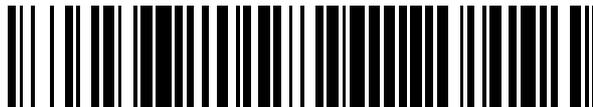


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 447**

51 Int. Cl.:

D04H 1/728 (2012.01)

D04H 1/42 (2012.01)

D01D 5/00 (2006.01)

D04H 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2009 E 09737181 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2334857**

54 Título: **Preforma multicapa obtenida mediante electrohilado, procedimiento para producir una preforma, así como uso de la misma**

30 Prioridad:

09.10.2008 NL 1036038

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

23.01.2015

73 Titular/es:

**TECHNISCHE UNIVERSITEIT EINDHOVEN
(100.0%)
Den Dolech 2
5612 AZ Eindhoven, NL**

72 Inventor/es:

**BAAIJENS, FRANCISCUS PETRUS THOMAS;
RUBBENS, MIRJAM PETRONELLA y
COX, MARTIJN ANTONIUS JOHANNES**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 527 447 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

5 Preforma multicapa obtenida mediante electrohilado, procedimiento para producir una preforma, así como uso de la misma

La presente invención se refiere a una preforma multicapa obtenida mediante electrohilado, cuya preforma es adecuada como un andamiaje para una prótesis, cuya preforma comprende al menos una capa de microfibras y al menos una capa de nanofibras. La presente invención se refiere además a un procedimiento para producir una preforma mediante electrohilado. Además, la presente invención se refiere al uso de dicha una preforma y a un procedimiento de cultivo de tejido humano o animal sobre un sustrato.

10 La publicación de Q. P. Pham et al. en *Biomacromolecules* 2006, vol. 7, pp. 1796-1805 se refiere a una preforma multicapa electrohilada a base de fibras de polímeros de ϵ -policaprolactona. La preforma multicapa comprende capas alternas de microfibras que tienen un diámetro de 2 a 10 micrómetros y nanofibras que tienen un diámetro de aproximadamente 600 nanómetros. Sin embargo, el crecimiento hacia el interior de las células en la matriz de preforma no es óptimo debido al paso no óptimo de las células y los nutrientes a la preforma.

15 El documento US 2008/112998 se refiere a un andamiaje de tejido sintético que comprende capas alternas de polímeros electrohilados y células de mamíferos intercaladas en su interior. La presencia de células de mamíferos en los andamiajes de tejido complica la esterilización y el almacenamiento del andamiaje previamente a su uso.

20 El documento US 2008/0131965 correspondiente al documento NL 1026076 describe un procedimiento para producir una preforma mediante un procedimiento de electrohilado. No se refiere a un procedimiento para producir una preforma a partir de nano y micro fibras.

25 Un objeto de la presente invención es proporcionar una preforma a partir de la cual puedan producirse prótesis o implantes tridimensionales.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una preforma que tenga un excelente crecimiento hacia el interior de las células.

30 Otro objeto de la presente invención es la provisión de una preforma que tenga un equilibrio óptimo entre estabilidad estructural y mecánica por un lado y el crecimiento hacia el interior y la fijación de células por otro lado. Además, un objeto de la presente invención es proporcionar una preforma que pueda ser usada como un sustrato para el cultivo de tejido humano o animal.

35 Además, un objeto de la presente invención es proporcionar un sustrato para una prótesis o un implante, en particular, para una válvula cardíaca, un vaso sanguíneo, una conexión tipo T para conectar vasos sanguíneos o un parche cardíaco.

40 Uno o más de los objetos anteriores se consiguen mediante una preforma multicapa según el preámbulo, caracterizada por que el tamaño de poro de la al menos una capa de microfibras está comprendido en el intervalo de 1 - 300 micrómetros y por que el tamaño de poro de la al menos una capa de nanofibras está comprendido en el intervalo de 1 - 300 micrómetros.

45 En una realización de la presente invención, el tamaño de poro de todas las capas de la preforma, es decir, el tamaño de poro de la red completa de fibras o la preforma, está comprendido en el intervalo de 1 - 300 micrómetros. De esta manera, la porosidad de la preforma total está comprendida en el intervalo deseado, permitiendo una infiltración óptima de las células y los nutrientes a lo largo de todo el espesor de la preforma.

50 Los presentes inventores han encontrado que, cuando se usa una preforma basada en una o más capas de microfibras combinadas con una o más capas de nanofibras, es esencial que el tamaño de poro de las una o más capas de microfibras, así como las una o más capas de nanofibras, sea suficientemente grande para asegurar un buen crecimiento hacia el interior de las células, así como buena difusión de los nutrientes.

55 Después de una elaborada investigación, los presentes inventores han encontrado que puede obtenerse un equilibrio óptimo entre las propiedades estructurales y mecánicas, por un lado, y el crecimiento hacia el interior y la fijación de las células, por otro lado, mediante una preforma según la presente invención. En particular, los presentes inventores encontraron que el tamaño de poro de la capa de nanofibras era crítico y, sin querer estar ligados a una teoría específica, los presentes inventores son de la opinión de que el tamaño de poro de la capa o las capas de nanofibras es responsable de un crecimiento hacia el interior suficiente de las células.

Resumen de los dibujos

La presente invención se entiende mejor a partir de la descripción detallada siguiente cuando se considera junto con los dibujos adjuntos.

5

La Figura 1 describe una sección transversal esquemática de una preforma de dos capas según una realización de la presente invención.

10

La Figura 2 describe una sección transversal esquemática de una preforma de capas que forman un gradiente según otra realización de la presente invención.

La Figura 3 describe otra realización de la preforma multicapa según la presente invención.

15

La Figura 4a muestra tres submoldes de un molde que pueden ser usados para el electrohilado de una preforma según la presente invención para ser usada como un andamiaje para una válvula cardíaca artificial de tres membranas.

20

La Figura 4b es una vista en sección de un conjunto de los submoldes de la Figura 4a, que han sido provistos de una capa de microfibras y una capa de nanofibras mediante electrohilado.

25

La Figura 5a muestra un conjunto de los tres submoldes de la Figura 4a y un submolde complementario para obtener una válvula cardíaca completa, mientras que la Figura 5b es una vista en sección de los submoldes de la Figura 5a deslizados uno en el interior del otro. La Figura 5c es una vista en sección del molde completo para la válvula cardíaca que comprende una capa de microfibras y una capa de nanofibras obtenida después de un electrohilado.

Las Figuras 6a y 6b son una vista en planta superior y una vista lateral, respectivamente, de una preforma según la presente invención obtenida usando el molde de las Figuras 5a-5c.

30

La Figura 7a muestra un molde según otra realización de la presente invención, una pieza en T para conectar dos o más vasos sanguíneos. Las Figuras 7b y 7c muestran dos posibles realizaciones de un submolde. La Tabla 1 representa información sobre diversas microfibras usadas en la presente invención.

Descripción detallada

35

El término "microfibras", tal como se usa en la presente memoria, significa fibras que tienen un diámetro comprendido en el intervalo micrométrico.

40

El término "nanofibras", tal como se usa en la presente memoria, significa fibras que tienen un diámetro comprendido en el intervalo nanométrico.

El término "preforma", tal como se usa en la presente memoria, significa un artículo que tiene una forma tridimensional que puede ser usado como un andamiaje para ingeniería tisular.

45

El término "multicapa", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, significa que comprende al menos dos capas, una de nanofibras y una de microfibras. Se incluyen en esta definición, en el alcance de la presente invención, las preformas de capas que forman un gradiente construidas a partir de un número infinito de capas muy finas, una sobre la otra, en las que el diámetro de las fibras cambia continuamente de una capa a otra. En el electrohilado, esto puede conseguirse, por ejemplo, cambiando de manera continua los parámetros de hilado durante la operación de hilado, de manera que el diámetro de las fibras aumente o disminuya de manera continua.

50

Un ejemplo muy básico de una preforma de múltiples capas que forman un gradiente es una preforma que tiene en una superficie exterior una capa de microfibras y en la otra superficie exterior una capa de nanofibras y entre las mismas hay un número infinito de capas de microfibras y capas de nanofibras, unas sobre otras, con un diámetro menor que la capa anterior.

55

Es conocido el uso de electrohilado en la fabricación de los denominados andamiajes que se usan en el campo de la ingeniería tisular. En el procedimiento de electrohilado, pueden cambiarse muchos parámetros que alteran y optimizan las propiedades del andamiaje deseado, haciendo del electrohilado una técnica versátil. Los ejemplos de aplicaciones para preformas electrohiladas son el uso como andamiajes o moldes para ingeniería tisular, como dispositivos de administración de fármacos y como apósitos para heridas.

