

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 705**

51 Int. Cl.:

A61L 27/18 (2006.01)
A61L 27/34 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/50 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2012 PCT/EP2012/068648**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014 WO14044321**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2012 E 12761998 (9)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2897659**

54 Título: **Nueva estructura para parche cardíaco**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.02.2017

73 Titular/es:
TECNOLOGIAS AVANZADAS INSPIRALIA S.L. (25.0%)
Calle Estrada 10B 5 planta
28034 Madrid, ES;
THE UNIVERSITY OF MANCHESTER (25.0%);
INSTITUTUL DE CHIMIE MACROMOLECULARA
PETRU PONI (25.0%) y
USTAV EXPERIMENTALNI MEDICINY AKADEMIE
VED CESKE REPUBLIKY, V.V.I. (25.0%)

72 Inventor/es:
SAINT-PIERRE, GUILLAUME;
HERRERO GOMEZ, MIGUEL;
MARTINEZ CRESPIERA, SANDRA;
SAIANI, ALBERTO;
MERRY, CATHERINE;
MEADE, KATE;
GUILBAUD, JEAN-BAPTISTE;
MILLER, ALINE FIONA;
CIOBANU, CONSTANTIN y
AMLER, EVZEN

74 Agente/Representante:
PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 599 705 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

Nueva estructura para parche cardíaco

5 **Antecedentes de la invención**

La enfermedad cardiovascular (CVD) es un problema de salud importante y la causa principal de muerte en el mundo occidental. En Reino Unido, por ejemplo, CVD representa 238.000 muertes, comprendiendo el 39 % de todas las muertes por año (Jawad *et al.* J Tissue Eng. Regen. Med. 2007, 1, 327). Los ataques cardíacos son la causa principal de muerte en pacientes con CVD. Aproximadamente el 30 % de los 270.000 pacientes que padecen ataques cardíacos cada año mueren repentinamente antes de alcanzar el hospital. El corazón adulto no puede reparar el tejido dañado, ya que los cardiomiocitos de maduros de contracción son incapaces de dividirse. El resultado del infarto de miocardio es la formación de tejido cicatricial con diferentes propiedades contráctiles, mecánicas y eléctricas a las del miocardio normal, que es incapaz de suministrar suficiente sangre para cumplir las necesidades metabólicas del organismo.

Existe un gran interés en el desarrollo de nuevos métodos para reparar y regenerar el área infartada del miocardio. Se ha propuesto el remplazo de tejido cicatrizado con células de músculo esquelético, células derivadas de médula ósea (mesenquimáticas y hematopoyéticas) o células madre embrionarias (ESC) (Laflamme, M.A. y Murry, C.E. Nature Biotechnology 2005 23, 845). Actualmente, el método preferido de introducción de estas células en el miocardio muerto es inyección de células en suspensión a la sangre en circulación o directamente en el miocardio. La vía de suministro celular es en principio ineficaz con pérdida sustancial de células (Hofmann M.; *et al.* Circulation 2005, 111, 2198; Grossman P.M.; *et al.* Catheterization and cardiovascular interventions 2002, 55, 392). Esto ha impulsado la búsqueda de técnicas alternativas de suministro para las células, tales como ingeniería tisular (TE).

La ingeniería tisular de miocardio (MTE), un concepto que pretende prolongar las vidas de los pacientes después de infarto de miocardio restaurando la función del miocardio, está mejorando continuamente.

Se han sugerido muchos tipos diferentes de células para terapia celular e ingeniería tisular de miocardio. Estas incluyen células madre tanto autólogas como embrionarias. Los biomateriales sugeridos para esta aplicación de ingeniería tisular específica tienen que ser biocompatibles con las células cardíacas y tener propiedades mecánicas particulares que cumplan las del miocardio nativo de modo que las células donantes suministradas se integren y permanezcan intactas *in vivo*.

El objetivo de la ingeniería tisular cardíaca (CTE) es reparar o regenerar una sección dañada del corazón. CTE implica la síntesis de una estructura o parche hecho de un biomaterial combinado con células.

En una perspectiva de terapia celular, la función principal del biomaterial es actuar como vehículo para el suministro de células al área dañada, es decir, tejido cicatrizado. Una vez las células se han suministrado a la región deseada, las células deben integrarse con el tejido hospedador formando nuevo miocardio.

