

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 474 121**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/26** (2006.01)

**A61L 27/56** (2006.01)

**A61L 27/58** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2012 E 12000650 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 2628490**

54 Título: **Matriz para colonización con células**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.07.2014**

73 Titular/es:

**BIOENERGY CAPITAL AG (100.0%)**  
**Konrad-Adenauer-Ufer 101**  
**50668 Köln, DE**

72 Inventor/es:

**GÖRNE, MARTIN y**  
**KORDICK, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 474 121 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Matriz para colonización con células

5 La presente solicitud se refiere a matrices porosas para colonización con células con fines terapéuticos o de diagnóstico.

10 Los implantes celulares basados en matrices porosas de polímeros biocompatibles se conocen a partir de los documentos WO 2004/108810 A1 y EP 1264 607 A1. En tales matrices, los poros están interconectados y sirven como molde para la colonización con células in vivo (por ejemplo, con fines terapéuticos) o in vitro (por ejemplo, con fines de diagnóstico). Para trasplantes, tal matriz biorreabsorbible puede servir para localizar temporalmente el trasplante.

15 Los moldes conocidos, en algunas aplicaciones, no son todavía completamente satisfactorios, en particular respecto a los resultados clínicos.

La invención por tanto pretende mejorar el rendimiento clínico de los moldes.

20 Para ello, la invención propone proporcionar, en un lado del molde normalmente con forma de disco, una superficie con menos del 20 % de la cantidad de poros promedio del otro lado o lados. Esta estructura asimétrica posibilita colocar el molde en el cuerpo de tal manera que las células viables implantadas queden retenidas en su interior durante más tiempo.

25 De acuerdo con un aspecto adicional, la invención propone métodos para fabricar matrices porosas biorreabsorbibles, donde inicialmente se forma una capa de polímero sin agente formador de poros, sobre la cual se sitúa una mezcla de al menos dos polímeros, un disolvente para uno de los polímeros y un agente formador de poros soluble en agua, seguido de la evaporación del disolvente y después lavado con agua para retirar el agente formador de poros. Entre estas dos últimas etapas, en una variante puede ocurrir también la aplicación de presión para la compactación. Ambos métodos dan como resultado discos de matriz polimérica altamente porosa, un lado de los cuales, sin embargo, presenta una membrana sin poros o al menos con un número reducido de poros. A pesar de esta membrana, el suministro de las células que en el caso de aplicación se encuentran en los poros es suficiente, pero las tasas de pérdida debido a la migración están considerablemente reducidas. Si en una variante tal molde ha de servir para soportar tejido conectivo, la capa de polímero continua puede proporcionar una sujeción suficiente, por ejemplo, para material de sutura para fijar el molde.

35 De acuerdo con la invención, la matriz porosa está recubierta de forma hidrófila con polímero de ácido acrílico. Para ello, una etapa de recubrimiento con plasma va seguida de una etapa de recubrimiento sin plasma, con lo que se consiguen los espesores de capa requeridos por encima de un micrómetro, siendo la subcapa generada inicialmente más delgada que la subcapa generada después sin plasma.

40 Otras características de la invención están disponibles a partir de la siguiente descripción de ejemplos de realización junto con las reivindicaciones y las figuras. La invención no está limitada a los ejemplos de realización descritos, sino que queda determinada por el alcance de las reivindicaciones de patente adjuntas. En particular, las características individuales en las formas de realización de acuerdo con la invención pueden realizarse en un número y combinación diferente que en los ejemplos que se dan a continuación. En la explicación posterior de un ejemplo de realización se hace referencia a la figura adjunta, que muestra un diagrama de flujo para un método de acuerdo con la invención.

45 En una aplicación principal se proporcionan matrices para colonizar con células funcionales, por ejemplo con hepatocitos y/o con células de islotes de Langerhans. Tales células con funcionalidad bioquímica se adhieren a las paredes internas de los poros de la matriz de tipo espuma (tasas de adhesión superiores al 80 % o, cuando están recubiertas adecuadamente, por encima del 95 %) y pueden trasplantarse con la matriz dentro de los bolsillos mesoteliales, idealmente del propio donante de células. A este respecto se aprovecha que en este caso no ocurre reacción de rechazo, sino únicamente una estimulación por cuerpo extraño comparativamente moderada, beneficiosa para el proceso terapéutico. En unas pocas semanas, la matriz se vasculariza y las células implantadas ya no dependen únicamente del suministro difusivo. Las matrices se disponen de manera que el lado con un número reducido de poros (o sin poros) está hacia el interior y el lado rico en poros está hacia fuera, para mantener la tasa de pérdida debido a la migración a un nivel bajo. En paralelo tiene lugar una disolución gradual de una parte de la matriz degradable (en 3-4 meses, o al menos 2 y/o menos de 7 meses) y, de esta manera, el entorno fisiológico se ve influido de una manera también beneficiosa para el éxito terapéutico. Es apropiado que una parte de la mezcla polimérica se erosione más lentamente (proporción de los tiempos de degradación al menos 5) y garantice la integridad estructural durante un tiempo más prolongado, por ejemplo 2,5-3 años (o al menos 2 y/o menos de 5 años). Tales polímeros de forma apropiada están basados en ácidos  $\alpha$ -hidroxicarboxílicos tales como ácido láctico y/o ácido glicólico, por ejemplo PLA o PLGA. Los fabricantes de tales polímeros certificados para su uso en el cuerpo humano indican los tiempos de degradación nominales pertinentes en este caso.

