 5 μm para tinción con hematoxilina y eosina. Para los estudios inmunohistoquímicos, cortes de tejido se volvieron a hidratar en serie en etanol al 100 %, al 95 %, y al 70 % después de desparafinación con tolueno. La peroxidasa endógena en la muestra se bloqueó y las muestras se tificaron con anticuerpos. Bloques adyacentes se embebieron en parafina, se seccionaron láminas de 5 μm y se tificaron con hematoxilina y eosina. Las secciones en serie se inmunomarcaron con anticuerpos frente a SMA, MHC bajo (Sigma), Ki67 (Novocastra Ltd.) y SDF-1 (R&D systems).

Análisis Estadístico

Se evaluaron diferencias univariadas entre los grupos de control y tratados con ensayos de t para variables continuas. Debido a que cada rata en ambos grupos se usó como su propio control, los cambios entre la medida inicial y 8 semanas en los grupos de control y tratados se evaluaron con ensayos con de t por parejas. Las comparaciones de los cambios a partir de la medida inicial a 8 semanas en los grupos de control y tratados se hicieron con ANOVA de medidas repetidas usando la versión Prism 4.00 para Windows de GraphPad (GraphPad Software, San Diego, California, Estados Unidos). El modelo ANOVA incluía como factores el control frente a tratados y la medida inicial frente a 8 semanas, y también incluía la interacción entre los dos factores [Perin, E.C. y col. (2003) Circulation; 107: 2294-2302]. Un valor de probabilidad de $p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Ejemplo 1

Preparación y Evaluación Reológica del Biomaterial Inyectable de Alginato Reticulado

El peso molecular (Pm) del biopolímero de alginato y su polidispersión (PD) (indicación del intervalo de distribución de peso molecular) puede tener un efecto en la velocidad de formación y en la estructura de la red de entrecruzamiento resultante. Por lo tanto, se caracterizaron los Pm y PD de los alginatos que usan GPC-MALLS (tal como se describe en los Procedimientos Experimentales) (Tabla 1).

Tabla 1: Caracterización del alginato

Alginato	Nm (g/mol)	Pm (g/mol)	PD (Pm/Nm)
LF 5/60	2,102 e+4	2,752 e+4	1,309 ± 0,007
	2,113 e+4	2,656 e+4	1,257 ± 0,01
LVG	1,469 e+5	1,667 e+5	1,135 ± 0,016
	1,385 e+5	1,559 e+5	1,126 ± 0,012
MVG	2,103 e+5	2,596 e+5	1,235 ± 0,006
	2,055 e+5	2,385 e+5	1,161 ± 0,007

Notas:
 (i) Los dos números proporcionados para cada medida representan dos lotes diferentes del material.
 (ii) g/mol = Dalton

Reología

Los geles de alginato entran dentro de la categoría de geles físicos, en los que las reticulaciones físicas que se forman no son permanentes ni tan fuertes como las reticulaciones covalentes.

Viscosidad de cizalla constante

La viscosidad η es una medida de la resistencia de un fluido a fluir. Se define como la relación de la tensión de cizalla τ a la velocidad de cizalla γ .

$$(1) \quad \eta = \tau / \gamma$$

Cuando el fluido sigue la ecuación (1) para todas las velocidades de cizalla, se denomina Newtoniano [Ferry, J. D. (1980) Viscoelastic properties of polymers. John Wiley & Sons]. Las soluciones de alginato sódico de un 1 % (p/v) que se describen en el presente documento son Newtonianas (Tabla 2).

Tabla 2: Viscosidad como una función de la velocidad de cizalla (Velocidades de cizalla de 10^{-2} - 10^4 (s⁻¹))

Solución de Alginato	Viscosidad (cP)
LF 5/60 al 1 % (p/v)	40
LVG al 1 % (p/v)	127
MVG al 1 % (p/v)	400

Cuando se añaden iones de calcio, éstos inician la reticulación del alginato, dando como resultado la estructuración y la formación de la red entrecruzada. Para el alginato cálcico reticulado, los grandes resultados de deformación por cizalla constante se presentan como representaciones de viscosidad (η) frente a la velocidad de cizalla (γ). Las Figuras 1 y 2 muestran una viscosidad aparente, que varía con la velocidad de cizalla. Dicho comportamiento se denomina disminución por cizalla o pseudoplástico. Una relación de ley de potencia ($\eta \sim \gamma^{-1}$) se observó para una representación de $\log \eta$ frente a $\log \gamma$, que es habitual en un material estructurado [Lapasin, R. y Pricl, S. (1995) Rheology of industrial polysaccharide: Theory and application. London, Blackbie, página 620].

10 Medidas de deformación oscilatoria pequeña

Para obtener información reológica sobre un material (en el presente caso, la solución de polímero - alginato), se usan medidas viscoelásticas dinámicas. Éstas son preferentes a las medidas de viscosimetría, dado que la estructura del material no se altera, y se obtiene información de propiedades tanto viscosas como elásticas del material. Las medidas se realizan por aplicación de una tensión sinusoidal o cepa de frecuencia f a la muestra y se mide la respuesta. La respuesta se divide en (i) una parte elástica en fase con la tensión o cepa aplicada, y (ii) una parte viscosa fuera de fase. Debido a los dos componentes, se usa una notación compleja. El módulo complejo de cizalla se indica por G^* , que se define mediante la siguiente fórmula:

$$G^* = G' + jG''$$

en la que G' es el módulo de almacenamiento, es decir, la parte elástica, G'' es el módulo de pérdida (la parte viscosa), y $j^2 = -1$.

25 Una representación del módulo como una función de la frecuencia a menudo se denomina espectro mecánico del material. La dependencia de la frecuencia se puede expresar mediante la pendiente n en una representación log-log de G' frente a la frecuencia, f , indicada por:

$$\text{Log } G' = n \log f + K$$

30 en la que K es una constante. En un gel físico, $n > 0$, mientras que en geles covalentes $n = 0$.

Medidas de pequeña deformación oscilatoria se presentan en términos del módulo de almacenamiento G' (la respuesta elástica) y el módulo de pérdida G'' (respuesta viscosa) como funciones de la frecuencia angular; usando G' como el indicador principal de un sistema de tipo gel (estructurado). Las Figuras 3 y 4 muestran los espectros mecánicos de muestras de alginato de LF 5/60 o de alginato de LVG al 1 % (p/v), respectivamente, antes y después del la adición de diferentes concentraciones de iones de calcio. Para ambas soluciones de alginato al 1 % (p/v) (sin iones de calcio), el valor de G'' supera al de G' , que es un comportamiento habitual de una solución aleatoria de polisacárido en espiral.

40 Después de la adición de iones de calcio, los espectros mecánicos de los sistemas resultantes del cruce de $G'-G''$, que es una característica habitual en geles físicos del tipo "red de entrecruzamiento". Este tipo de gel se distingue de los geles covalentes fuertes en que: (i) no tienen reticulaciones permanentes; (ii) dependen fuertemente de la frecuencia; (iii) tienen un cruce $G'-G''$; y (iv) fluyen como líquidos a frecuencias bajas. Los "geles fuertes" tienen una red permanente (covalente) y muestran un módulo de cizalla que solo depende ligeramente de la frecuencia [Clark, A. y Ross-Murphy, S.B. (1987) Structural and mechanical properties of biopolymer gels. Adv. Poly. Sci. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg]. Los geles débiles son de tipo intermedio, y dependen menos de la frecuencia que la red de entrecruzamiento y no tienen un cruce $G'-G''$ a frecuencias de 10^{-2} - 10^2 rad/s. Pueden tener un cruce $G'-G''$ y comportarse de formas diferentes a frecuencias más bajas.

50 **Ejemplo 2**

Comparación de efectos terapéuticos de biomaterial de alginato con trasplante de células cardíacas en un modelo de rata de MI

55 Siete días después del MI extenso, las ratas se sometieron aleatoriamente a inyecciones de biomaterial a base de

alginato, implante de cardiomiocitos embrionarios ($1,5 \times 10^6$), o inyección del medio en la cicatriz del miocardio. El biomaterial de alginato era calcio reticulado, que todavía fluía en las condiciones de inyección, tal como se ha descrito anteriormente. El estudio de ecocardiografía se realizó antes y 1 y 2 meses después del implante para evaluar la remodelación y función del LV. Los corazones se extirparon dos meses después del implante para la evaluación histológica.

Los estudios de ecocardiografía en serie revelaron que la inyección de biomaterial a base de alginato reticulado mejoraba el grosor de la cicatriz, prevenía la dilatación y la disfunción del LV, comparable con el trasplante de células cardíacas, mientras que los animales de control desarrollaron una dilatación significativa del LV acompañadas de deterioro progresivo en la contractilidad del LV. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3

Eco 2-D	Alginato (n = 7)		Células (n = 5)		Medio (n = 4)	
	Antes	2 m Después	Antes	2 m Después	Antes	2 m Después
LVDD mm	0,70 ± 0,02	0,85 ± 0,05	0,68 ± 0,03	0,69 ± 0,01	0,73 ± 0,04	0,97 ± 0,04*
LVSD mm	0,52 ± 0,05	0,65 ± 0,06	0,45 ± 0,02	0,45 ± 0,04	0,56 ± 0,04	0,80 ± 0,04*
LVSA mm	0,22 ± 0,03	0,34 ± 0,06	0,17 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,23 ± 0,3	0,42 ± 0,03*
LV FS %	27 ± 5	25 ± 4	33 ± 3	34 ± 6	23 ± 3	17 ± 1*

*2 meses después frente a antes; p < 0,05
 LVDD: dimensión diastólica del LV; LVSD: dimensión sistólica del LV; LVSA: área sistólica del LV; FS: Acortamiento fraccionado.