La investigación de biomateriales es una materia amplia y se están buscando continuamente biomateriales candidatos adecuados para parches CTE. Se ha propuesto una gran diversidad de polímeros sintéticos y naturales, así como materiales compuestos, para CTE.

Para centrarse en el enfoque de parche cardíaco, una proporción significativa de la población de pacientes desarrolla agrandamiento del ventrículo izquierdo (LV) a pesar de los recientes progresos en perfusión coronaria y terapias médicas basadas en fármacos. Esta situación está provocada por el proceso de remodelado después de infarto de miocardio (MI) (Bolognese, L.; Neskovic, A. N.; Parodi, G.; Cerisano, G.; Buonamici, P.; Santoro, G. M. Circulation 2002; 106:2351-7, Savoye, C.; Equine, O.; Tricot, O.; Nugue, O.; Segrestin, B.; Sautiere K. Am J Cardiol 2006; 98, 1144-9., y Pfeffer, M. A.; Braunwald, E. Circulation, 1990; 81:1161-72). El remodelado del LV pos-MI está asociado con cambios de mala adaptación del miocardio en áreas tanto infartadas como no infartadas (Pfeffer, M.A.; Braunwald, E. Circulation 1990; 81, 1161-72), provocando agrandamiento del LV y alteración de la función sistólica, que a su vez aumenta el riesgo de fallo cardíaco seguido por muerte ((Pfeffer, M. A.; *et al.* Circulation 1994; 89, 6875 y Pfeffer, M.A., *et al.* Circulation 1994, 89, 6875).

Se han propuesto diferentes enfoques quirúrgicos para reducir el volumen de la cavidad del LV (Dor, V.; *et al.* J. Thorac. Cardiovasc. Surg 1998; 116, 50-9) o restringir su agrandamiento adicional (Batista, R. J.; *et al.* Ann Thorac Surg 1997, 64, 634e8.), para pacientes que padecen insuficiencia cardíaca (HF) refractaria por dilatación y disfunción severa del LV. De un modo general, estos métodos se basan en cirugía reconstructiva mayor o implican encapsulación de extensión (contención) del epicardio.

Se ha demostrado que un parche cardíaco implantado después de MI puede presentar remodelado del LV y mejora definitivamente el rendimiento cardíaco.

65

Usando un polipropileno/politetrafluoroetileno expandido (PP/PTFE) biocompatible de dos capas, Hung Fat Tse *et al.* (J Am College Cardio, 2010, 58, 590-598) validaron la necesidad de un concepto de parche cardiaco, mediante el cual se emplea un parche epicárdico sintético pasivo simple para aumentar el grosor de la pared del LV en la región del infarto, atenuar la dilatación del LV y mejorar la fracción de expulsión ventricular (LVEF) en un modelo de animal grande de MI crónico.

Inicialmente presentado como vector para terapia celular, la utilización del parche cardiaco como biomaterial se ha movido hacia la terapia acelular mediante lo cual el dispositivo está previsto como dispositivo médico que proporciona soporte médico como modo principal de acción, donde el microentorno y la arquitectura ofrecen ventajas adicionales tales como diferenciación celular, organización y prevención de anoikis (Sarig, U., Machluf, M. Expert Opin Biol Ther 2011, 11,1055-77). Sin embargo, la limitación principal actual sigue siendo el transporte de nutrientes controlado por difusión a través de la estructura y transestructura.

Entre los diferentes materiales propuestos para la fabricación de dicho dispositivo, se ha usado ampliamente el colágeno, como se presenta en la subsección de polímeros en CTE. Dicha estructura proteica es compatible en el proceso de angiogénesis (Callegari, A.; *et al.* Biomaterials 2007, 28, 5449-61.), y terapia celular (Pozzobon, M., *et al.* Cell transplantation 2010, 19, 1247-6).

Los órganos descelularizados (Ott, H. C., *et al.* Nat Med 2008, 14, 213-21 y Godier-Furnémont, A. F., *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108, 7974-9.), también se han propuesto para la creación de parches cardiacos. A pesar de la cantidad limitada de estudios usando una estructura derivada de órganos en el corazón, hasta la fecha, el ejemplo del uso de válvula aórtica bovina descelularizada en terapia de remplazo de válvula cardiaca sugiere una rápida expansión de las estructuras descelularizadas en ingeniería tisular.