Como se ha mencionado anteriormente, se observan tasas de adhesión particularmente buenas con matrices recubiertas, en concreto las que se recubren en un proceso combinado PECVD/CVD inicialmente con plasma con una capa de PAA fina (por ejemplo, 20-30 nm) y posteriormente con una capa de PAA más gruesa (por ejemplo, 20-30  $\mu\text{m}$ ) sin la acción de un plasma. Esta capa superior forma una capa hidrófila, cristalina. Inicialmente, una solución en cloroformo certificado para fines médicos de uno de los polímeros empleados se vierte en un molde y el disolvente se evapora a 45° - 65°. A continuación, una mezcla polimérica que tiene una distribución definida del tamaño de partícula se mezcla con un granulado de sal de mesa que también tiene una distribución definida del tamaño de partícula, se mezcla con una solución de uno de los polímeros en cloroformo y después se coloca sobre la capa polimérica ya producida. A partir de esta preforma, el disolvente se evapora a una temperatura ligeramente elevada (45 °C-65 °C) y la misma puede compactarse entonces mediante aplicación de presión, si se desea. Posteriormente, el cuerpo compacto se lava con agua para retirar la sal y, de esta manera, proporcionar la porosidad deseada. A este respecto, sin embargo, la capa polimérica fabricada inicialmente permanece libre de poros. De acuerdo con el campo de uso, el espesor de la capa con un número reducido de poros puede ajustarse mediante la cantidad y concentración de la solución inicial. Por ejemplo, se obtiene una membrana muy fina si la concentración de la solución es baja (por ejemplo, al 4 % en cloroformo, polímero lentamente degradable) y el nivel de llenado es bajo (por ejemplo, de 0,1-1 mm, por ejemplo 0,3 mm). Cuando se desea una estructura mecánicamente más robusta, el nivel de llenado puede establecerse para que sea mayor (por ejemplo, 5-50 mm, típicamente 20-25 mm) a la misma concentración. Por consiguiente, en este caso, la evaporación del cloroformo tarda más (1,5 horas). En el primer caso la membrana resultante tiene un espesor de aproximadamente 10-20  $\mu\text{m}$ , en el último caso de aproximadamente 0,5-1 mm.

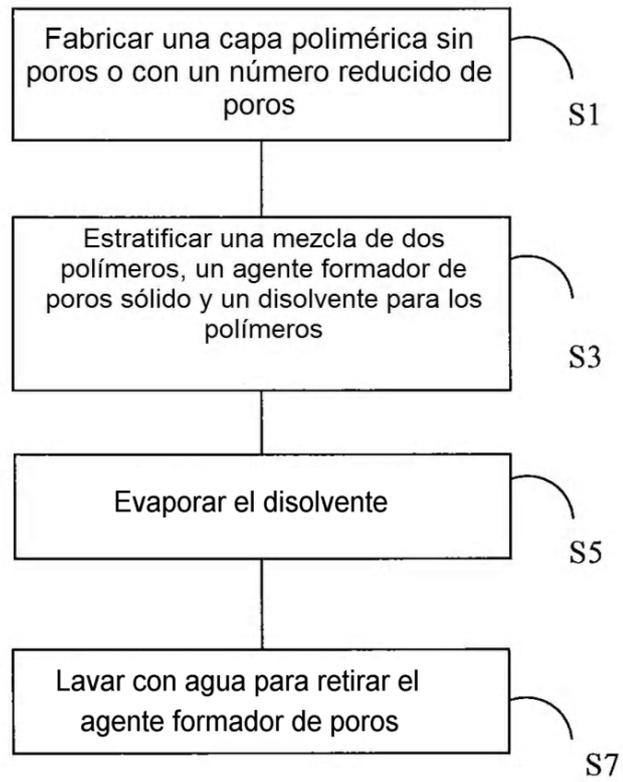
Las partículas de sal de mesa de la mezcla a estratificar son algo más gruesas (mediana 350-370  $\mu\text{m}$ ) que las partículas poliméricas (mediana del polímero que se degrada más lentamente entre 210  $\mu\text{m}$  y 230  $\mu\text{m}$ , la del polímero que se degrada más rápidamente entre 150  $\mu\text{m}$  y 170  $\mu\text{m}$ ). A este respecto, las amplitudes de distribución (5 %/95 %) son similares, en concreto de aproximadamente  $\pm 85$ -95  $\mu\text{m}$  para la sal o el polímero total. La forma de la distribución puede ser bi- o trimodal. La composición de la mezcla estratificada es de aproximadamente un 96 % de sal, un 1-1,5 % de polímero sólido y adicionalmente aproximadamente un 3-5 % de polímero disuelto, donde las partes en volumen de sólidos y líquidos son aproximadamente iguales. En total, la parte del polímero rápidamente degradable es solo aproximadamente el 5-20 % de los polímeros. El espesor total de la capa formadora de poros es de 5-6 mm. En la variante de una capa inicial más estable, la sal puede seleccionarse algo más gruesa (mediana aproximadamente 400-420  $\mu\text{m}$ ). En este caso, el espesor total de la capa formadora de poros es de 4-5 mm y puede prescindirse de la compactación a presión. El lavado con agua tarda aproximadamente 24 horas y va seguido de un secado a 45-50 °C. Cuando se forma un recubrimiento, la matriz se pone sobre el lado con un número reducido de poros y, de esta manera, se recubre principalmente el lado de poros abiertos.