60

En la patente holandesa NL 1026076 (correspondiente al documento US 2008/0131965), de uno de los presentes inventores, se describe un procedimiento para la preparación de una preforma mediante electrohilado de

microfibras poliméricas, cuya preforma puede ser usada como un andamiaje para una prótesis de una válvula cardíaca. En la patente holandesa se describen moldes y submoldes similares a los descritos en las Figuras 3-7.

5 El electrohilado es una técnica que usa un objetivo o molde de metal, que tiene ya una forma plana o con forma de placa o una forma tridimensional compleja, dependiendo de la preforma deseada. Las fibras de polímero se depositan sobre este molde por medio de un campo electromagnético. Las fibras de polímero se generan a partir de una solución de uno o más polímeros en uno o más disolventes. Esta técnica de electrohilado es conocida en sí misma y no se describirá más detalladamente en la presente memoria descriptiva.

10 Cualquier material de fibras que pueda ser procesado mediante electrohilado puede ser usado como el material para las capas de fibras según la presente invención. Sin embargo, en la presente invención es preferente el uso de materiales poliméricos, en particular materiales poliméricos biológicamente compatibles, como el material de fibras. Los ejemplos de polímeros adecuados se indican más adelante.

15 Después de que las fibras han sido depositadas sobre la superficie del (sub) molde, el (sub) molde se retira de las fibras y se obtiene una preforma o andamiaje de fibras. Esta preforma es una red muy porosa de fibras no tejidas superpuestas, que puede ser usada como sustrato para el crecimiento hacia el interior y el crecimiento de células y tejidos. La infiltración de las células y la formación de tejidos pueden tener lugar in vivo o in vitro. Para la formación de tejido in vivo, se implanta una preforma no sembrada o sembrada (es decir, una preforma que está o no sembrada con células) en el cuerpo y atrae a las células y promueve la formación de tejido. Para la formación de tejido in vitro, la preforma es incubada usando células humanas o animales, que son capaces de crecer en la estructura de tipo fibra abierta. Dicha incubación puede llevarse a cabo bajo condiciones adecuadas de disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento, temperatura, tiempo, pH, estímulos mecánicos y bioquímicos, etc., con el fin de optimizar el crecimiento celular. Esto conduce a la formación de tejido en y sobre la preforma. Esta combinación de tejido y preforma puede ser usada como un implante o prótesis. La prótesis o implante obtenida de esta manera puede ser implantada en un cuerpo humano o animal.

30 Si se usa polímero biodegradable para las capas de fibras para preparar una preforma según la presente invención, la red fibrosa porosa del andamiaje se degrada durante el crecimiento de tejido in vitro o después de la implantación in vivo o ambos. Como resultado, sólo se mantiene el tejido recién formado, el cual forma una prótesis natural. Por lo tanto, según la presente invención, es preferente el uso de un polímero biodegradable o biológicamente absorbible para la preforma, asegurando la degradación casi completa o la resorción de la preforma después de una cierta cantidad de tiempo; en el que el material polimérico es reemplazado por tejido humano o animal, dejando un implante o prótesis completamente natural presente en el cuerpo.

35 Los andamiajes electrohilados se caracterizan por varios parámetros importantes. Un primer parámetro es el diámetro de la fibra, que se mide, por ejemplo, por medio de microscopía electrónica. El diámetro de la fibra puede tener un efecto sobre diversas propiedades del andamiaje, tales como el área superficial y los parámetros indicados más adelante. La presente invención requiere la presencia de al menos dos capas que tienen diámetros de fibra diferentes, concretamente, al menos una capa que tiene microfibras y al menos una capa que tiene nanofibras.

40 Un segundo parámetro es el tamaño de poro del andamiaje, medido por ejemplo por medio de porosimetría de mercurio. El tamaño de poro de las capas de la presente preforma debería estar comprendido entre 1 y 300 micrómetros.

45 Un tercer parámetro es la porosidad, medida por ejemplo, mediante porosimetría de mercurio, intrusión de líquido y gravimetría. El tamaño de poro y la porosidad son propiedades críticas de un andamiaje que influyen sobre la fijación, la proliferación, la migración y/o la diferenciación de células.

50 El uso de capas de microfibras asegura una buena estabilidad estructural y mecánica del andamiaje fibroso. El uso de capas de nanofibras asegura una buena compatibilidad con las células humanas y/o animales, cuyas células están siendo usadas para hacer crecer el tejido en el andamiaje. Las presentes invenciones han encontrado que una combinación de ambas dentro de unos intervalos de tamaño de poro específicos proporciona un equilibrio óptimo entre la estabilidad estructural y mecánica por un lado y una buena compatibilidad con las células humanas y/o animales por otro lado.

55 La MEC es la matriz extracelular, que es la parte extracelular de tejido humano o animal que proporciona andamiaje estructural a las células. La MEC está constituida por la matriz intersticial y la membrana base. La matriz intersticial está presente entre diferentes células y está formada por un gel de polisacáridos y proteínas fibrosas (que muestra semejanza física con las presentes nanofibras). Las membranas base son deposiciones en forma de lámina de MEC sobre las que se fijan y crecen las células epiteliales. Las capas de nanofibras, tal como se usan en la presente invención, imitan las características físicas de la matriz extracelular de una célula. Las ventajas de este

mimetismo son que las células que se cultivan sobre la preforma están cómodas en su entorno y, por lo tanto, muestran una fijación excelente a la capa o las capas de nanofibras; cuya fijación es mejor que la fijación de las mismas células a la capa o las capas de microfibras. Una serie de realizaciones preferidas de la preforma se definen en las reivindicaciones dependientes y se explicarán más detalladamente más adelante.

5

En una realización de la presente invención, el tamaño de poro de la al menos una capa de microfibras está comprendido entre 1 y 300 micrómetros. Preferiblemente, el tamaño de poro máximo es de 250 micrómetros, más preferiblemente de 200 micrómetros. En una realización aún más preferida, el tamaño de poro está comprendido entre 5 y 100 micrómetros. El tamaño de poro más preferido depende del tipo de las células a cultivar y está

10

comprendido entre 5 y 50 micrómetros para células animales y entre 20 y 100 para células humanas.

En una realización de la presente invención, el tamaño de poro de la al menos una capa de nanofibras está comprendido entre 1 y 300 micrómetros. Preferiblemente, el tamaño de poro máximo es de 250 micrómetros, más preferiblemente de 200 micrómetros. En una realización aún más preferida, el tamaño de poro está comprendido

15

entre 5 y 100 micrómetros. El tamaño de poro más preferido depende del tipo de las células a cultivar y está comprendido entre 5 y 50 micrómetros para células animales y entre 20 y 100 para células humanas.

En una realización de la presente invención, el tamaño de poro de todas las capas de la preforma, es decir, el tamaño de poro de la toda la red de fibras o la preforma, está comprendido entre 1 y 300 micrómetros.

20

Preferiblemente, el tamaño de poro máximo es de 250 micrómetros, más preferiblemente de 200 micrómetros. En una realización aún más preferida, el tamaño de poro está comprendido entre 5 y 100 micrómetros. El tamaño de poro más preferido depende del tipo de las células a cultivar y está comprendido entre 5 y 50 micrómetros para células animales y entre 20 y 100 para células humanas.

La ventaja de estos tamaños de poro de la capa de microfibras, así como las nanofibras, es que permite el paso de las células a cultivar y, por lo tanto, una buena infiltración de las células en todo el espesor de la preforma, lo cual se requiere para asegurar la formación de tejido a lo largo de toda la preforma. El tamaño de poro depende del tamaño de las células a cultivar y puede ser seleccionado según este tamaño. En general, el tamaño de las células humanas es más grande que el tamaño de las células animales, de ahí la diferenciación entre los tamaños de poro más preferidos cuando se usan células animales o humanas.

25

30

En otra realización de la presente invención, el diámetro de las microfibras está comprendido en el intervalo de 3-20 micrómetros, preferiblemente 5-18 micrómetros y, en particular, 8-14 micrómetros, por ejemplo, de aproximadamente 12 micrómetros. La ventaja de este diámetro es la excelente estabilidad mecánica y estructural.

35

La Tabla 1 proporciona una visión general de diversos tipos de microfibras a ser usados en la presente invención.

La tabla muestra en la primera columna el diámetro de la fibra, en micrómetros. La segunda columna muestra el tamaño de poro, en micrómetros, para una capa de estas fibras. La tercera columna muestra fotos de la apariencia microscópica de la capa de fibras. La cuarta columna muestra fotos de la visualización del crecimiento hacia el interior de las células y la quinta y última columna muestra la calificación del crecimiento hacia el interior de las células.