Aparte de los materiales biológicamente obtenidos, se han explorado varios materiales sintéticos, tales como poliéster uretano biodegradable (Fujimoto, K. L., *et al.*, J Am Coll Cardiol, 2007, 49, 2292-300) o poli(glicólido-caprolactona) (Piao, H.; *et al.* Biomaterials 2007, 28, 641-9) para terapia celular y acelular. A pesar de ser elástico con el entorno funcional en que se prevé que funcionen, la funcionalidad de la estructura para proporcionar señales biológicas aún es un centro de debate ya que debería tenerse en consideración la biodisponibilidad del agente inmovilizado y su perfil de concentración sobre la arquitectura supramolecular.

El documento WO 2011/134957 A1 describe un implante bioactivo para regeneración del miocardio y restauración de la cámara ventricular que comprende una membrana microporosa elastomérica que comprende al menos un polímero no degradable y al menos un polímero parcialmente degradable, un hidrogel de nanofibras hecho de péptidos de autoensamblaje y células.

Las estructuras más blandas tales como hidrogeles también se han propuesto para terapias acelulares, sistema de suministro de fármacos y vector de soporte para el suministro de células e ingeniería tisular cardiaca *in vitro* (Ye, Z.; *et al.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2011, 63, 688-697). Se considera que dichos tipos de biomateriales proporcionan un entorno químico y físico tipo matriz extracelular (ECM) por tanto, ofreciendo de ese modo un recurso apropiado para mejorar la retención, supervivencia y función de células cardiogénicas trasplantadas y reclutadas (Davis, M. E.; *et al.* Circ. Res. 2005, 97, 8-15 y Jawad, H.; *et al.* Br. Med. Bull. 2008, 87, 31-47). De hecho, un gel 3D puede representar un sistema de cultivo avanzado para expansión celular *in vitro* y la inducción de diferenciación cardiogénica, donde la diferenciación cardiogénica de células madre puede suceder a través de la aparición de señales bioquímicas, topográficas y físicas. Aunque se ha propuesto poli(N-isopropilacrilamida) (PNiPAm) para ingeniería de láminas celulares *in vitro* (Jawad, H., *et al.* Br. Med. Bull. 2008, 87, 31-47), se han evaluado otros polímeros tales como colágeno, fibrina, alginato y PEG y péptidos por su capacidad para formar hidrogeles en terapia de células cardiacas/ingeniería tisular.

Aunque los hidrogeles proporcionan nuevas posibilidades para abordar ciertas cuestiones, tales como controlar la diferenciación de células madre en experimentos *in vitro* e *in vivo* a través del procedimiento de funcionalización de una estructura simple tal como atrapamiento y creación de un gradiente de concentración de agente de señalización celular y suministro celular, su éxito en ingeniería tisular cardiaca, hasta ahora, ha estado limitado debido a las débiles propiedades mecánicas asociadas para permitir que dicha arquitectura resista el entorno del latido *in vivo* y el posible lavado completo debido a exposición a fluidos corporales (Freed, L. E.; *et al.* Adv. Mater. 2009, 21, 3410-3418).

Por lo tanto, sería deseable desarrollar un "vehículo" basado en biomaterial, basado en una estructura porosa o parche denso, hecho de materiales poliméricos naturales o sintéticos para ayudar al transporte de células a la región enferma en el corazón.

Sumario de la invención

La presente invención, definida en las reivindicaciones, se refiere a una arquitectura multiestratificada orientada principalmente como un dispositivo médico desarrollado para refuerzo estructural de un tejido blando dañado. Comprende una base de poliuretano porosa y una estructura porosa gruesa basada en compuestos de polímeros de

poli(ε-caprolactona)/naturales. Se combina con geles autoensamblados compuestos de, aunque sin limitación, péptidos y poliuretanos. La aplicación del dispositivo es útil en terapia celular.