Estos resultados sugieren que inyecciones de biomaterial a base de alginato en el miocardio con infarto en un modelo de rata atenúan la dilatación del LV y la disfunción del miocardio. Estos resultados son comparables con los conseguidos con el trasplante de cardiomiocitos embrionarios. Los resultados sugieren una alternativa viable a las dificultades para conseguir células apropiadas para tratar MI y CHF.

Ejemplo 3

Modelo animal de MI tratado con biomaterial de alginato cálcico reticulado

En general, se incluyeron 39 ratas en el estudio. Trece ratas murieron después del procedimiento quirúrgico para inducir MI. Se realizaron estudios y análisis ecocardiográficos en 24 ratas. Quince ratas se trataron con inyección de biomaterial de alginato y el grupo de control (n = 9) recibió inyección de medio de cultivo sin suero. Dos ratas recibieron inyección de alginato en corazón normal para estudiar su seguridad y efectos sobre el miocardio normal.

- Estudio de ecocardiografía funcional

La inyección de biomaterial de alginato aumentó significativamente el grosor de la cicatriz (Tabla 4, p < 0,0001). Además, atenuó de forma eficaz el transcurso habitual de la dilatación del LV que complica el MI anterior extenso (Figura 5, Tabla 4).

Aunque hubo un aumento en los diámetros y áreas internos de la cámara del LV, fue significativamente menor que el observado en los animales de control (Figura 5 y Tabla 4). El efecto beneficioso del biomaterial de alginato sobre la remodelación del LV se tradujo en la prevención de la disfunción del LV tal como se refleja por la atenuación en el deterioro del acortamiento fraccionado y en el cambio del área fraccional del LV (Figura 6, Tabla 4).

En comparación con las ratas tratadas con biomaterial, el grupo de control presentó un transcurso habitual de infarto de miocardio extenso, remodelación del LV e insuficiencia cardíaca. Se observó un aumento significativo en los diámetros internos sistólico y diastólico del LV (Figuras 5 y 6, Tabla 4). Las áreas de las cavidades finales diastólica y sistólica del LV aumentaron marcadamente en un 75 % y en más de un 100 % respectivamente (Figuras 5 y 6, Tabla 4; p < 0,05). Este proceso es similar al observado en pacientes humanos después del MI anterior extenso [Pilla, J.J. y col. (2002) Circulation 106: 1207-2111]. La dilatación progresiva del LV a partir de la medida inicial también se acompañó con un deterioro significativo en el rendimiento del LV, reflejado por el deterioro del acortamiento fraccionado (a partir de un 30 ± 5 % en la medida inicial a un 22 ± 3 %; p < 0,05) y por el porcentaje del cambio del área fraccional del LV (a partir de un 49 ± 5 % a un 38 ± 3 %; p < 0,05) al final del estudio (Figura 7).

Tabla 4: Resultados del estudio de ecocardiografía

Biomaterial de alginato (n = 15)			Control (n = 9)			
	Antes	Después	P	Antes	Después	p
Modo M						
AW d cm	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,11	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,6
LVEDD cm	0,71 ± 0,02	0,86 ± 0,03	0,004	0,74 ± 0,02	0,98 ± 0,03	< 0,0001
LVESD cm	50 ± 0,03	65 ± 0,04	0,01	0,51 ± 0,04	0,78 ± 0,05	< 0,0001
LV SF (%)	30 ± 4	27 ± 3	0,4	30 ± 5	22 ± 3	0,04
2-D						
AW d cm	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,01	< 0,001	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,8
LVEDD cm	0,71 ± 0,02	0,86 ± 0,03	< 0,01	0,73 ± 0,02	0,98 ± 0,03	< 0,0001
LVESD cm	0,50 ± 0,03	0,65 ± 0,04	< 0,01	0,51 ± 0,04	0,78 ± 0,05	< 0,0001
Área de LVED cm ²	0,38 ± 0,03	0,56 ± 0,05	0,17	0,40 ± 0,03	0,70 ± 0,03	< 0,0001
Área de LVES cm ²	0,21 ± 0,03	0,32 ± 0,04	0,05	0,20 ± 0,02	0,44 ± 0,04	< 0,0001
FAC %	47 ± 4	45 ± 3	0,6	49 ± 4	38 ± 3	0,02
AW d - Espesor de la pared diastólica anterior LVEDD - Dimensión diastólica final del LV LVESD - Dimensión sistólica final del LV LV FS - Acortamiento fraccionado del LV - [(LVIDd-LVIDs)/LVIDd] x 100 LV EDA - Área diastólica final del LV; LV ESA - Área sistólica final del LV FAC %- Cambio del área fraccional - [(EDA-ESA)/EDA] x 100						

Análisis Histológico e Inmunohistológico

- 5 La inyección de biomaterial de alginato en miocardio normal dio como resultado la angiogénesis intensa y migración de miofibroblastos tal como se indica con la inmunotinción con anticuerpos frente a α -SMA (Figura 8A). El examen de secciones de corazones con infarto tratados con inyección de alginato mostraron neovascularización intensa y numerosos miofibroblastos que pueblan el miocardio con infarto (Figuras 8B, C, D). La inmunotinción con anticuerpo anti-Ki67 (Figura 11) de animales tratados con biomaterial de alginato inyectable pusieron de manifiesto tinción
- 10 positiva en el endotelio y cardiomiocitos en el sitio del infarto, indicando actividad y replicación de ADN. Por lo tanto, es evidente que el alginato induce la replicación celular que está asociada con la regeneración cardíaca.

- 15 El examen microscópico de láminas inmunoteñidas con anticuerpo anti-SDF-1 puso de manifiesto fuerte expresión de proteína SDF-1 en células endoteliales, SMC, fibroblastos e, inesperadamente, en cardiomiocitos en la zona límite (Figura 9). Las inyecciones de biomaterial de alginato potenciaron la expresión de SDF-1 en el sitio infarto en comparación con los animales no tratados. Dado que SDF-1 es un regulador fundamental de la dirección de células madre, este efecto sugiere que el biomaterial inyectado activa un sistema de señalización que atrae células madre al sitio inyectado, que participa en la neovascularización y la regeneración del miocardio.

- 20 La densidad de los vasos (número medio de capilares y arteriolas/mm² ± S.E.) en el miocardio con infarto de animales tratados fue significativamente más alto que el de los animales de control (231 ± 13 frente a 180 ± 16; p < 0,02; Figura 10).

Ejemplo 4

25 **Tratamiento de un Modelo en Cerdos de Infarto de Miocardio con inyección de Alginato**

- 30 En general, 18 cerdos se incluyeron en el estudio. La mortalidad perioperatoria fue de un 27 % (5 de 18). Los estudios y análisis ecocardiográficos se realizaron en 10 cerdos con MI anterior. Cinco cerdos se trataron con inyección de alginato y el grupo de control (n = 5) recibió inyección de PBS. Cuatro cerdos se sometieron a MI postero-lateral (estudio de MR).

- Inmunohistoquímica

Ocho semanas después de LAD o de oclusión circunfleja (estudio de MR), el cerdo que recibe la inyección de alginato demostró alta frecuencia de células endoteliales (Figura 11A) y cardiomiocitos (Figura 11B) con actividad de ADN, tal como se determina mediante la inmunotinción con anticuerpos monoclonales reactivos frente a Ki67. Por el contrario, en animales que recibieron solución salina hubo una alta frecuencia de células con morfología y reactividad de fibroblastos con Ki67 solamente dentro de la zona con infarto. Estos resultados sugieren que el biomaterial de alginato tiene una capacidad de inducir la proliferación celular en células tales como cardiomiocitos, que habitualmente no tienen esta actividad en el corazón adulto. Dicho fenómeno normalmente se asocia con la regeneración cardíaca.

Ejemplo 5

Estudio de Ecocardiografía Funcional: La Remodelación Ventricular Inversa Reduce la Regurgitación Mitral Isquémica (MR)

MR isquémica es una complicación común de la enfermedad arterial coronaria que duplica la mortalidad tardía [Lamas, G.A. y col. (1997) *Circulation* 96: 827-833]. La evidencia exhaustiva ha mostrado que MR isquémica da como resultado la distorsión del ventrículo izquierdo, que desplaza los músculos papilares (PM) y fija las válvulas mitrales de forma apical, restringiendo su cierre. La terapia para la MR isquémica, sin embargo, sigue siendo problemática. La anuloplastia del anillo mitral, aplicada a menudo en el momento de la revascularización quirúrgica, reduce el tamaño del anillo mitral pero no aborda directamente el problema más amplio de la distorsión isquémica del LV con fijación; por lo tanto sus beneficios son incompletos, particularmente cuando la remodelación del LV sigue avanzando después de la cirugía. El beneficio incierto y la necesidad de incisión auricular y derivación cardiopulmonar pueden impedir la reparación quirúrgica. La recolocación de los PM usando un dispositivo externo puede reducir la MR isquémica.

Los experimentos preliminares presentados en el presente documento muestran que la inyección del biomaterial a base de alginato reticulado recoloca los PM y reduce la MR isquémica, sin comprometer la función del LV. Además, esta técnica relativamente simple se puede aplicar en el corazón que late (Figura 12).

Ejemplo 6

Inyección de suspensión de mioblastos esqueléticos en solución de alginato reticulado en el corazón normal de ratas

El biomaterial de alginato se inyectó en el músculo cardíaco para promover la angiogénesis y mejorar la retención y supervivencia del trasplante celular. Este ejemplo muestra que las inyecciones de biomaterial de alginato pueden ser ventajosas para la retención prolongada de células coinyectadas, tales como mioblastos esqueléticos. Mioblastos de músculo de la extremidad posterior de ratas neonatales Sprague-Dawley se aislaron de acuerdo con el procedimiento que se ha descrito anteriormente [Rosenblatt, J.D. (1995) *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 31: 773-779]. Para verificar el porcentaje de mioblastos en la población, las células cultivadas se tiñeron con desmina (Sigma), que tiene los mioblastos (Figura 13A). La solución inyectable de alginato se preparó tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Ratas Sprague-Dawley macho (~250 g) se anestesiaron con una combinación de 40 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilazina, se intubaron y se ventilaron mecánicamente. El pecho se abrió para toracotomía en la parte izquierda, se retiró el pericardio y las ratas se sometieron a inyección de mioblastos esqueléticos, suspendidos en 100-200 μ l de biomaterial a base de alginato based, usando una aguja de calibre 27, en el músculo de la pared sin ventrículo izquierdo. Después de inyecciones en el músculo cardíaco, la incisión quirúrgica se cerró con sutura.