40

Aunque en este gráfico sólo se usan microfibras, el efecto del tamaño de poro sobre el crecimiento hacia el interior de las células está claramente demostrado. Los datos de visualización se adaptan de la Figura 4.1 del Balgúid, Strategies to optimize engineered tissue towards native human aortic valves, PhD thesis Eindhoven University of Technology, 2008. El tamaño de poro (estimado combinando los datos indicados anteriormente con la Figura 4 en Pham et al., indicada anteriormente). El presente procedimiento permitirá al presente inventor desacoplar la relación entre el diámetro de la fibra y el tamaño de poro, lo cual permite un crecimiento hacia el interior de las células suficiente incluso a una escala de nano-fibras.

45

50

En otra realización de la presente invención, el diámetro de las nanofibras está comprendido en el intervalo de 50-800 nanómetros, preferiblemente 100-800 nanómetros, más preferiblemente 200-800 nanómetros y, en particular, 400-800 nanómetros, que imita las dimensiones a nanoescala de la MEC. En otras realizaciones, el diámetro máximo de las nanofibras puede ser de 700 nanómetros o incluso de 600 nanómetros.

55

En otra realización de la presente invención, la porosidad de la al menos una capa de microfibras está comprendida en el intervalo 70-95%.

60

En otra realización de la presente invención, la porosidad de la al menos una capa de nanofibras está comprendida en el intervalo 70-95%.

La ventaja de este intervalo de porosidad para la capa de microfibras y la capa de nanofibras es que permite el paso de las células a cultivar y, por lo tanto, una buena infiltración de las células en todo el espesor de la preforma, lo cual se requiere para asegurar la formación de tejido a lo largo de toda la preforma. El tamaño de poro depende del tamaño de las células a cultivar y puede ser seleccionado según este tamaño.

5

La presente preforma puede ser construida a partir de una única capa de microfibras y una única capa de nanofibras. En este caso, la capa de microfibras puede estar presente como la capa interior o exterior.

10

Además, la presente preforma puede ser construida a partir de dos capas de microfibras, intercalando una capa de nanofibras, o viceversa.

15

Además, también es posible construir la presente preforma a partir de cualquier número de capas de microfibras y cualquier número de capas de nanofibras, alternadas o en cualquier otra configuración deseada, por ejemplo, un gran número de capas que tienen diámetros crecientes o incluso una multicapa que forma un gradiente que tiene un número muy grande o incluso infinito de capas que tienen diámetros crecientes desde una capa de nanofibras a una capa de microfibras o viceversa, o desde una capa de nanofibras a una capa de microfibras y de nuevo a una capa de nanofibras o viceversa.

20

En una realización de la presente invención, las células de mamífero no se incorporan al andamiaje durante la producción de dicho andamiaje. La ausencia de células de mamífero permite un fácil almacenamiento y esterilización del andamiaje antes de su uso. Otra ventaja del andamiaje según la presente invención es que las células seleccionadas pueden ser sembradas sobre el andamiaje antes de su uso. Los andamiajes que ya comprenden células de mamíferos solo pueden ser usados para las células presentes en el andamiaje.

25

Las Figuras 1, 2 y 3 proporcionan una representación muy esquemática de tres posibles realizaciones de una preforma multicapa según la presente invención. Los dibujos no están dibujados a escala.

30

La Figura 1 describe una representación esquemática de una sección transversal de una preforma de dos capas. Una primera capa 1 de microfibras y una segunda capa 2 de nanofibras. Las líneas 3 de puntos indican los límites de estas capas. En esta realización, las capas son planas y no hay superposición entre las capas. Además, el tamaño de poro para ambas capas es similar.

35

La Figura 2 describe una múltiple capa que forma un gradiente con seis capas que tienen diferentes diámetros de fibra, desde nanofibras hasta microfibras. Una vez más, las líneas de puntos proporcionan una indicación de los límites entre las capas. Una vez más, el tamaño de poro para las capas es similar.

40

La Figura 3 describe una multicapa alterna que tiene tres capas 1 de microfibras y tres capas 2 de nanofibras. Una vez más, las líneas de puntos proporcionan una indicación de los límites entre las capas. Una vez más, el tamaño de poro de las capas es similar.

45

Una preforma según la presente invención puede mostrar capas que son menos planas y en las que el límite entre las capas separadas está menos definido.

50

El espesor de una capa de microfibras está comprendido, por ejemplo, entre 10 y 500 micrómetros, preferiblemente entre 50 y 250 micrómetros.

El espesor de una capa de nanofibras está comprendido, por ejemplo, entre 100 nanómetros y 500 micrómetros, preferiblemente entre 10 y 250 micrómetros.

55

Preferiblemente, el espesor de la preforma total está comprendido entre 300 y 1.000 micrómetros para una válvula cardíaca, entre 300 y 1.000 para un vaso sanguíneo y entre 500 y 2.000 para un parche cardíaco. Una persona con conocimientos en la materia puede determinar otros espesores dependiendo de su uso.

60

El espesor de la capa o capas de microfibras y la capa o capas de nanofibras depende de la aplicación. En una aplicación que requiere fuertes propiedades mecánicas, el espesor de la capa o capas de microfibras será, en general, mayor que en una aplicación que requiere propiedades mecánicas menos fuertes. Además, existe también una relación con el tamaño de poro de las diferentes capas. Por ejemplo, cuando el tamaño de poro es más grande, las capas pueden ser más gruesas y todavía pueden mantener la misma facilidad de infiltración. Por lo tanto, los diferentes parámetros están estrechamente relacionados y pueden ser ajustados unos con respecto a otros para cada aplicación específica dentro de los intervalos reivindicados por una persona con conocimientos en la materia sin carga indebida.

El espesor de la preforma total depende también de la aplicación. En una aplicación que requiere fuertes propiedades mecánicas, el espesor total de la preforma será en general más grande que en una aplicación que requiere propiedades mecánicas menos fuertes.

5 Con el uso del electrohilado, se obtiene una preforma o andamiaje de polímero. Un andamiaje de polímero superaría las deficiencias de los tejidos cardiovasculares diseñados en la actualidad, que son la falta de elastina. El funcionamiento in vivo apropiado de los injertos diseñados de tejido vascular no ha tenido éxito debido a la falta de biosíntesis de elastina en los equivalentes de tejido. Sin embargo, los andamiajes poliméricos exhiben un comportamiento elástico con solo una deformación permanente de poca importancia. Por lo tanto, los polímeros, tales como por ejemplo policaprolactona, podrían funcionar como un sustituto elástico mientras la elastina natural es producida gradualmente para asumir esta función.

15 El polímero que se usa para obtener la presente preforma electrohilada no está limitado y puede ser seleccionado por una persona con conocimientos en la materia según los requisitos de cada uso específico. Los ejemplos de polímeros adecuados son polímeros alifáticos, copoliésteres, polihidroxialcanoatos y polialquilenglicol, por ejemplo, polietilenglicol, policaprolactona.

20 Es preferible que el polímero usado en el procedimiento de electrohilado sea biodegradable o biológicamente absorbible.

También es posible el uso de mezclas de dos o más polímeros. Además, es posible usar copolímeros de bloque, que comprenden dos o más bloques. Por ejemplo, es posible usar bloques de polímeros que tienen tasas de descomposición mutuamente diferentes.

25 En una realización específica de la presente invención, al menos dos capas de fibras (microfibras, nanofibras o una combinación) tienen tasas de descomposición biológica mutuamente diferentes. Dicha tasa de descomposición puede ser medida según procedimientos estándar, que no se explicarán más detalladamente en la presente memoria. O bien la descomposición biológica de la capa de fibra interior tiene lugar más rápidamente que la de la capa de fibras exterior, de manera que la capa de fibras exterior proporciona la fuerza necesaria, mientras que la capa de fibras interior puede ser sustituida rápidamente por tejido natural; o bien la descomposición biológica de la capa de fibras exterior tiene lugar más rápidamente que la de la capa de fibras interior, de manera que la capa de fibras interior proporciona la fuerza necesaria, mientras que la capa de fibras exterior puede ser sustituida rápidamente por tejido natural.

35 Otra realización especialmente preferida se refiere al uso de una capa de fibras (microfibras o nanofibras o ambas) que comprende fibras compuestas de al menos dos componentes, en el que los diversos componentes tienen tasas de descomposición biológica mutuamente diferentes, tal como se ha indicado anteriormente. La fibra consiste en un componente a y un componente b, ordenados secuencialmente, por ejemplo, de manera que se obtiene una fibra -a-b-a-b-a-b- que presenta una composición repetitiva. Cuando se usa dicha una capa de fibras, uno de los dos componentes se descompondrá después de cierto tiempo, de manera que permanece una colección de fibras cortas, concretamente, las fibras del componente que tiene la tasa de descomposición más lenta. Las fibras cortas, que todavía están presentes, contribuyen a la resistencia mecánica del tejido natural recién formado, mientras que el tejido puede crecer, lo cual no es posible cuando se produce una capa de fibras que sólo consiste en un componente de descomposición lenta. Una ventaja del uso de una capa de fibras que comprende fibras que están compuestas de dos componentes es el hecho de que, cuando se usa una preforma realizada en dichas fibras para su implantación en pacientes jóvenes, no se requiere cirugía posterior para intercambiar el implante por un implante más grande. Al fin y al cabo, el implante producido según la presente invención puede crecer con el paciente. Sin embargo, esta ventaja puede ser conseguida también mediante otras realizaciones de la presente invención.