Descripción de la invención

5 Un aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende:

- 10 a)- una estructura biocompatible y biodegradable que comprende polímeros sintéticos y naturales, donde el polímero sintético se selecciona de ácido poliláctico, ácido glicólico, lactona, sebacato de poliglicerol, copolímero de polímeros sintéticos y combinaciones de los mismos, y donde el polímero natural se selecciona de quitosano, alginato sódico y celulosa;
- 15 b)- un hidrogel que comprende péptidos de autoensamblaje, donde los péptidos de autoensamblaje se seleccionan de FEFEFKFK (SEQ ID NO: 1), VEVEVKVK (SEQ ID NO: 2), PGSPFEFEFKFK (SEQ ID NO: 3), IGF-FEFEFKFK (SEQ ID NO: 4) y combinaciones de los mismos; y
- c)- un soporte que comprende poliuretano.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la composición definida anteriormente para su uso en terapia.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a la composición definida anteriormente para su uso en el tratamiento de un paciente con legrado o tratamiento de infarto transmural, preferiblemente en el tratamiento de infarto de miocardio y más preferiblemente donde el tratamiento comprende regeneración del tejido cardiaco.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la composición definida anteriormente para metidos *in vitro*.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un parche cardiaco que comprende la composición definida anteriormente.

30 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un parche cardiaco que comprende la composición definida anteriormente para su uso en el tratamiento de infarto de miocardio.

En este documento se describe un proceso para obtener la composición definida anteriormente que podría comprender:

- 35 i.- mezcla en fusión donde todos los componentes orgánicos o inorgánicos se mezclan juntos en un Haake;
- ii.- tratamiento con ácido fluorhídrico; disolución mediada de porógeno de vidrio seguido por lavado minucioso para la neutralización del pH de la estructura
- iii.- retirada del ácido
- 40 iii.- introducción del péptido de autoensamblaje en los polímeros por gravedad o centrifugación o impregnación simple;
- iv.- secado; y
- v.- esterilización.

45 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un proceso para obtener la composición definida anteriormente que podría comprender:

- i. disolución del material
- ii. moldeado por disolvente y precipitación en frío
- 50 iii. extracción del disolvente
- iv. introducción del péptido de autoensamblaje en los polímeros por centrifugación o gravedad
- iv. secado; y
- v. esterilización.

55 En una realización preferida, el proceso descrito anteriormente comprende adicionalmente - producción de fibras, por electrohilado; y deposición de las fibras electrohiladas en los polímeros por electrohilado coaxial, donde estas etapas se realizan entre las etapas (i) y (ii).

60 Otra realización descrita es un proceso para obtener la composición definida anteriormente que comprende una congelación/inversión de fase. En una realización preferida, el proceso descrito anteriormente comprende adicionalmente - producción de fibras por electrohilado; y deposición de las fibras electrohiladas en los polímeros por electrohilado coaxial, donde estas etapas se realizan entre las etapas (i) y (ii).

65 También se describe un método para tratar a un paciente con infarto de miocardio que consiste en el implante del parche cardiaco, como se ha definido anteriormente, en el pericardio del corazón, preferiblemente en la superficie del pericardio del corazón por sutura del soporte o a través del pericardio del corazón y el miocardio por sutura del soporte.

A lo largo de la descripción de la presente invención, el término "estructura" se refiere a una plataforma de material diseñado por ingeniería que puede formarse en la forma del tejido que necesita remplazarse (como un ejemplo, un manguito rotador). La estructura puede obtenerse biológicamente o ser un material sintetizado. El material de la estructura puede ser biológicamente compatible para implante en seres humanos. La estructura normalmente se impregna (siembra) con las células de un paciente antes de su implante. La estructura debe diseñarse para (degradarse) según las células crecen sobre la estructura. Normalmente, en varios meses, la estructura ha desaparecido y se ha remplazado por tejido nuevo.

Una estructura es, por lo tanto, una construcción 3D que sirve como soporte temporal para que células aisladas crezcan en tejido nuevo *in vitro*, es decir, antes de su trasplante de vuelta al hospedador o *in vivo*, es decir, una vez implantada.

El diseño de la estructura determina la funcionalidad de la construcción en gran medida. Aunque las necesidades finales dependen del propósito específico de la estructura, tienen que considerarse varias características generales y necesidades para todos los diseños.