Cuatro semanas después de la inyección, los animales se sacrificaron con una sobredosis de fenobarbital. Los corazones se extirparon, y se procesaron para el examen histológico e inmunohistoquímico. Bloques adyacentes se embebieron en parafina, se seccionaron en láminas de 5 μ m y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las secciones en serie se inmunomarcaron con anticuerpos frente a MHC rápida (Sigma, Reino Unido).

Tal como se muestra en la Figura 13A-C, la inyección de mioblastos junto con la solución de alginato reticulado de la invención indujo neovascularización, tal como se muestra mediante la formación de nuevos vasos funcionales, que se puede demostrar por la presencia de glóbulos rojos (Figura 13B). Además, la coinyección con biomaterial de alginato aumentó la retención de mioblastos trasplantados en el sitio de inyección. Los mioblastos se diferenciaban en fibras multinucleadas que revelaban estriación esquelética.

Ejemplo 7

La inyección de biomaterial de alginato reticulado potencia la dirección de células madre al miocardio con infarto

5 Ratas desnudas atímicas se sometieron a infarto de miocardio seguido de inyección de biomaterial de alginato reticulado en el tejido con infarto. Una semana después del infarto, los animales se trataron con transfusión intravenosa de células precursoras CD133+ provenientes de sangre de cordón umbilical humano ($2-4 \times 10^6$ células).
10 Una semana después de la transfusión, los corazones se extirparon y secciones representativas se fijaron o se seccionaron por congelación. La presencia de células de donante humano en el corazón del receptor se confirmó por Inmunotinción por HLA-DR. La inmunotinción por HLA (Figura 14, color marrón) puso de manifiesto que las células de donante infundidas se dirigieron y colonizaron el sitio de la inyección de alginato reticulado en el tejido cicatricial. Este experimento demuestra claramente que la inyección de alginato reticulado en tejido dañado mejora a la dirección de células madre, que es coherente con la fuerte expresión de SDF-1 en el sitio de inyección.

15 Los Ejemplos 6 y 7 muestran el efecto ventajoso del biomaterial de alginato reticulado sobre la retención de células trasplantadas en corazones que laten. Por el contrario, la inyección de células en ausencia de polímero, como resultado filtración celular extensa, y de este modo, la mayor parte de las células no quedan retenidas en el sitio de inyección, mientras que al mismo tiempo, existe una alta proporción de muerte celular.
20

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en la promoción de la reparación y la regeneración de un tejido dañado, comprendiendo dicha composición como principio activo una solución acuosa de polímero reticulado
- 5 (a) que tiene una respuesta elástica que llega a ser igual o mayor que su respuesta viscosa cuando se aplican pequeñas frecuencias oscilatorias de deformación y que pone de manifiesto un comportamiento pseudoplástico en una relación de ley de potencia, en la que dichas pequeñas frecuencias oscilatorias de deformación aplicadas están dentro del intervalo de 0,1-10 Hz;
- 10 (b) en la que dicho polímero está reticulado con cationes de calcio;
- (c) en la que dicho polímero es alginato reticulado al 0,1-4 % (p/v), preferentemente alginato al 0,5-2 % (p/v); y
- (d) cuya solución es estable al almacenamiento porque mantiene su forma de solución e inyectabilidad a temperatura ambiente durante un periodo de al menos 24 horas.
- 15 2. La composición para uso de la reivindicación 1, que es inyectable.
3. La composición para uso de las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicha composición se administra a un sujeto mediante cateterización tal como mediante catéteres guiados por MRI.
- 20 4. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que
- (a) dicho tejido es tejido cardiaco, preferentemente la pared ventricular izquierda, y/o
- (b) el daño está seleccionado entre el grupo que consiste en infarto de miocardio, daño isquémico, tóxico, inflamatorio, mecánico en el miocardio, remodelación del ventrículo izquierdo, expansión del infarto, insuficiencia cardiaca, regurgitación mitral isquémica, y arritmia de reentrada.
- 25 5. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha solución se prepara por reticulación de una solución precursora de alginato que presenta comportamiento Newtoniano y que tiene una respuesta viscosa que es mayor que su respuesta elástica cuando se aplican pequeñas frecuencias oscilatorias de deformación, en la que dichas pequeñas frecuencias oscilatorias de deformación aplicadas están dentro del intervalo de 0,1-10 Hz.
- 30 6. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha composición es una solución para inyección de alginato al 1 % (p/v) y de gluconato cálcico al 0,3 % (p/v).
- 35 7. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha composición contiene además, agentes terapéuticos adicionales, en la que dichos agentes terapéuticos adicionales están seleccionados preferentemente entre el grupo que consiste en antibióticos, factores de crecimiento, fármacos antiinflamatorios, hormonas y fármacos antiapoptóticos.
- 40 8. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende adicionalmente células, en la que dichas células son preferentemente una cualquiera de mioblastos, cardiomiocitos, fibroblastos, células endoteliales, células precursoras y células madre.
- 45 9. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que dicho alginato tiene un peso molecular que varía de 10 K a 300 K Dalton, preferentemente en el intervalo de 25 K a 150 K Dalton.
10. Un método para preparar una solución acuosa de alginato reticulado que tiene una respuesta elástica que llega a ser igual o mayor que su respuesta viscosa cuando se aplican pequeñas frecuencias oscilatorias de deformación y que pone de manifiesto comportamiento pseudoplástico en una relación de ley de potencia, en el que dicho método comprende las etapas de:
- 50 (a) disolver alginato sódico en agua o en otro tampón acuoso adecuado;
- (b) reticular la solución de alginato obtenida en la etapa (a) con un agente de reticulación adecuado, por adición de una solución acuosa de dicho agente mientras que se agita intensamente hasta que se obtiene una solución uniforme de alginato reticulado, siendo dicho agente de reticulación iones de calcio.
- 55 11. El método de la reivindicación 10, en el que dicha agitación intensa se realiza con un homogeneizador.
- 60 12. El método de la reivindicación 10 o 11, en el que dicha solución uniforme de alginato reticulado es una solución de alginato reticulado que tiene una respuesta elástica que se hace igual o mayor que su respuesta viscosa cuando se aplican pequeñas frecuencias oscilatorias de deformación y que pone de manifiesto comportamiento pseudoplástico en una relación de ley de potencia.
- 65 13. Una solución acuosa de alginato reticulado obtenible mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que dichos iones de calcio son proporcionados por el gluconato cálcico.

15. Un kit para reparar tejido dañado, que comprende:

- 5
- (a) una solución de polímero reticulado tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9;
 - (b) medios para administrar la solución de polímero reticulado en el sitio cardíaco de un paciente que lo necesite;
 - (c) manual de instrucciones para saber cómo usar dicha solución polimérica.
- 10
16. El kit tal como se define en la reivindicación 15, en el que dichos medios para administrar la solución de polímero reticulado puede ser uno cualquiera de entre una jeringa con una aguja de calibre 18-27 G, cualquier sistema adecuado de administración cardíaca percutánea que incluye un dispositivo de administración cardíaca con un alambre de guía, incluyendo la obtención del mapa electromecánico o catéteres guiados por MRI, y cualquier dispositivo cardíaco percutáneo diseñado para evaluar el miocardio a través de la cavidad ventricular izquierda, el
- 15
- sistema arterial o coronario venoso.