50 La presente invención se refiere además a un procedimiento de producción de una preforma mediante electrohilado, cuya preforma es adecuada para su uso como un andamiaje para una prótesis, caracterizado por que el procedimiento comprende las etapas de proporcionar un molde y posteriormente aplicar, en orden aleatorio, mediante electrohilado, al menos una capa de microfibras y al menos una capa de nanofibras, en el que el tamaño de poro de la al menos una capa de microfibras está comprendido en el intervalo 1-300, preferiblemente 5-100 micrómetros y el tamaño de poro de la al menos una capa de nanofibras está comprendido en el intervalo de 1-300, preferiblemente 5-100 micrómetros.

60 Los presentes inventores han desarrollado el procedimiento anterior que hace posible obtener una preforma que permite una infiltración suficiente de células, así como una difusión suficiente de nutrientes para el tejido en crecimiento. La fabricación de capas de nanofibras que tienen un tamaño de poro comprendido en el intervalo 1-300, preferiblemente 5-100 micrómetros, no se ha llevado a cabo hasta ahora.

Una serie de realizaciones preferidas para el procedimiento se definen en las reivindicaciones dependientes y se explicarán más detalladamente más adelante. Las realizaciones descritas para la preforma son aplicables también al procedimiento y viceversa.

5 En una realización del presente procedimiento, la etapa de electrohilado de la al menos una capa de nanofibras y, posiblemente, la al menos una capa de microfibras se lleva a cabo a una temperatura por debajo de 220 K (-53°C), por ejemplo en el intervalo de 200 a 220 K (de -73°C a -53°C), tal como se describe en la publicación de Simonet et al. *Polymer engineering and science*, 2007, páginas 2020-2026. Pueden usarse también temperaturas inferiores a 200 K, dependiendo del procedimiento usado para la refrigeración, que puede ser, por ejemplo, hielo seco o nitrógeno líquido. Este procedimiento de electrohilado a baja temperatura se denomina crio electrohilado. La ventaja del uso de dicha baja temperatura es que permite la formación de poros de dimensiones micrométricas. Sin desear estar ligados a esta teoría, los presentes inventores creen que esto es causado por la formación de cristales de hielo causados por la congelación de las gotas de agua que están presentes en la solución de electrohilado. Estos cristales de hielo se insertan en la red porosa durante el electrohilado de las nanofibras. Después del procedimiento, la temperatura se lleva de nuevo a la temperatura ambiente y los cristales de hielo se derriten, dejando poros que tienen un tamaño en el intervalo de diámetros.

En otra realización, el procedimiento comprende las etapas de proporcionar un molde, electrohilar al menos una capa de nanofibras y, posteriormente, proporcionar al menos una capa de microfibras.

En otra realización, no se incorporan células de mamífero en la preforma durante el electrohilado. Las células sólo se incorporan después de completar la preforma.

La presente invención se refiere también al uso de una preforma obtenida con el presente procedimiento como sustrato para cultivar el tejido humano o animal en la misma.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para cultivar tejido humano o animal sobre un sustrato, en el que la presente preforma se usa como sustrato. De esta manera, la preforma obtenida mediante electrohilado puede estar provista de una capa de tejido humano o animal.

En una realización, el andamiaje es para la preparación de una prótesis para una válvula cardíaca. En otra realización, el andamiaje es para la preparación de una prótesis para un vaso sanguíneo o una conexión de vasos sanguíneos. Cuando uno o más vasos sanguíneos son conectados mediante sutura, frecuentemente se produce una fuga, ya que este es un procedimiento complejo y los vasos sanguíneos son tan pequeños y de forma circular que la sutura es problemática. Por consiguiente, hay una necesidad de una conexión en T que pueda ser usada para conectar dos o más vasos sanguíneos.

La presente invención es particularmente adecuada para la preparación de preformas mediante electrohilado, cuyas preformas tienen una forma tridimensional compleja. En particular, la presente invención es adecuada para preparar una preforma según la patente holandesa NL 1026076, cuya preforma puede ser usada como un andamiaje para una prótesis de una válvula cardíaca.

El corazón humano realiza una tarea biomecánica impresionante, latiendo 100.000 veces y bombeando 7.200 litros de sangre a través del cuerpo cada día. Esta tarea resulta en grandes cargas mecánicas, especialmente en la válvula aórtica del corazón, que llega a 80 mmHg durante la fase diastólica. Las valvas de la válvula nativa tienen una arquitectura de colágeno anisotrópica con una alineación de fibras preferencial en la dirección circunferencial, resultando en una resistencia mínima durante la sístole, y suficiente resistencia y rigidez para acomodar las cargas diastólicas. En las arterias (diámetro pequeño), el colágeno está organizado en una estructura helicoidal. Una vez más, la naturaleza ha optimizado este diseño para soportar las presiones arteriales.

Por consiguiente, las exigencias mecánicas para los andamiajes electrohilados representan un reto, especialmente cuando se diseñan para una aplicación de una única etapa. Los andamiajes deberían ser fuertes y duraderos, pero también flexibles para permitir: a) una apertura y un cierre apropiados en el caso de una válvula cardíaca, o b) una deformación elástica que sigue al corazón latiente que se deforma en el caso de una arteria coronaria o parche cardíaco. Además, las derivaciones diabéticas deberían permitir una punción repetida para la diálisis. Los requisitos de rendimiento hemodinámico y durabilidad han sido definidos en las normas ISO, por ejemplo, para válvulas de corazón bioprotésicas en relación al área efectiva del orificio, cantidad de regurgitación, gradientes de presión sistólica media y máxima, así como durabilidad [Norma EN ISO 5840:2006 Cardiovascular Implants Cardiovascular prostheses].

Además del rendimiento hemodinámico, los andamiajes deberían proporcionar el entorno micro-mecánico apropiado para permitir la diferenciación celular o la conservación de fenotipo y la maduración de tejido in vivo

apropiadas. Además, el andamiaje debería promover la formación de las arquitecturas de colágeno que se encuentran en las válvulas del corazón y las arterias de pequeño diámetro. En opinión de los presentes inventores, es la combinación específica de nano y microfibras que proponen los presentes inventores la que puede cumplir todos los requisitos necesarios.

5

Por lo tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento para producir una preforma por medio de un procedimiento de electrohilado, que comprende las etapas de:

10

a) proporcionar un molde que comprende al menos dos submolde, cuyos submolde comprenden, de manera sustancialmente exclusiva, superficies convexas;

15

b) aplicar al menos una capa de nano o microfibras a la superficie de al menos uno de los submolde de la etapa a) mediante electrohilado;

c) combinar al menos dos submolde seleccionados de entre los submolde de la etapa a) y los submolde de la etapa b);

20

d) aplicar al menos una capa de nano o microfibras a la superficie del conjunto de la etapa c) mediante electrohilado para obtener la preforma, en el que la preforma comprende al menos una capa de nanofibras y al menos una capa de microfibras, en el que el tamaño de poro de la al menos una capa de microfibras está comprendido en el intervalo 1 - 300 micrómetros y en el que el tamaño de poro de la al menos una capa de nanofibras está comprendido en el intervalo 1 - 300 micrómetros.

25

La ventaja de este procedimiento es que es posible obtener una preforma que tiene una forma tridimensional deseada (compleja), usando un procedimiento de electrohilado, mediante la conversión de la forma tridimensional deseada en un molde, cuyo molde se subdivide en una serie de submolde. Dichos submolde tienen una configuración espacial de manera que, además de las partes planas normales, comprenden, de manera sustancialmente exclusiva, superficies convexas.

30

Cuando una capa de fibras es aplicada, por medio de un procedimiento de electrohilado, a un objetivo que tiene una forma tridimensional compleja, concretamente, partes convexas, cóncavas y planas, se producen problemas en la formación de la capa de fibras, ya que parece que no es posible formar una capa de fibras uniforme debido a la formación de fibras adicionales entre los bordes cóncavos del molde. De esta manera, es difícil proporcionar dichas superficies cóncavas con una capa de fibras uniforme, cuya capa de fibras uniforme es altamente deseable en la práctica.

35

El problema indicado anteriormente se resuelve mediante las etapas a) -d) del presente procedimiento, en el que la misma presencia de superficies cóncavas se evita subdividiendo el molde en una serie de submolde, cuyos submolde están construidos de manera que los submolde no tengan ninguna forma cóncava, sino que comprenden, de manera sustancialmente exclusiva, superficies convexas, además de las partes planas normales.