Los polímeros empleados en este documento están disponibles, por ejemplo, en la empresa Evonik y llevan las denominaciones L210s, L210, L09s, L207s, L206s (polímeros de PLGA que se degradan más lentamente) o RG502, RG502H, RG505 (polímeros de PLGA que se degradan más rápidamente).

En una aplicación fuera del cuerpo, una matriz de acuerdo con la descripción anterior puede servir para fijar células que están expuestas a agentes en un biorreactor. Por ejemplo, de esta manera pueden estudiarse tipos de células definidos con respecto a si responden a un medicamento en cuestión o no, y la terapia puede planificarse dependiendo de los resultados del examen que se obtienen de esta manera. Análogamente, el desarrollo de medicamentos puede simplificarse, debido a que la toxicidad es reconocida tempranamente.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Matriz para implante celular con una porosidad conectiva de más del 80 %, que consiste principalmente en una mezcla de polímeros biorreabsorbibles, donde la matriz presenta forma de disco y donde la superficie en un lado del disco presenta menos del 20 % de la proporción de poros promedio de los otros lados, donde la matriz está recubierta de forma hidrofílica con ácido poliacrílico, PAA, donde una subcapa de PAA generada inicialmente con acción de un plasma es más delgada que una subcapa de PAA generada después sin acción de plasma.
- 10 2. Matriz de acuerdo con la reivindicación 1, donde el recubrimiento consiste principalmente en unidades de ácido acrílico.
3. Matriz de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el espesor del recubrimiento es mayor de 1  $\mu\text{m}$ .
- 15 4. Matriz de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, donde la matriz consiste principalmente en ácidos poli( $\alpha$ -hidroxil)carboxílicos.
- 20 5. Matriz de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, donde las tasas de reabsorción de dos de los polímeros que constituyen la mezcla, que proporcionan respectivamente al menos un 10 % de la mezcla, difieren en un factor de más de 5.
6. Proceso de fabricación de una matriz para implante celular porosa, comprendiendo el proceso:
- 25 fabricar una capa de polímero biorreabsorbible;  
estratificar sobre la capa de polímero una mezcla de un sólido soluble en agua, al menos dos polímeros con diferentes tasas de reabsorción y un disolvente inmiscible con agua para al menos uno de los polímeros;  
evaporar el disolvente;  
lavar con agua el aglomerado para retirar el sólido soluble en agua; y  
recubrimiento con un componente hidrofílico después del lavado con agua, siguiendo a una etapa inicial de recubrimiento por plasma con PAA, en presencia de un gas noble o inerte, una etapa de recubrimiento con PAA sin plasma, de tal manera que el espesor de capa generado sin plasma es mayor que el espesor de capa generado inicialmente.
- 30 7. Proceso de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende adicionalmente aplicar presión para compactar la mezcla después de evaporar el disolvente.
- 35 8. Proceso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, donde se usa cloroformo como el disolvente.
- 40 9. Proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 a 8, donde las tasas de reabsorción de dos de los polímeros que constituyen la mezcla, que proporcionan respectivamente al menos un 10 % de la mezcla, difieren en un factor de más de 5.
10. Proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 a 9, donde el componente de hidrofílicación consiste principalmente en ácido acrílico o anhídrido acrílico.
- 45 11. Proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 a 10, donde el espesor de la capa fabricada inicialmente es de 0,002-2,5 mm.
- 50 12. Proceso de acuerdo con la reivindicación 11, donde el espesor de la capa fabricada inicialmente es de 0,005-0,025 mm.
13. Proceso de acuerdo con la reivindicación 11, donde el espesor de la capa fabricada inicialmente es de 0,25-2,0 mm.
- 55 14. Uso de la matriz de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5 para la colonización con células viables y para la exposición de las células viables a un agente de ensayo predeterminado fuera del cuerpo.
- 60 15. Uso de la matriz fabricada según el proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 a 13 para la colonización con células viables y para la exposición de las células viables a un agente de ensayo predeterminado fuera del cuerpo.



**Fig. 1**