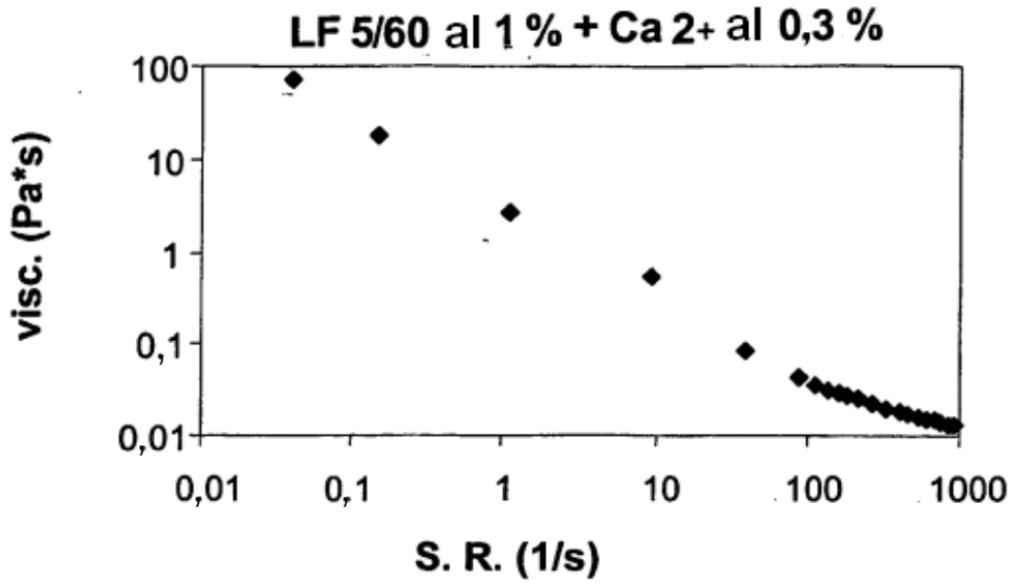


Fig. 1A

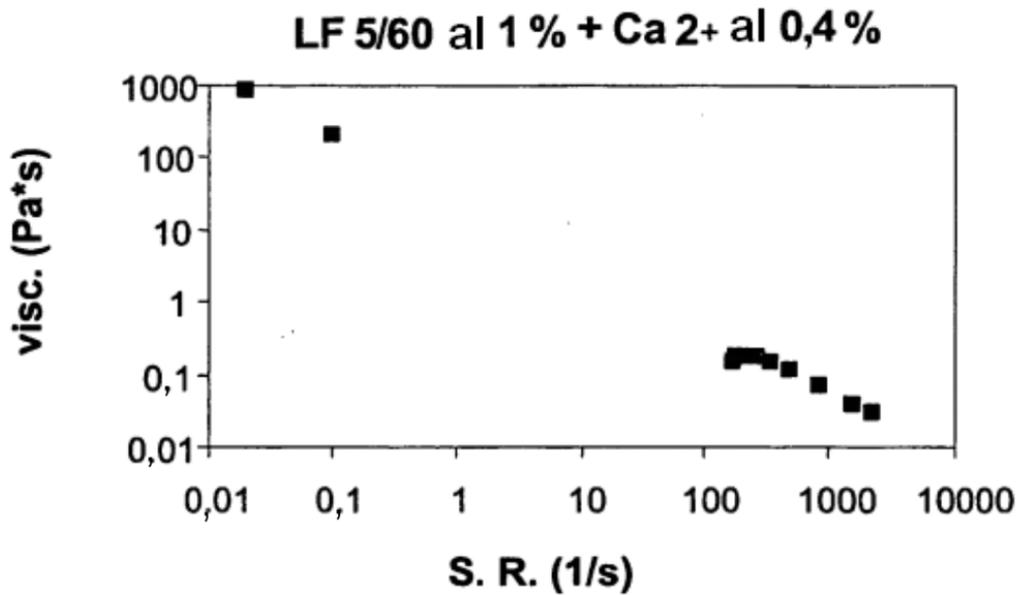


Fig. 1B

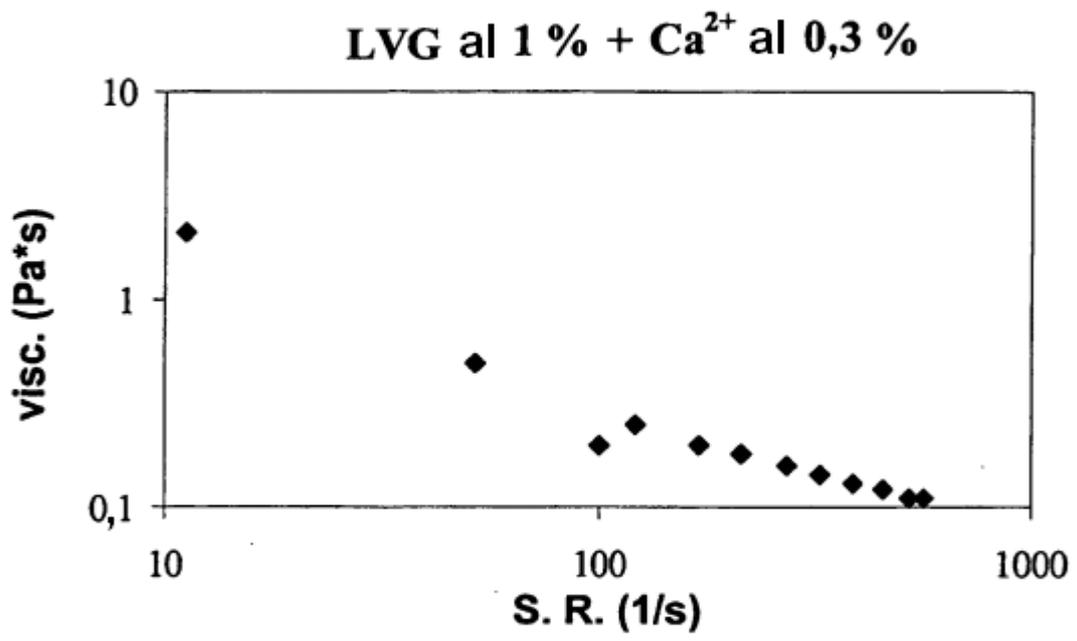


Fig. 2

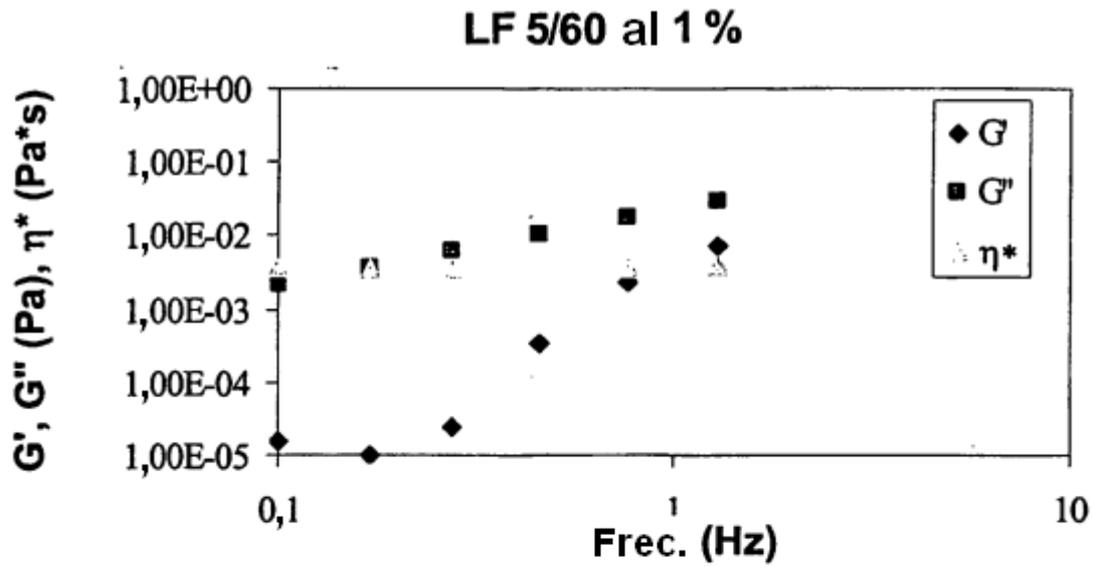


Fig. 3A

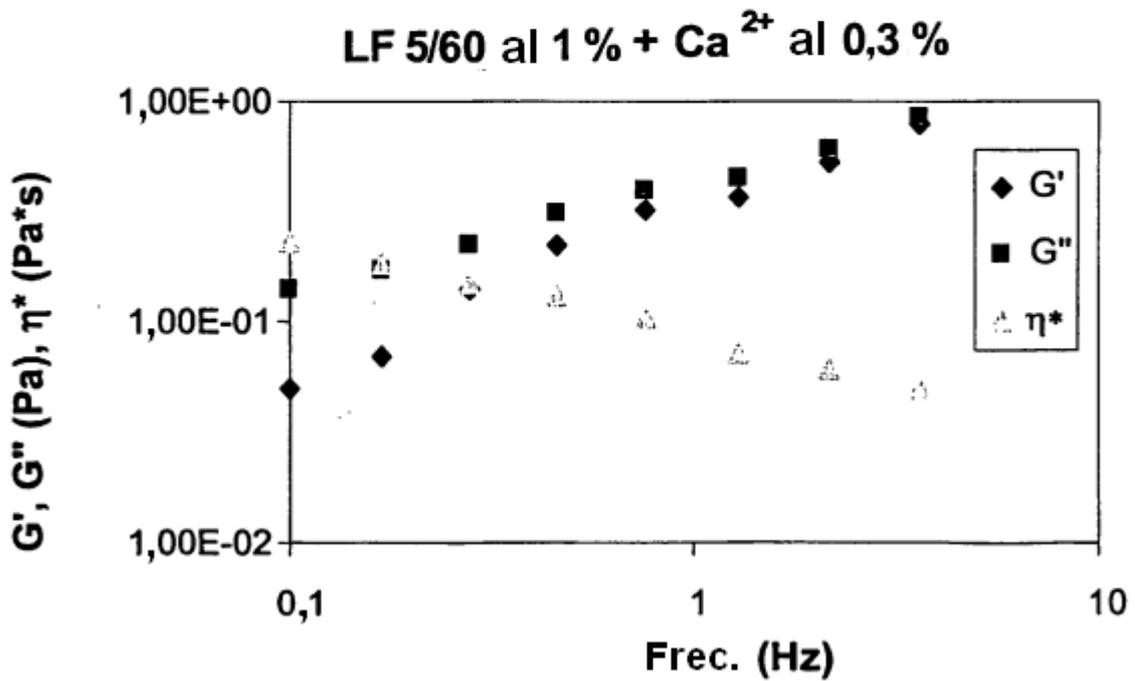


Fig. 3B