40

Los diversos submolde que constituyen el molde, están construidos de manera que puedan ser combinados para formar el molde. Los submolde tienen una o más superficies que son contiguas a una o más superficies de los otros submolde, de manera que dichos submolde encajen entre sí de manera que formen conjuntamente el molde.

45

Debido a que las preformas que se usan frecuentemente en la práctica tienen superficies cóncavas, así como convexas, no ha sido posible hasta ahora producir dichas preformas tridimensionales complejas proporcionadas con capas de fibras uniformes recubriendo el molde por medio de un procedimiento de electrohilado.

50

Es posible obtener las preformas deseadas subdividiendo el molde en una serie de submolde, cada uno de cuyos submolde comprende principalmente superficies convexas además de las partes planas normales que ya están presentes. Posteriormente, dichos submolde pueden ser provistos por separado con capas de fibras en una o más etapas, después de lo cual los submolde provistos de capas de fibras pueden ser unidos entre sí y, en su conjunto, pueden ser provistos de una capa de fibras adicional a fin de reforzar el conjunto.

55

Los submolde están realizados en un material que es adecuado para su uso con electrohilado, tal como un metal.

60

Los submolde pueden ser sólidos o parcialmente huecos. Si los submolde son parcialmente huecos, pueden tener una superficie exterior cerrada. Los submolde o el molde pueden estar provistos de una o más aberturas, en cuyas aberturas pueden ajustarse soportes, por ejemplo, cuyos soportes pueden ser usados para posicionar correctamente los submolde o el molde durante el procedimiento de electrohilado. Sin embargo, pueden usarse también otros materiales adecuados. Pueden usarse submolde huecos o submolde que comprenden canales u orificios con el fin de permitir la refrigeración del submolde para condiciones de crio-hilado.

Las capas de fibras se aplican a la superficie del submolde/molde, cuya superficie se entiende que es la superficie exterior del submolde/molde.

5 Ahora, la presente invención se explicará más detalladamente con referencia a los dibujos, que muestran realizaciones especialmente preferidas de la presente invención. Se fabrica una preforma, entre otras cosas, funciona como un molde para una válvula cardíaca (Figuras 4-6). Los dibujos muestran un molde para una válvula cardíaca que comprende tres membranas; según la invención, sin embargo, pueden producirse también otros tipos de válvulas que comprenden más o menos membranas.

10 La Figura 4a muestra tres submoldes 1, cada uno de los cuales comprende una superficie 2 superior y dos superficies 3 de contacto, cada uno de cuyos submoldes es provisto por separado de una capa de fibras por medio de un procedimiento de electrohilado. Dichos tres submoldes 1 están contruidos de manera que comprenden, de manera sustancialmente exclusiva, superficies convexas, además de las superficies planas normales. Debería entenderse que el submolde 1 no tiene ninguna superficie cóncava, de manera que dicho electrohilado dará lugar a una capa de fibras uniforme. Los submoldes 1 están configurados para encajar entre sí para formar el molde.

15 La Figura 4b es una vista en sección de los tres submoldes 1 de la Figura 4a, que muestra los submoldes después de que una capa 4 de fibras ha sido aplicada a cada uno de los submoldes 1 individuales. Posteriormente, los submoldes 1 han sido combinados en un conjunto 5 colocando las superficies 3 de contacto apoyadas una en la otra. La parte 6 se denomina la superficie de cooptación, que es muy importante en la obtención de una válvula cardíaca artificial que funciona apropiadamente. El hecho es que dicha una superficie de cooptación asegura que las membranas se apoyarán correctamente entre sí después de la incubación de la preforma con células humanas o animales a fin de obtener la válvula cardíaca biológica final. Debido a que puede producirse un cierto grado de encogimiento de la preforma durante la incubación, es importante que haya un borde adicional (la superficie cooptación) sobre las membranas, de manera que dichas superficies 6 de cooptación puedan prevenir la formación de aberturas entre las membranas cuando se produce la contracción, cuyas aberturas podrían conducir a una válvula cardíaca con fugas. Dicha una superficie de cooptación no se obtiene si se usa un solo molde para una válvula cardíaca en lugar de tres submoldes 1 según la presente invención.

20 La Figura 5a muestra el conjunto 5 de submoldes 1 provisto de una capa de fibras (no mostrada). El conjunto 5 se mantiene unido por medio de una construcción 7 de anillo pero, por supuesto, también es posible usar otros procedimientos convencionales. Además, se muestra un submolde 8 complementario, que puede ser colocado en el extremo del conjunto 5 con un ajuste estrecho y preciso.

25 Todo el molde de la válvula cardíaca mostrada en la Figura 5b consiste en el conjunto 5 de tres submoldes 1 provistos de una capa de fibras, una construcción 7 de anillo y el submolde 8. En una etapa (d) siguiente del procedimiento, todo el molde será provisto de una capa 9 de fibras mediante electrohilado.

30 La Figura 5c es una vista en sección del molde después de la etapa c), que muestra los submoldes 1, 8 con superficies 2 superiores y capas 4, 9 de fibras. La Figura muestra, además, la superficie 6 de cooptación, que forma parte de la capa 4 de fibras, las membranas 10, que forman parte asimismo de la capa 4 de fibras, cuyas membranas 10 están formadas sobre las superficies 2 superiores de los submoldes 1.

35 Las Figuras 6a y 6b son vistas de la preforma obtenida de esta manera después de que los submoldes 1, 8 han sido retirados. Dichos submoldes pueden ser retirados cuidadosamente de la capa o las capas de fibras, uno a uno. Dicha retirada puede tener lugar manualmente, por ejemplo. Además, parte de las capas 4 de fibras sobre las superficies 3 de contacto internas es retirada, con la excepción de la superficie 6 de cooptación, que se mantiene. La Figura 6a es una vista en planta superior y la Figura 6b es una vista lateral de la preforma después de que los submoldes 1, 8 han sido retirados, que muestra las membranas 10, la capa 4 de fibras (línea continua) y la capa 9 de fibras (línea de puntos), mientras que la Figura 6b muestra también la superficie 6 de cooptación.

40 Aunque la presente invención ha sido explicada en base a realizaciones preferidas, también es posible usar la presente invención para producir otras preformas a ser usadas en la producción de implantes para otras partes del cuerpo, tales como otras válvulas en el corazón o vasos sanguíneos, o partes de articulaciones, por ejemplo, una rótula, etc.

45 Las realizaciones adicionales se describen en las reivindicaciones adjuntas.

50

REIVINDICACIONES

- 5 1. Preforma multicapa obtenida mediante electrohilado, cuya preforma es adecuada como un andamiaje para una prótesis, cuya preforma comprende al menos una capa de microfibras y al menos una capa de nanofibras, caracterizada por que el tamaño de poro de la al menos una capa de microfibras está comprendido en el intervalo 1 - 300 micrómetros y por que el tamaño de poro de la al menos una capa de nanofibras está comprendido en el intervalo 1 - 300 micrómetros, preferiblemente el tamaño de poro de la al menos una capa de microfibras y/o la al menos una capa de nanofibras está comprendido entre 5 y 100 micrómetros
- 10 2. Preforma según la reivindicación 1, en la que el tamaño de poro de todas las capas de la preforma está comprendido entre 1 y 300 micrómetros, preferiblemente entre 5 y 100 micrómetros.
- 15 3. Preforma según una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que el diámetro de las microfibras está comprendido en el intervalo de 3 a 20 micrómetros, preferiblemente de 5 a 18 micrómetros y, en particular, de 8 a 14 micrómetros.
- 20 4. Preforma según una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que el diámetro de las nanofibras está comprendido en el intervalo de 50 a 800 nanómetros, preferiblemente al menos 200 nanómetros y, en particular, al menos 400 nanómetros, preferiblemente no más de 700 nanómetros y, en particular, no más de 600 nanómetros.
- 25 5. Preforma según una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que la porosidad de la capa de microfibras y/o la capa de nanofibras está comprendida en el intervalo del 70 al 95%.
- 30 6. Preforma según una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que la preforma tiene un número infinito de capas que tienen un gradiente de diámetros.
- 35 7. Procedimiento para producir una preforma mediante electrohilado, adecuada como un andamiaje para una prótesis, caracterizado por que el procedimiento comprende las etapas de proporcionar un molde y posteriormente aplicar, en orden aleatorio, mediante electrohilado al menos una capa de microfibras y al menos una capa de nanofibras, en el que el tamaño de poro de la al menos una capa de microfibras está comprendido en el intervalo de 1-300 y el tamaño de poro de la al menos una capa de nanofibras está comprendido en el intervalo 1-300.
- 40 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la etapa de electrohilado de la al menos una capa de nanofibras se lleva a cabo a una temperatura por debajo de 220 K.
- 45 9. Procedimiento según una o más de las reivindicaciones 7 - 8, en el que el procedimiento comprende las etapas de proporcionar posteriormente un molde, electrohilar al menos una capa de nanofibras y, posteriormente, electrohilar al menos una capa de microfibras.
- 50 10. Procedimiento según una o más de las reivindicaciones 7 - 9, en el que no se incorporan células de mamífero a la preforma durante el electrohilado.
- 55 11. Uso de una preforma según una o más de las reivindicaciones 1 - 6 o una preforma obtenida según uno o más de los procedimientos según las reivindicaciones 7 - 10 como un sustrato para cultivar tejido humano o animal.
- 60 12. Uso según la reivindicación 11, caracterizado por que la preforma es un sustrato para cultivar una válvula cardíaca, uno o más vasos sanguíneos o una conexión de los mismos o un parche cardíaco.
13. Procedimiento para producir una preforma por medio de un procedimiento de electrohilado, que comprende las etapas de:
- a) proporcionar un molde constituido por al menos dos submolde, cuyos submolde comprenden, de manera sustancialmente exclusiva, superficies convexas;
 - b) aplicar al menos una capa de nano o microfibras a la superficie de al menos uno de los submolde de la etapa a) mediante electrohilado;
 - c) combinar al menos dos submolde seleccionados de entre los submolde de la etapa a) y los submolde de la etapa b);
 - d) aplicar al menos una capa de nano o microfibras a la superficie del conjunto de la etapa c) mediante electrohilado para obtener la preforma, en el que la preforma comprende al menos una capa de nanofibras y al menos una capa de microfibras, en el que el tamaño de poro de la al menos una capa de microfibras está comprendido en el intervalo 1 - 300 micrómetros y en el que el tamaño de poro de la al menos una capa de nanofibras está comprendido en el intervalo 1 - 300 micrómetros.