La estructura debe ser:

- biocompatible; la estructura debe provocar una respuesta biológica apropiada en una aplicación específica y evitar cualquier respuesta adversa de tejido adyacente.
- biodegradable; los materiales de la estructura deben degradarse en tándem con la regeneración del tejido y el remodelado de la matriz extracelular (ECM) en sustancias no tóxicas más pequeñas sin interferir en la función del tejido adyacente.
- promover la adhesión, propagación y proliferación celular; vital para la regulación del crecimiento y diferenciación celular.
- resistencia mecánica adecuada; su resistencia debe ser comparable con el tejido *in vivo* en el sitio del implante ya que, evidentemente, una estructura requiere más flexibilidad o rigidez dependiendo de la aplicación en prótesis, por ejemplo, cardiovasculares frente a óseas.
- buenas propiedades de transporte; para asegurar suficiente transporte de nutrientes hacia las células y eliminación de los productos residuales la estructura debe ser altamente porosa con una buena conectividad de poros, sin embargo, debe mantener una resistencia mecánica suficiente lo que implica optimización de la porosidad.
- fácil de conectar al sistema de vascularización del hospedador; para asegurar un buen suministro de nutrientes a través de la estructura después del implante, la estructura debe conectarse al sistema de suministro natural de nutrientes.
- características superficiales adecuadas; aparte de las propiedades fisicoquímicas óptimas, las investigaciones sugieren que la introducción de, por ejemplo, topografía superficial en la estructura mejora la organización tisular que conduce a una función tisular aumentada.

El término "hidrogel" puede definirse como una red polimérica reticulada que tiene la capacidad de retener agua dentro de su estructura porosa. La capacidad de retención de agua de los hidrogeles surge principalmente debido a la presencia de grupos hidrófilos, a saber, grupos amino, carboxilo e hidroxilo, en las cadenas poliméricas. De acuerdo con Hoffmann (2002) (Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002; 54: 3-12), la cantidad de agua presente en un hidrogel puede variar del 10 % a miles de veces el peso del xerogel, donde el xerogel se define como una red polimérica desprovista de agua. La capacidad de retención de agua de un xerogel depende de la cantidad de grupos hidrófilos y la densidad de reticulación. Cuanto mayor es la cantidad de los grupos hidrófilos, mayor será la capacidad de retención de agua mientras que con un aumento en la densidad de reticulación aparece una disminución en el hinchamiento en equilibrio debido a la disminución en los grupos hidrófilos. Según aumenta la densidad de reticulación, aparece un aumento posterior en la hidrofobicidad y una disminución correspondiente en la capacidad de estiramiento de la red polimérica.

Los hidrogeles son redes poliméricas reticuladas y por tanto proporcionan al hidrogel una estructura de red polimérica tridimensional.

Los hidrogeles pueden subclasificarse en 2 grupos de acuerdo con la naturaleza de su reticulación. Por tanto, algunos podrían considerarse hidrogeles permanentes cuando la reticulación implica la formación de enlaces covalentes. Los hidrogeles físicos son aquellos derivados de péptidos autoensamblados o se forman de manera natural debido a las interacciones físicas, a saber, maraña molecular, interacción iónica y enlaces de hidrogeno, entre las cadenas poliméricas.

Un "parche" se refiere a una forma de formulación transdérmica cuya aplicación es para terapia sistémica.

"CTE" se refiere al enfoque basado en materiales; e implica estructuras tridimensionales preformadas, en forma de malla, parche o espuma, que se cultivan con células (cardiacas o no cardiacas).

"Plastificantes" son compuestos de bajo peso molecular pequeños añadidos a los polímeros para reducir la fragilidad y la temperatura de transición vítrea, conferir flexibilidad y potenciar la dureza de las películas. "Polímeros en MTE" se refiere a polímeros, tanto naturales como sintéticos, que son la clase más grande de biomateriales diseñados por ingeniería usados actualmente para reconstrucción del tejido de miocardio; están disponibles en una amplia diversidad de composiciones y propiedades.

El desarrollo de polímeros sintéticos ha conducido a una asombrosa tasa de éxito para implantes de tejido blando, debido al hecho de que pueden fabricarse de forma personalizada polímeros para cumplir con las propiedades de los tejidos blandos.