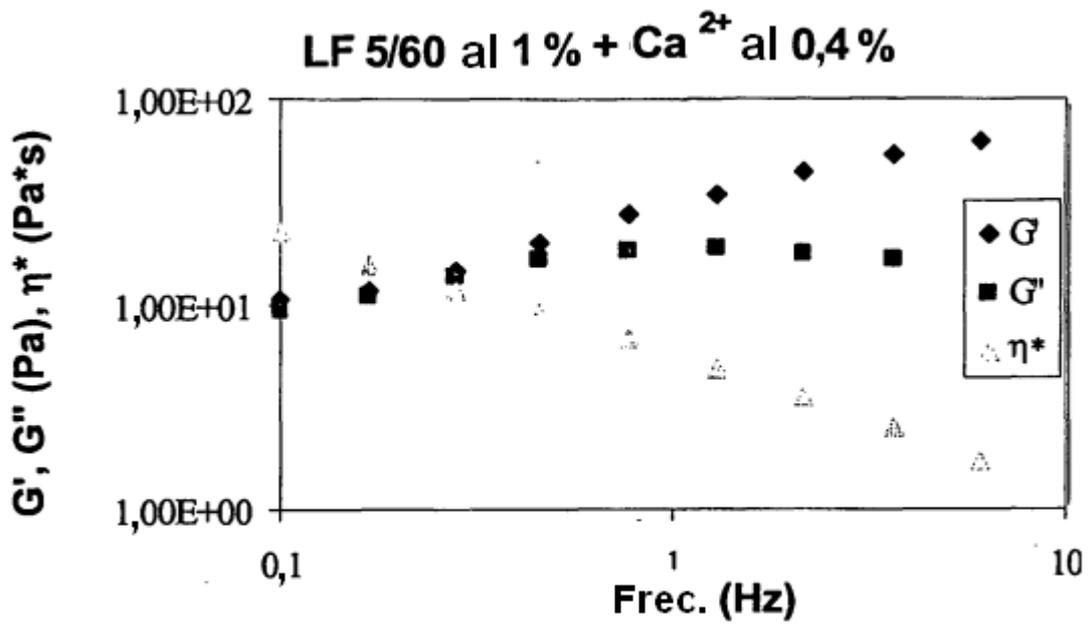


Fig. 3C

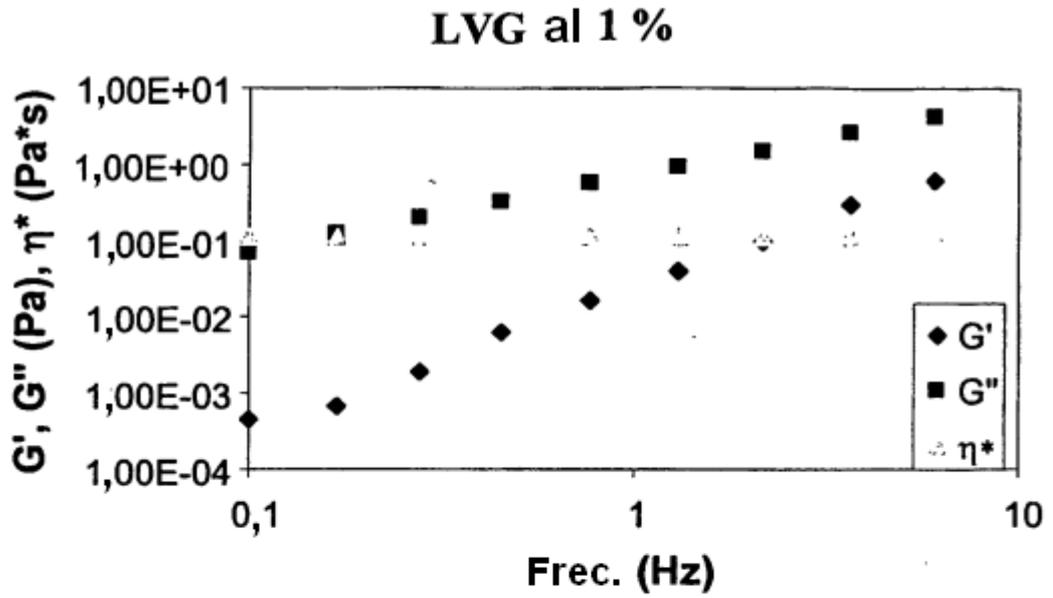


Fig. 4A

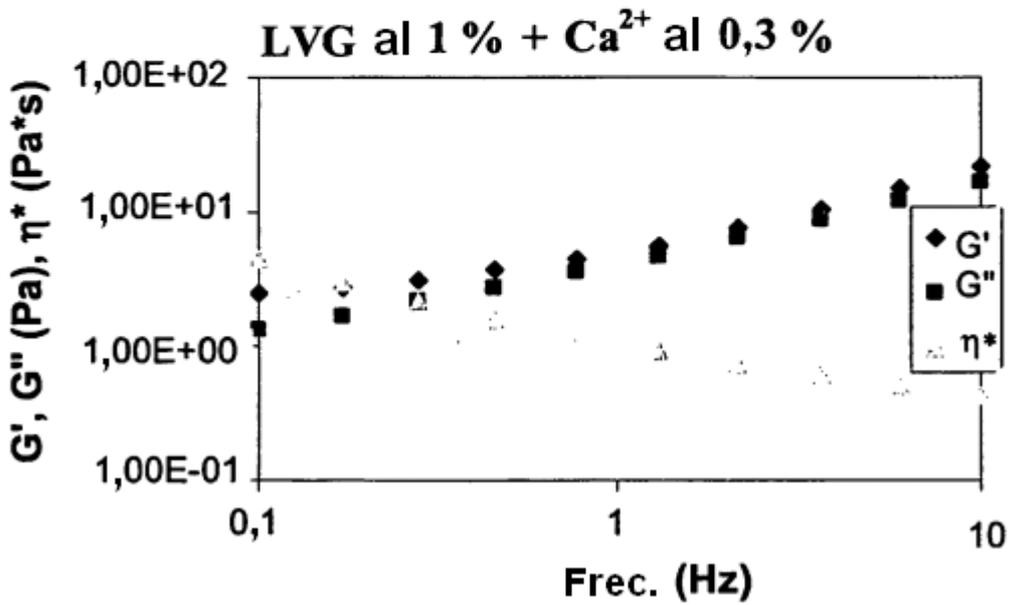
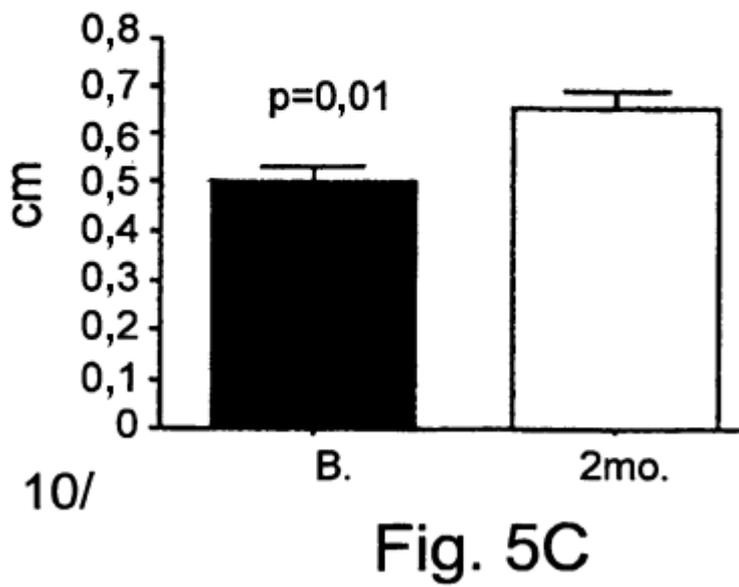
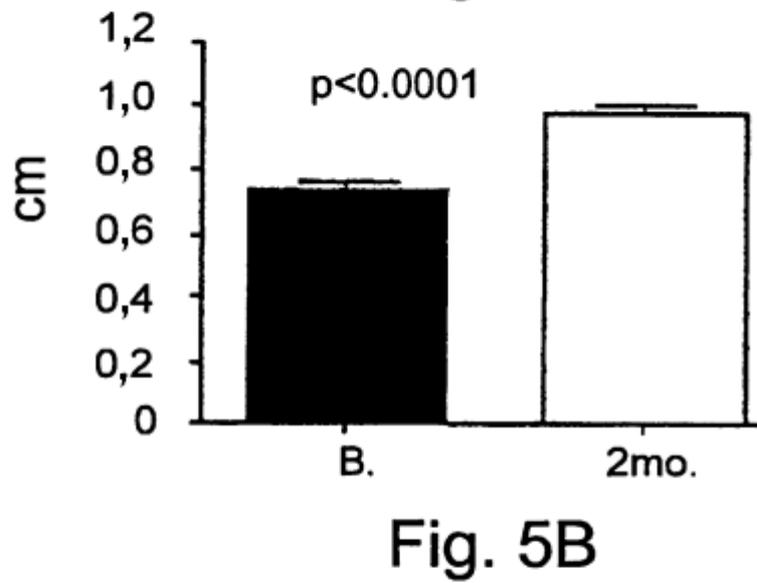
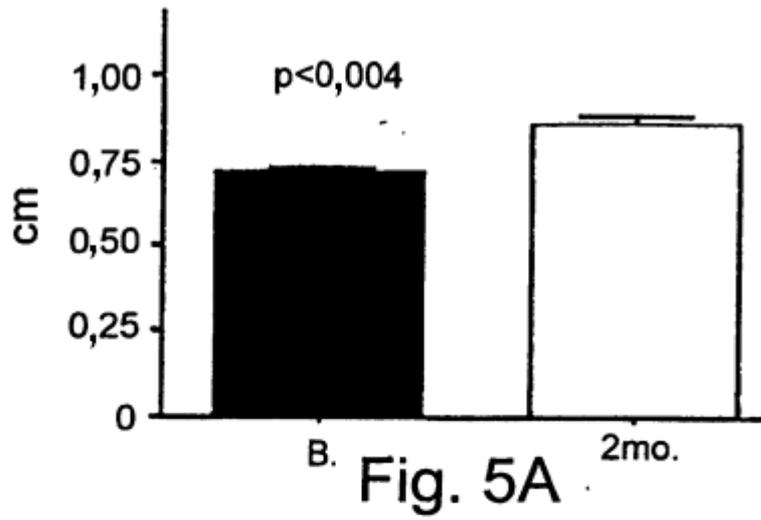