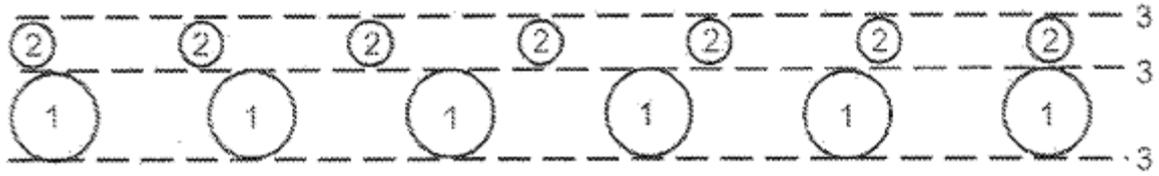


Figura 1

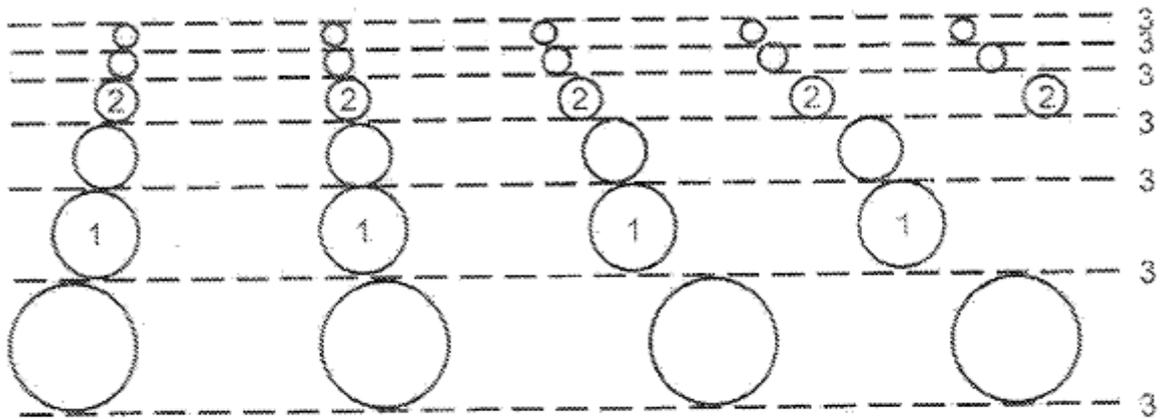


Figura 2

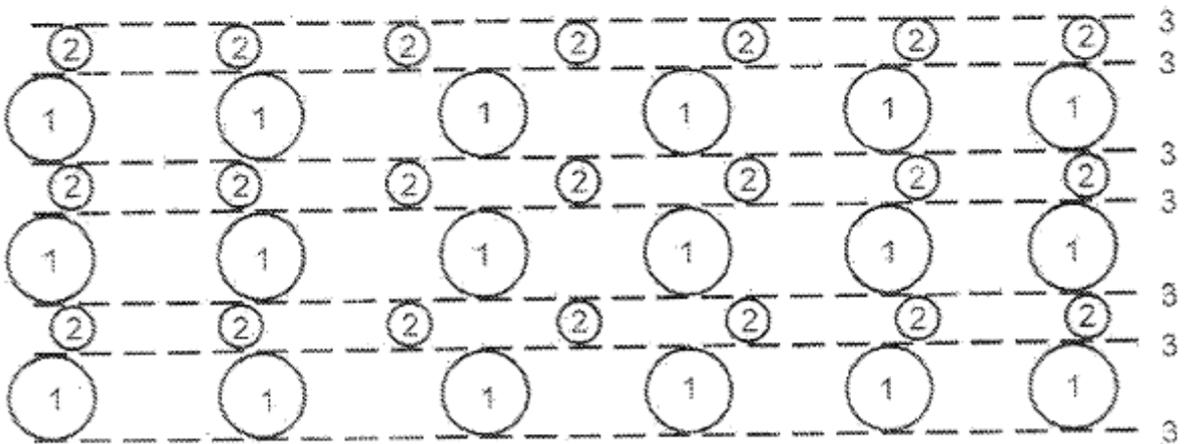
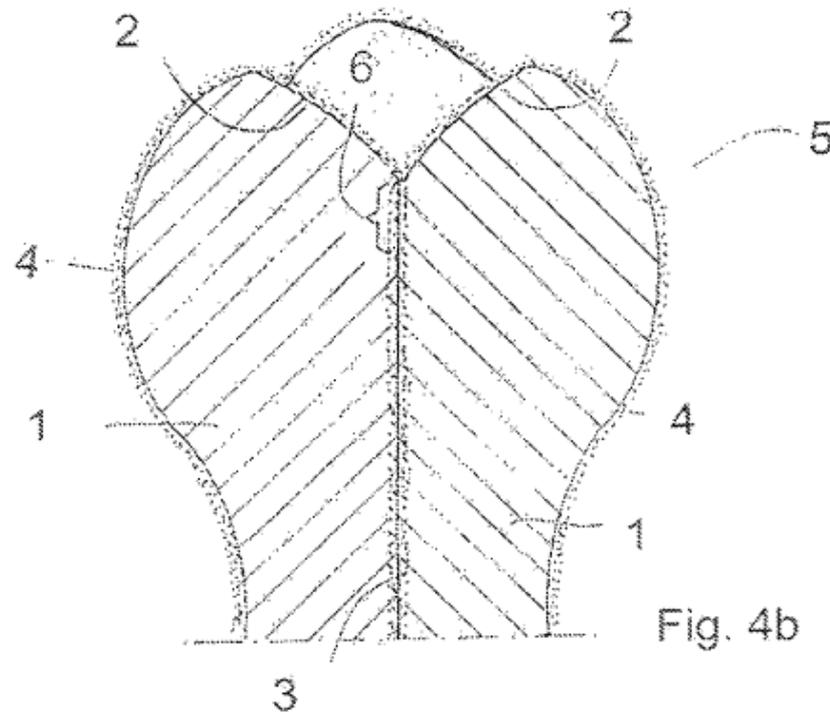
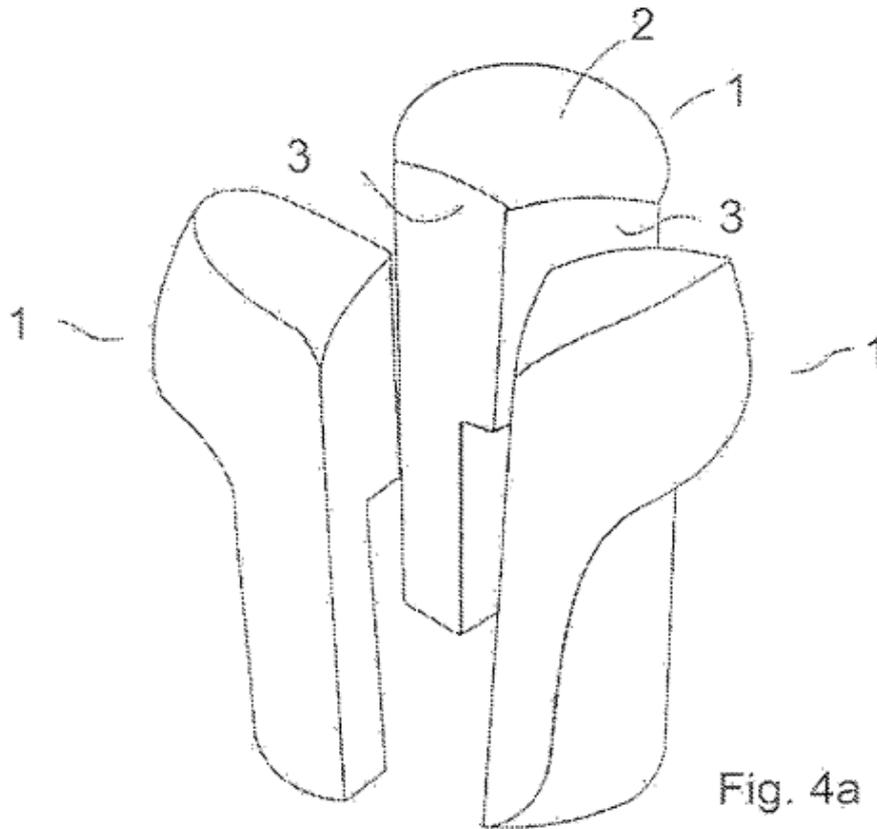