Los elastómeros termoplásticos, específicamente, copolímeros de múltiples bloques (segmentados) nanoestructurados, poliuretanos de múltiples bloques, por ejemplo, se reconocen como polímeros clave en el campo médico que están entre los más biocompatibles y más compatibles con la sangre conocidos actualmente (El-Fray M., *et al.* Materials Letters 2005,59, 2300). Algunos de los primeros materiales poliméricos usados para ingeniería tisular del corazón (parches) se basaban en polímeros biocompatibles hidrolíticamente degradables compuestos de ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) y su copolímero ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA). Con la creciente investigación y los ensayos experimentales, se ha establecido que las propiedades elásticas del biomaterial deben cumplir las propiedades elásticas del corazón nativo lo más posible para evitar que las células se desprendan de la construcción biodiseñada, por tanto, se están desarrollando continuamente polímeros alternativos.

Tabla 1: Ejemplo de polímeros seleccionados presentados para aplicación de parche cardiaco

| Tipo de polímero | Comentarios | Aplicación |
|---|--|--|
| Polímeros sintéticos | | |
| Poliuretano | Soporte para cultivo de láminas celulares elastómero biodegradable | Contención funcionalizada de laminina |
| Copolímeros de carbonato de 1,3-trimetileno | Capaz de sostener cargas cíclicas de músculo cardiaco | Contención |
| Poli(ε-caprolactona) | Siembra de células | Soporte de cardiomiocitos de latido diferenciados |
| Poli(n-isopropilacrilamida) (PiPAAm) | Sin polímero implantable | Ingeniería de láminas celulares |
| Polímeros naturales | | |
| Ácido poliglicólico | Disponible en el mercado | Sembrado con matriz extracelular (ECM), soporta la función ventricular |
| Colágeno | Material exógeno sin mejora de la función ventricular y cuestiones de inmunogenicidad cuando se implanta <i>in vivo</i> | Electroestimulación <i>in vitro</i> ingeniería de láminas celulares |
| Gelatina (Gelafoam) | Mezclado con Matrigel o glucosaminoglucano No proporciona indicios a ninguna mejora funcional de la función ventricular | Ingeniería de láminas celulares Soporte de cardiomiocitos de latido sembrados |
| Alginato | Riesgo de necrosis y calcificación | Cultivo celular <i>in vitro</i> y parche cardiaco sembrado |
| Quitosano | | |
| Compuestos naturales-sintéticos | | |
| Poli(éster-uretano)-colágeno | Uso de las propiedades mecánicas de los componentes sintéticos y propiedades de adhesión celular del colágeno | Cultivo celular <i>in vitro</i> |
| Poli(ε-caprolactona)-colágeno | Ídem | Ídem |
| Poli(D,L-lactida-co-caprolactona)-colágeno | Ídem | Ídem |
| Poli(glicerol-sebacato)-gelatina | Sin resultados respecto a la contractilidad o ensayos <i>in vivo</i> | Diferenciación celular |

Como en enfoques TE generales, la selección de biomateriales biocompatibles y biodegradables y el diseño de parches para ingeniería de músculo cardiaco podría estar guiada por los siguientes criterios: (i) capacidad de suministrar y estimular células, (ii) capacidad biodegradable, (iii) biocompatibilidad y (iv) propiedades mecánicas apropiadas. La porosidad es otro factor importante a considerar, en particular, para construcciones de ingeniería tisular 3D.

Como en enfoques TE generales, la selección de biomateriales y el diseño de parches para ingeniería de músculo cardiaco podría estar guiada por los siguientes criterios:

- 5 (i) capacidad de suministrar y estimular células,
- (ii) capacidad biodegradable,
- (iii) biocompatibilidad
- 10 (iv) propiedades mecánicas apropiadas.
- (v) La porosidad es otro factor importante a considerar, en particular, para construcciones de ingeniería tisular 3D.

15 La capacidad biodegradable no siempre es esencial, dependiendo de los enfoques aplicados para ingeniería tisular cardiaca. Los polímeros degradables, incluyendo naturales y sintéticos, se aplican en el enfoque de parche cardiaco y, en particular, en construcción de ingeniería tisular 3D.