Fig. 4B



10/

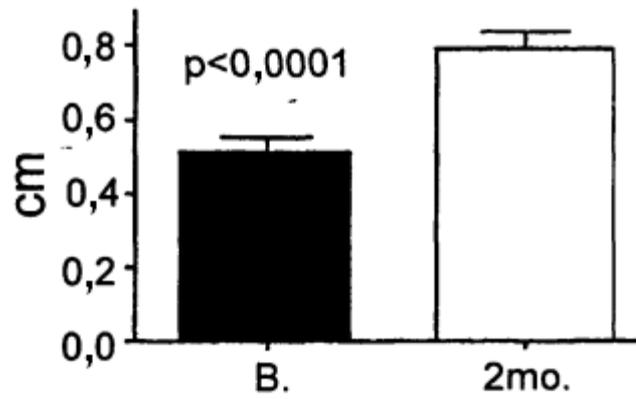


Fig. 5D

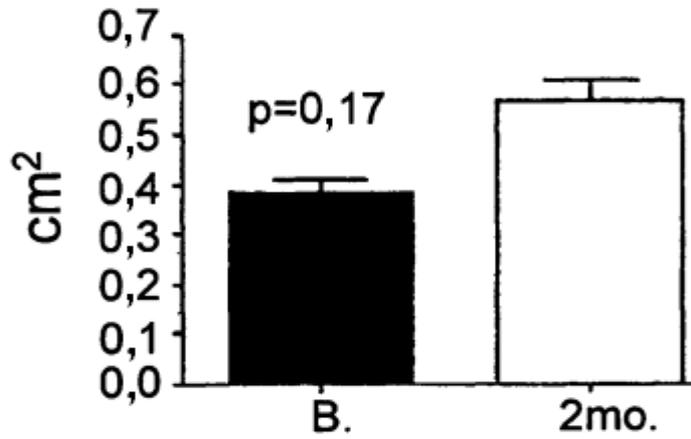


Fig. 5E

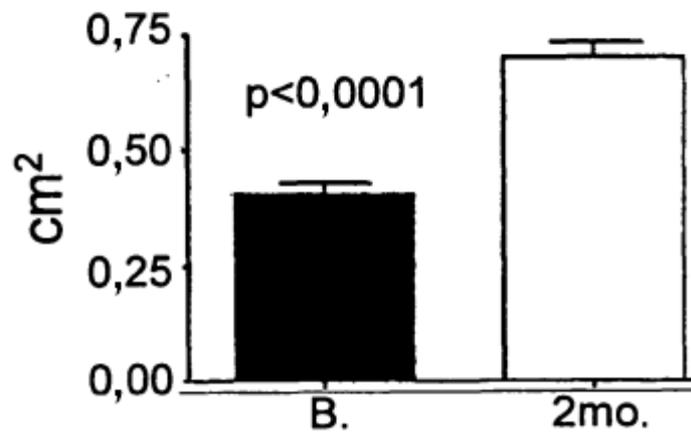


Fig. 5F

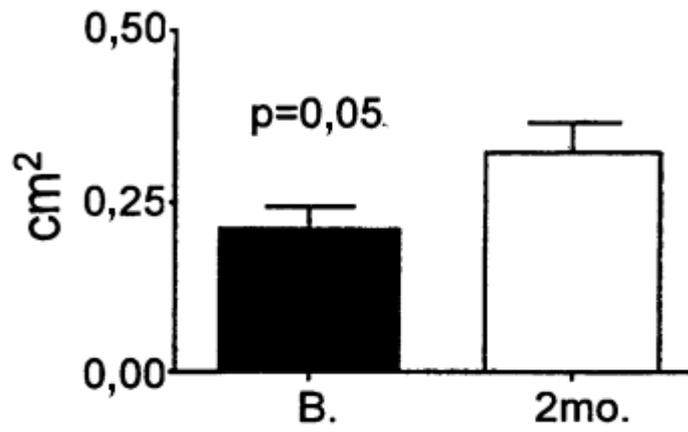


Fig. 5G

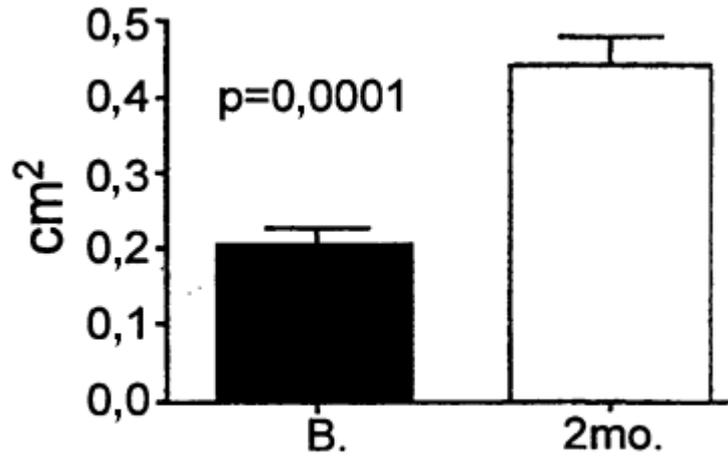


Fig. 5H

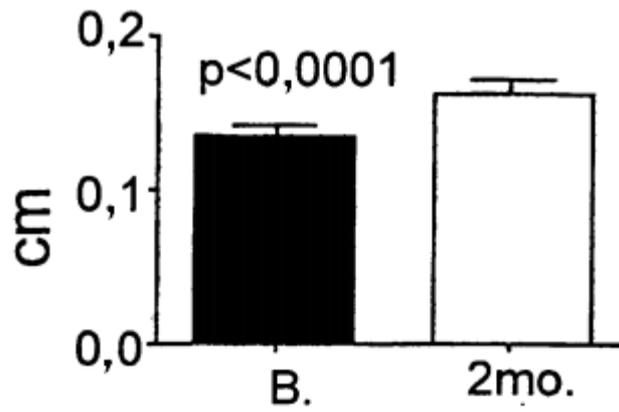


Fig. 6A

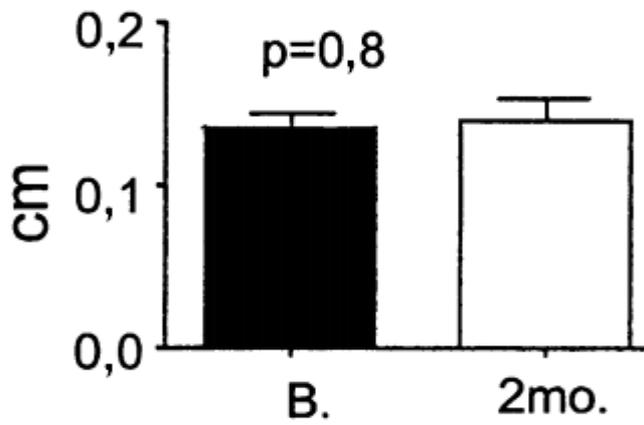


Fig. 6B

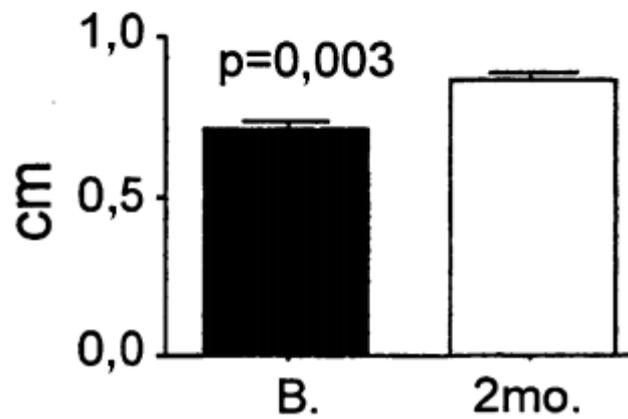


Fig. 6C