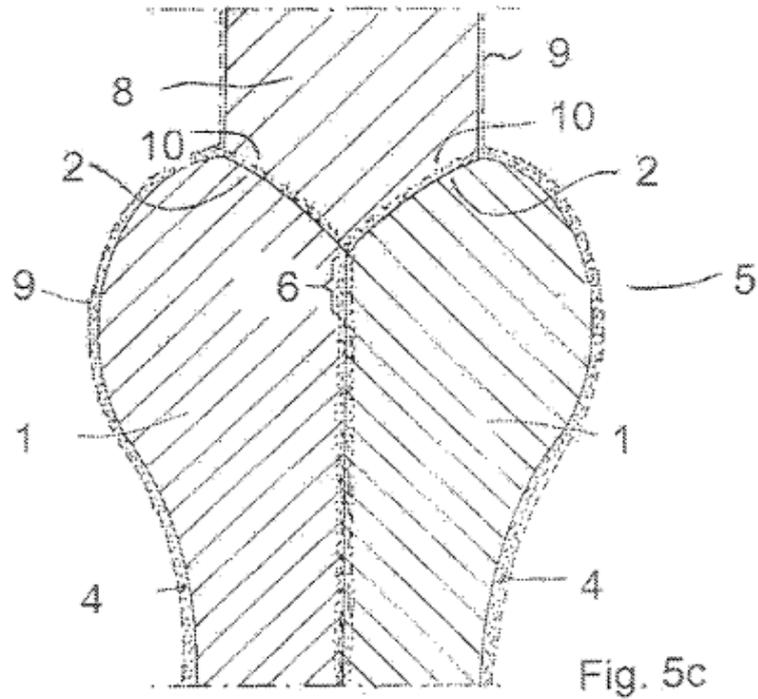
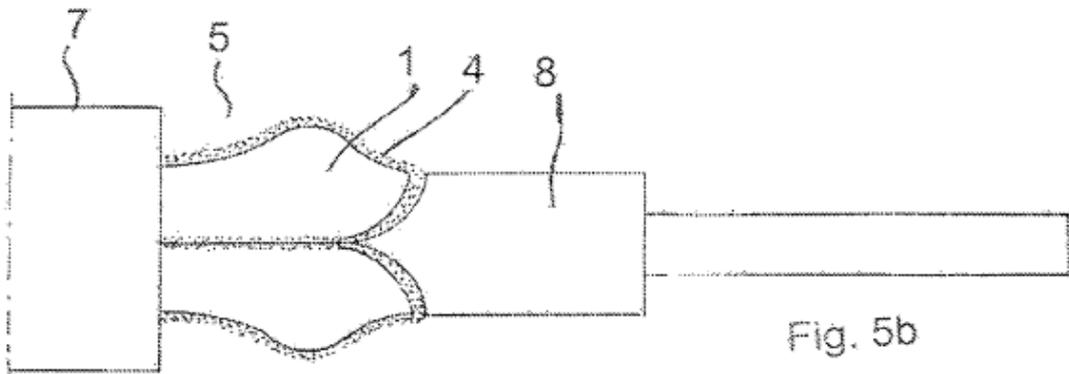
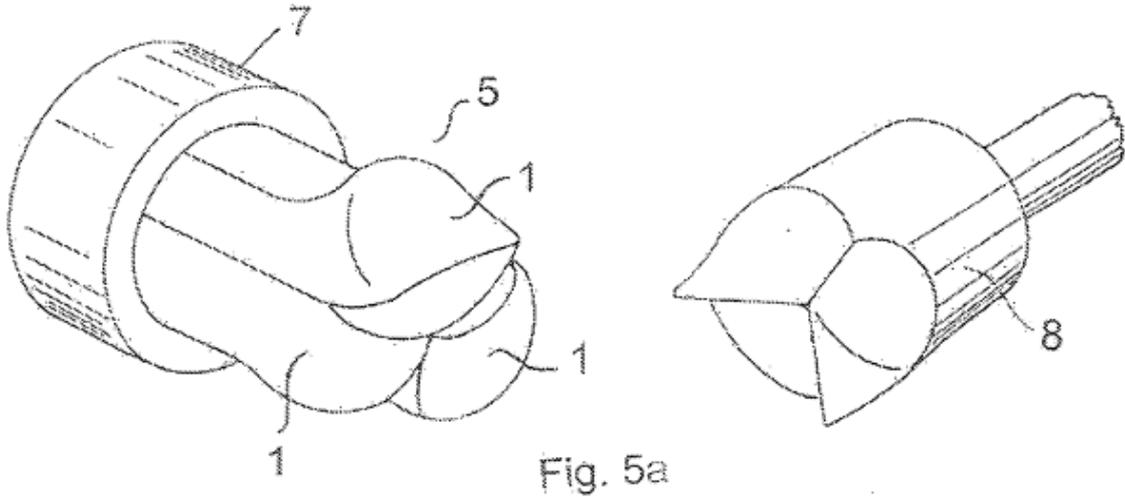
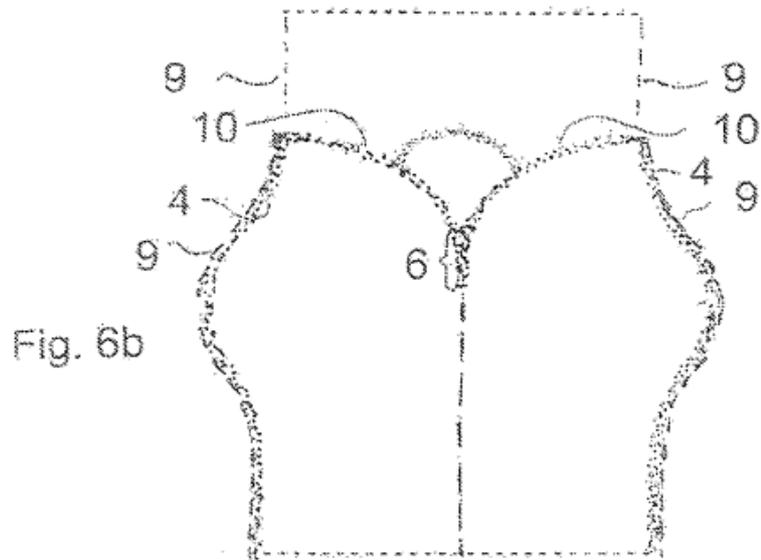
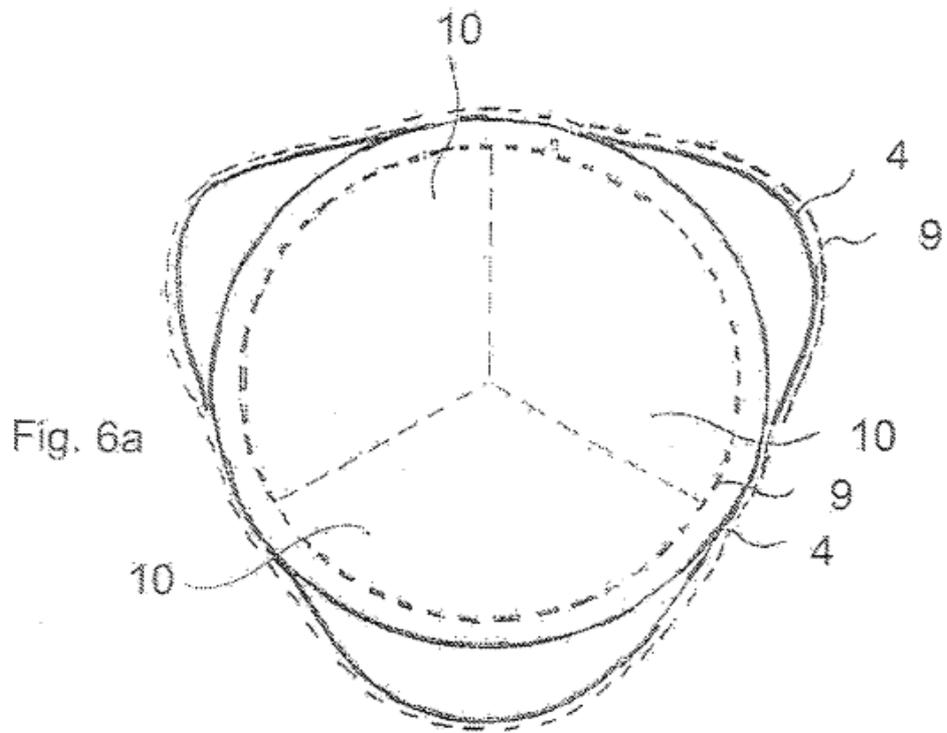