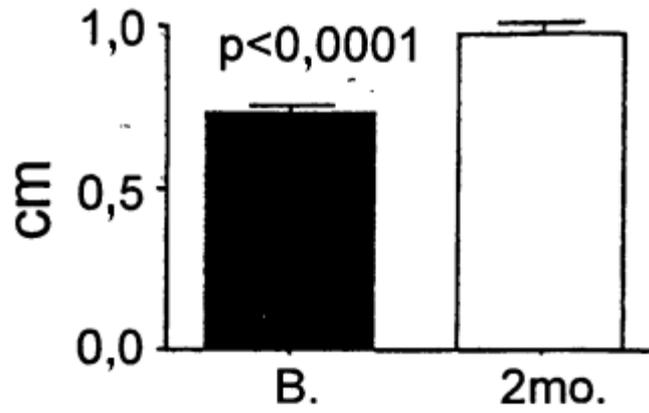


Fig. 6D

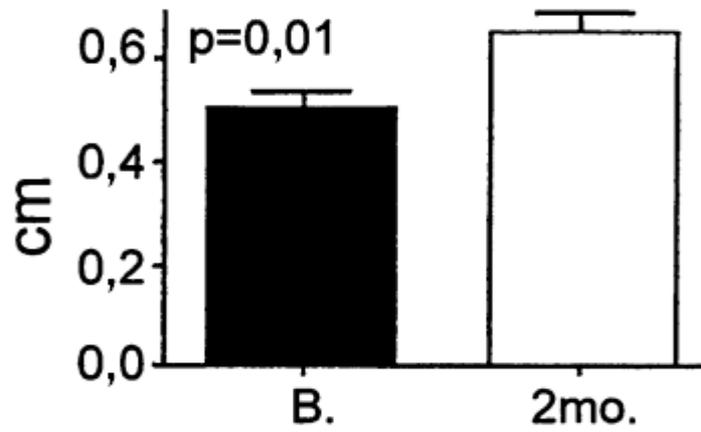


Fig. 6E

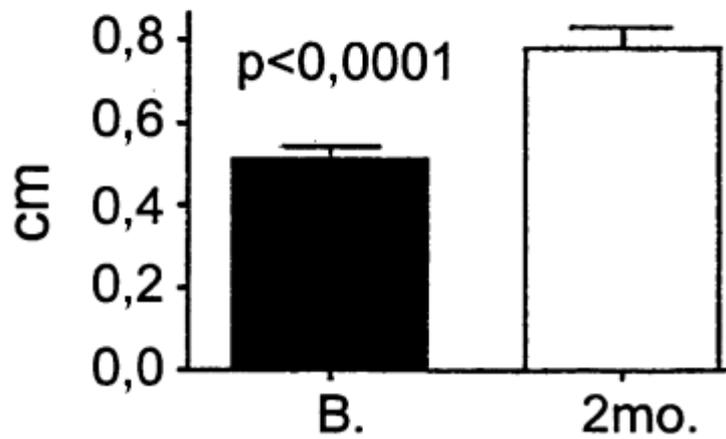


Fig. 6F

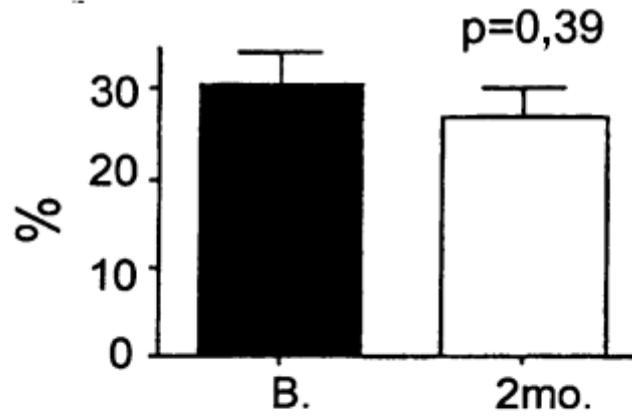


Fig. 7A

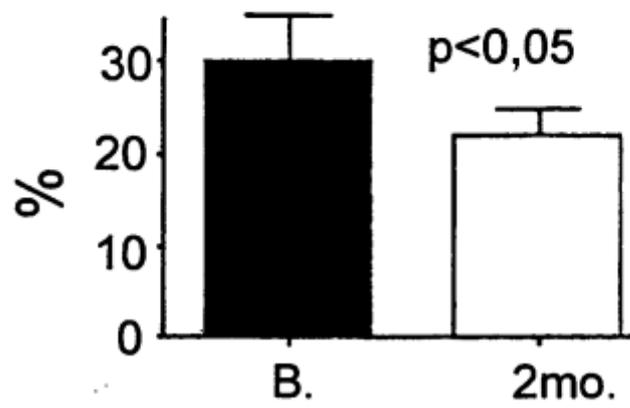


Fig. 7B

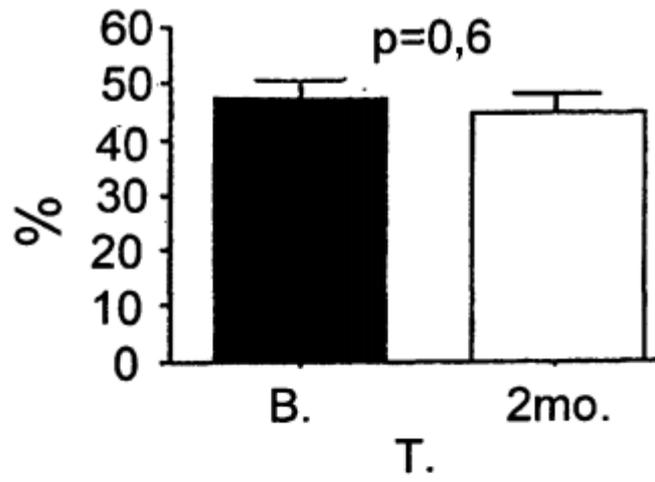


Fig. 7C

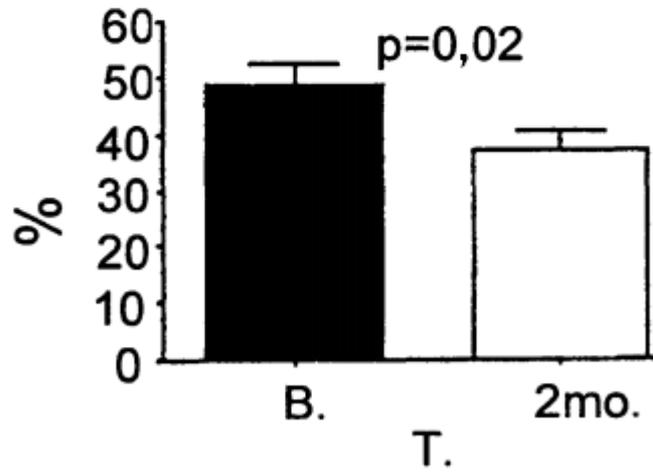


Fig. 7D

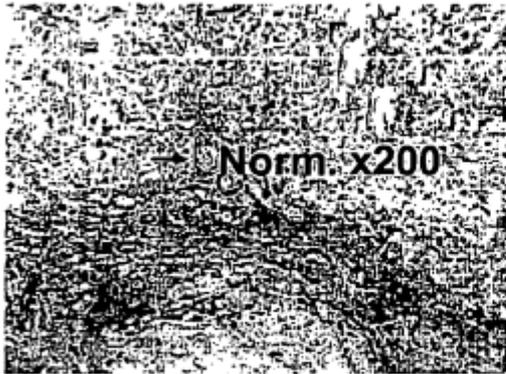


Fig. 8A



Fig. 8B



Fig. 8C



Fig. 8D

Cont.

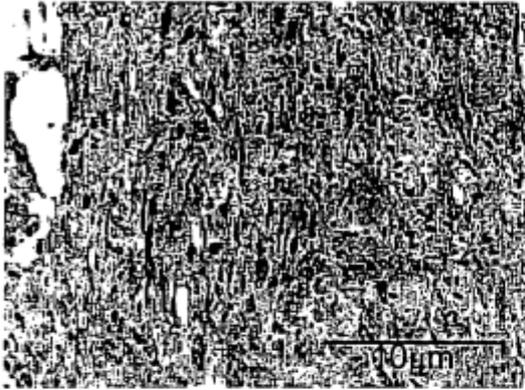


Fig. 9A

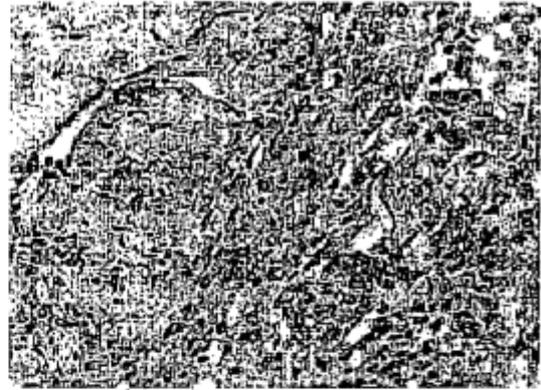


Fig. 9B

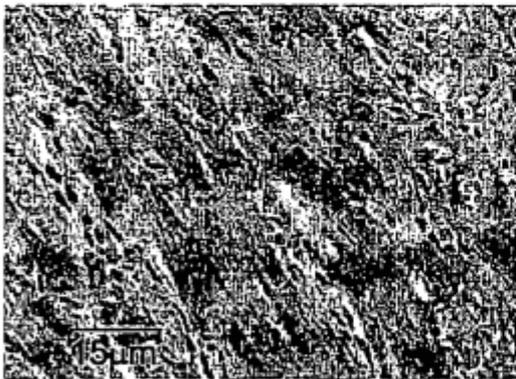


Fig. 9C

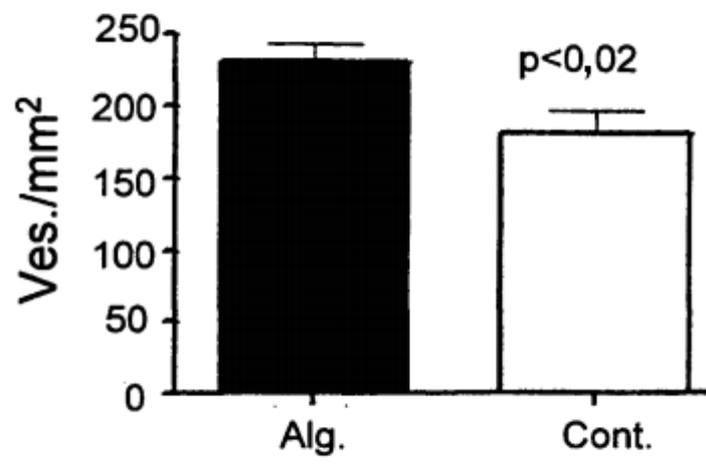


Fig. 10



Fig. 11A

Fig. 11B



Fig. 12A



Fig. 12B

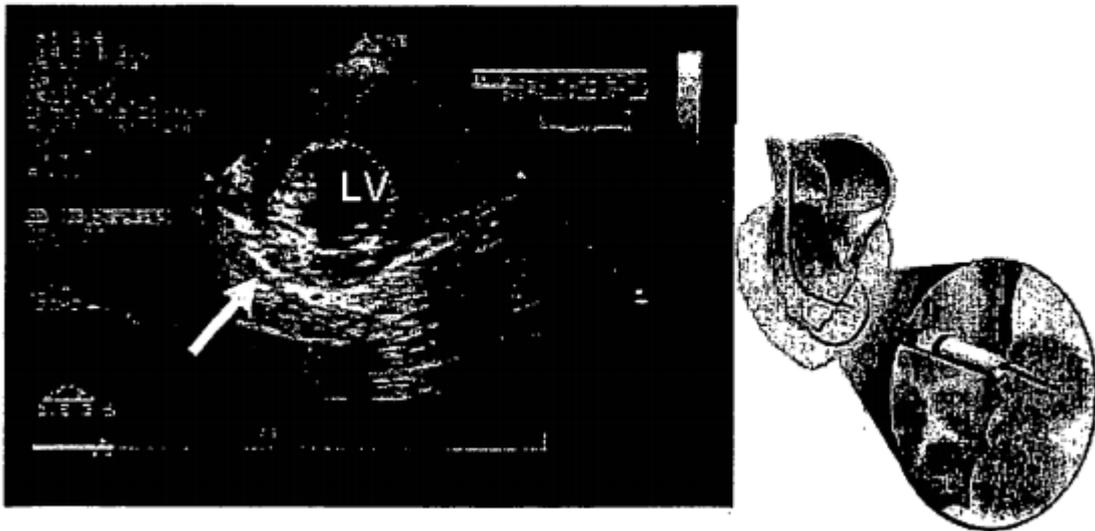


Fig. 12C



Fig. 13A



Fig. 13B

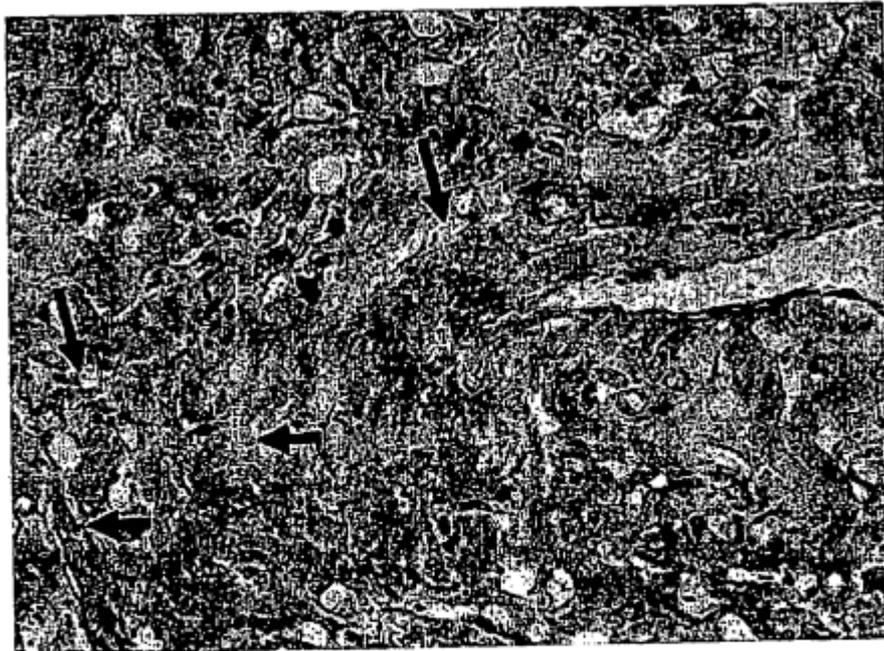
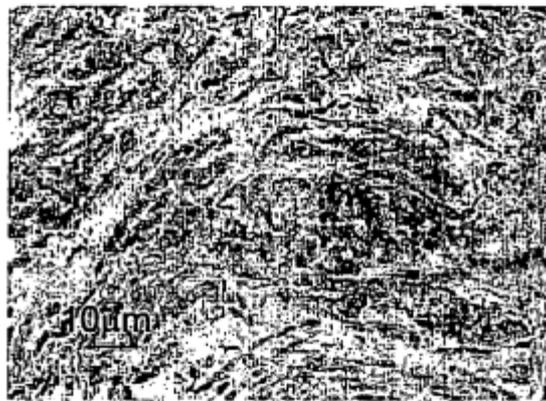


Fig. 13C



HLA-DR

Fig. 14

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

5

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 9425080 A [0006] [0007] [0014] [0145]
- US 6134334 A [0009]
- WO 9915211 A [0010]
- US 5709854 A [0011]
- US 6129761 A [0012]
- US 6171610 B [0013]
- WO 9744070 A [0016]
- US 5776445 A [0017]

10 Literatura no patente citada en la descripción

- SUTTON, M.G. ; SHARPE, N. *Circulation*, 2000, vol. 101, 2981-2988 [0002]
- MANN, D.L. *Circulation*, 1999, vol. 100, 999-1008 [0002]
- JUGDUTT, B.I. *Circulation*, 2003, vol. 108, 1395-1403 [0002]
- SUTTON, M.G. ; SHARPE, N. *CIRCULATION*, 2000 [0002]
- MANN, D.L. *CIRCULATION*, 1999 [0002]
- JUGDUTT, B.I. *CIRCULATION*, 2003 [0002]
- KHAND, A.U. et al. *Eur. Heart J.*, 2001, vol. 22, 153-164 [0002]
- JESSUP, M. ; BROZENA, S. *N. Engl. J. Med.*, 2003, vol. 348, 2007-2018 [0002]
- REDFIELD, M.M. *N. Engl. J. Med.*, 2002, vol. 347, 1442-1444 [0002]
- ETZION, S. et al. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, vol. 33, 1321-1330 [0002] [0003]
- LEOR, J. et al. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2003, vol. 3, 1023-39 [0002]
- BELTRAMI, A.P. et al. *Cell*, 2003, vol. 114, 763-776 [0002]
- LEOR, J. et al. *Circulation*, 2000, vol. 102, III56-61 [0003]
- LEOR, J. et al. *CIRCULATION*, 2000 [0004]
- KAREN L. CHRISTMAN. *International Conference on Engineering Tissue Growth, Pittsburg, Pennsylvania, USA*, 17 March 2003 [0015]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co, 1990, 1521-1712 [0109]
- ETZION, S. et al. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2001, vol. 1, 233-244 [0113]
- KELLEY, S.T. et al. *Circulation*, 1999, vol. 99, 135-142 [0115]
- PILLA, J.J. et al. *Circulation*, 2002, vol. 106, 1207-211 [0115]
- SAAVEDRA, W.F. et al. *J Am Coll Cardiol*, 2002, vol. 39, 2069-2076 [0115]
- LEMBCKE, A. et al. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2004, vol. 25, 84-90 [0115]
- KOLLET, O. et al. *Blood*, 2001, vol. 97, 3283-3291 [0118]
- LAPIDOT, T. ; PETIT, I. *Exp Hematol*, 2002, vol. 30, 973-981 [0118]
- KOLLET et al. *EXP HEMATOL*, 2001 [0118]
- ASKARI, A.T. et al. *Lancet*, 2003, vol. 362, 697-703 [0118]
- PILLARISETTI, K. ; GUPTA, S.K. *Inflammation*, 2001, vol. 25, 293-300 [0118]
- SALCEDO, R. et al. *Am J Pathol*, 1999, vol. 154, 1125-1135 [0118]
- TACHIBANA, K. et al. *Nature*, 1998, vol. 393, 591-594 [0118]
- SALVUCCI, O. et al. *Blood*, 2002, vol. 99, 2703-2711 [0118]
- BROXMEYER, H.E. et al. *J. Leukoc. Biol.*, 2003, vol. 73, 630-638 [0118]
- YAMAGUCHI J-I et al. *Circulation*, 2003, vol. 107, 1322-1328 [0118]
- YAMAGUCHI et al. *CIRCULATION*, 2003 [0118]
- ASKARI et al. *CIRCULATION*, 2003 [0118]
- BROXMEYER, H.E. et al. *CIRCULATION*, 2003 [0118]
- YAMAGUCHI J-I et al. *CIRCULATION*, 2003 [0118]
- KOCHER, A.A. et al. *Nat Med*, 2001, vol. 7, 430-436 [0121]
- SALISBURY, P.F. et al. *Circ Res*, 1960, vol. 8, 794-800 [0121]
- BRAUNWALD, E. *Circulation*, 1989, vol. 79, 441-444 [0121]
- HALE, S.L. ; KLONER, R.A. *Am Heart J*, 1988, vol. 116, 1508-1513 [0121]
- ABBATE, A. et al. *J Cell Physiol*, 2002, vol. 193 [0122]
- ABBATE, A. et al. *Circulation*, 2002, vol. 106, 1051-1054 [0122]
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. NIH Publication No. 85-23 [0141]
- LIM, F. ; SUN, A. M. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*, 1980, vol. 210, 908-910 [0144]

- **LEOR, J. et al.** *Circulation*, 1996, vol. 94, 11332-336 [0149]
- **LITWIN, S.E. et al.** *Circulation*, 1994, vol. 89, 345-354 [0151]
- **SCHWARZ, E.R. et al.** *Basic Res. Cardiol.*, 1998, vol. 93, 477-486 [0151]
- **MEHTA, P.M. et al.** *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1988, vol. 11, 630-636 [0151]
- **YAU, T.M. et al.** *Ann Thorac Surg*, 2003, vol. 75, 169-176 [0152]
- **WATANABE, E. et al.** *Cell Transplant*, 1998, vol. 7, 239-246 [0152]
- **SCHILLER, N.B. et al.** *J. Am. Soc. Echocardiogr.*, 1989, vol. 2, 358-367 [0156] [0157]
- **PERIN, E.C. et al.** *Circulation*, 2003, vol. 107, 2294-2302 [0160]
- **FERRY, J. D.** *Viscoelastic properties of polymers.* John Wiley & Sons, 1980 [0164]
- **LAPASIN, R. ; PRICL, S.** *Rheology of industrial polysaccharide: Theory and application.* Blackie, 1995, 620 [0165]
- *Structural and mechanical properties of biopolymer gels.* **CLARK, A. ; ROSS-MURPHY, S.B.** *Adv. Poly. Sci.* Springer-Verlag, 1987 [0169]
- **PILLA, J.J. et al.** *Circulation*, 2002, vol. 106, 1207-211 [0176]
- **LAMAS, G.A. et al.** *Circulation*, 1997, vol. 96, 827-833 [0182]
- **ROSENBLATT, J.D.** *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 1995, vol. 31, 773-779 [0184]