Figura 3







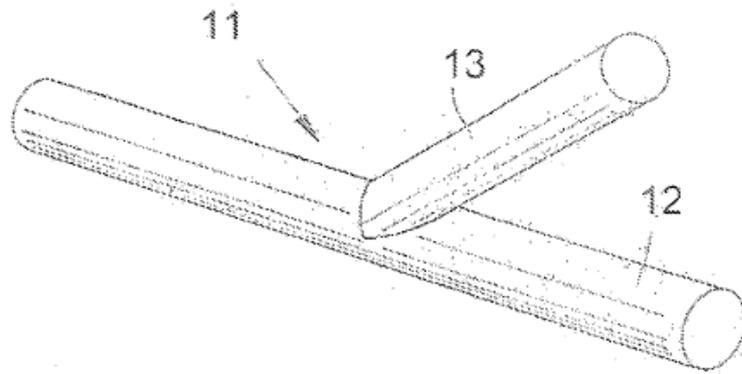


Fig. 7a

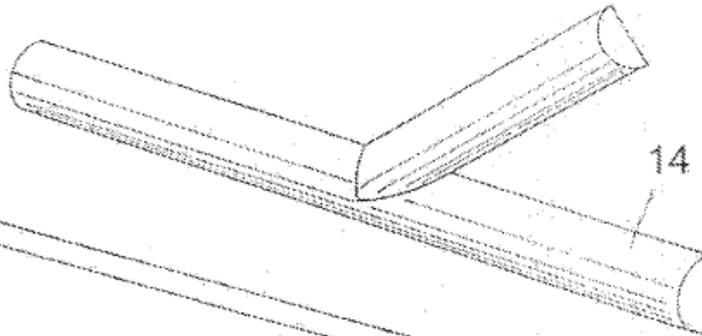


Fig. 7b

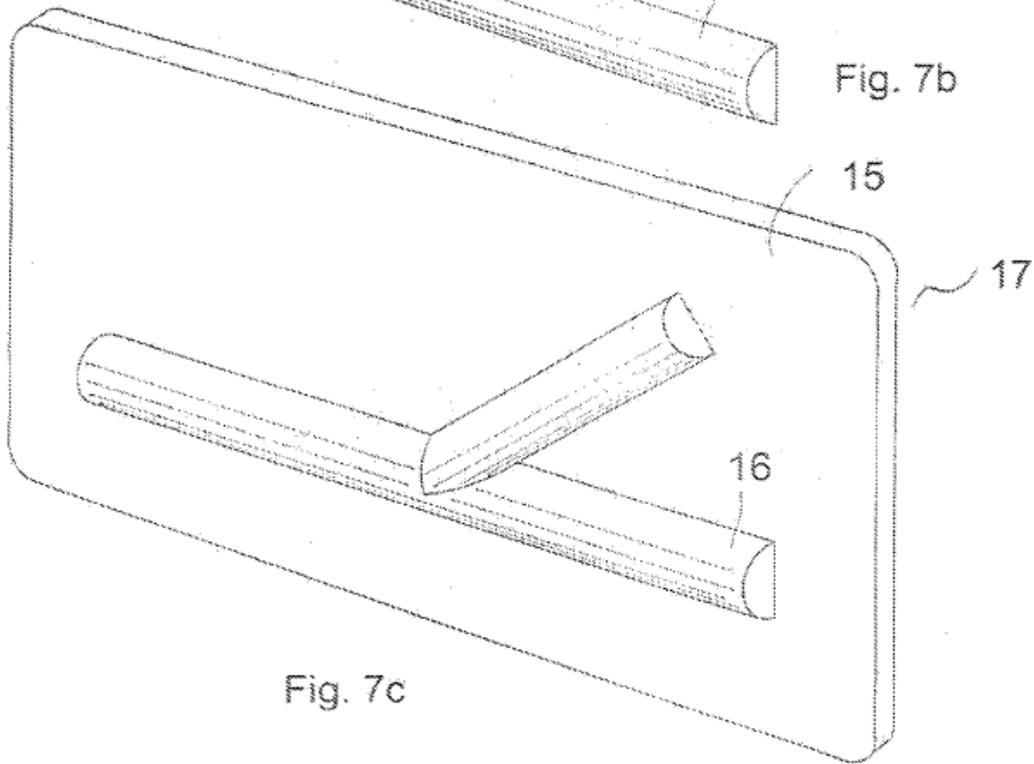


Fig. 7c

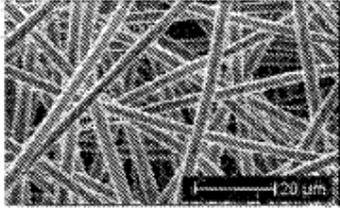
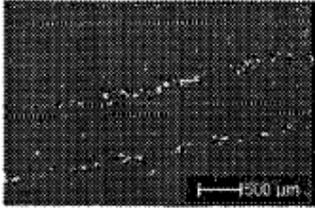
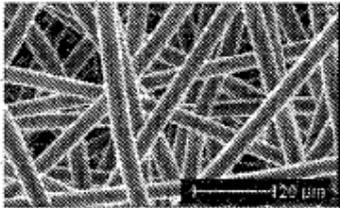
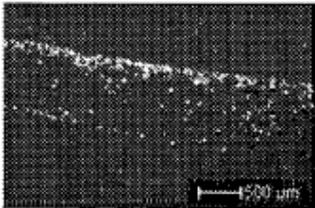
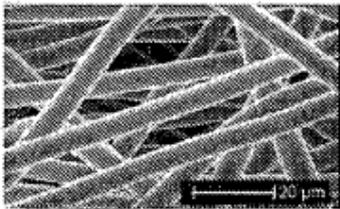
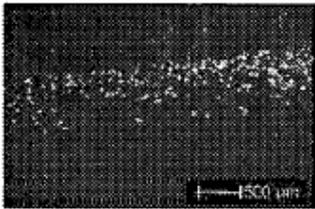
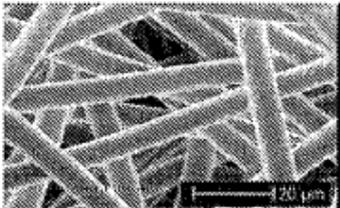
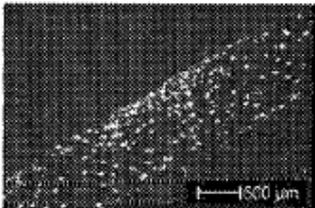
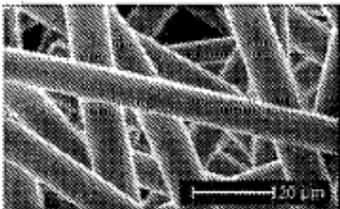
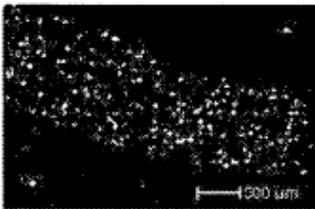
Diámetro de fibra [μm]	Tamaño de poro [μm]	Apariencia macroscópica	Visualización del crecimiento hacia el interior de las células	Calificación del crecimiento hacia el interior de las células
< 1	<10	N.A.	N.A.	Imposible
3,4	~15			Pobre/ imposible
5,0	~22			Pobre
6,7	~27			Razonable
8,7	~35			Buena
12,1	~50			Buena
> 30	>200	N.A.	N.A.	Pobre; dificultad para retener las células

Tabla 1