20 En relación a las propiedades mecánicas, no existen restricciones estrictas sobre las propiedades mecánicas de los biomateriales usados para el parche, siempre que proporcionen un soporte mecánico al final de la diástole.

25 De forma práctica, sin embargo, un parche debe tener un cumplimiento óptimo para ajustarse suavemente sobre la superficie del corazón. Además, debe ser ideal que el dispositivo de soporte muestre una elasticidad no lineal del músculo cardiaco de modo que pudiera reconformarse con el corazón y por tanto proporcionar soporte mecánico al corazón en todos los procesos de latido, en lugar de solamente al final de la diástole. Un beneficio específico del enfoque de parche cardiaco podría ser cambios simples en la geometría ventricular y la mecánica que conduce a una reducción de las tensiones locales elevadas de las paredes.

30 Debe proporcionarse cuestiones diferentes a la biocompatibilidad, capacidad biodegradable y propiedades mecánicas tales como señales (físicas, químicas y biológicas) para promover la adhesión, expansión y diferenciación celular.

35 Para que las células sobrevivan y realicen sus funciones potenciales completas deben incrustarse en una estructura 3D que contenga poros. En este escenario, deben considerarse las funciones requeridas de la construcción diseñada por ingeniería. Si el parche tiene que actuar únicamente como "vehículo" para transportar las células al paciente, y después degradarse en un periodo corto (por ejemplo, en 3 meses), sería adecuado un parche denso. Como alternativa, si la construcción es para dar soporte al área dañada durante un periodo sostenido, entonces es vital que proporcione una estructura porosa, entre muchos otros factores, para asegurar la supervivencia celular durante el tiempo que estén en contacto con la estructura.

40 Además, el soporte polimérico no solamente sirve para facilitar el procedimiento quirúrgico para la inmovilización del dispositivo, en este sentido un soporte cosible: sino que también contribuye positivamente a las propiedades mecánicas del dispositivo global.

45 Resumiendo, los aspectos principales de los dispositivos finales son los siguientes:

- 50 - *Porosidad*: deben distribuirse dos tamaños de poro en la matriz de la estructura. Poros de al menos 100 μm son necesarios para ajustarse a los tamaños celulares, pero también poros intraestructurales de 10 μm son necesarios para el enraizamiento de las células.
- *Grosor del parche*: el parche debe ser de al menos 500 μm de grosor.
- *Propiedades mecánicas*: la dureza del parche debe ser similar o incluso mayor a la de un miocardio humano. Como referencia, las propiedades mecánicas del miocardio humano se describen a continuación:

55 Módulo de Young: 0,2-0,5 Mpa

Resistencia a tracción: 3-15 kPa

60 - *Biodegradación*: la degradación debe completarse en 6 meses, ya sea del nivel de masa o de las propiedades mecánicas. También se considerará la opción de un material degradable muy lentamente, que proporcionaría soporte mecánico a la pared ventricular durante periodos más largos.

65 - *Vascularización*: la neovascularización es un requisito fundamental del tejido cardiaco diseñado por ingeniería. El objetivo es tener 2400-3300 capilares/ mm^2 , $\sim 20 \mu\text{m}$ de distancia intercapilar.

Tabla 2: Requisitos para el parche cardiaco.

| | |
|-------------------------|--|
| Porosidad | 10-100 μm |
| Grosor del parche | 500 μm |
| Módulo de Young | 0,2-0,5 MPa |
| Resistencia a tracción | 3-15 KPa |
| Capacidad biodegradable | 6 meses |
| Vascularización | 2400-3300 capilares/ mm^2 , $\sim 20 \mu\text{m}$ de distancia intercapilar |

- 5 En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde la lactona es policaprolactona (PCL).
- 10 En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde el copolímero de polímero sintético es caprolactona y L-lactida/ ϵ -caprolactona.
- 10 En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde la celulosa es acetil butirato de celulosa (CAB), celulosa carboxilada o celulosa microcristalina.
- 15 En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde el polímero sintético es PCL.
- 20 En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde el polímero natural es quitosano.
- 20 En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde el polímero natural es alginato sódico.
- 25 En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde el péptido de autoensamblaje es FEFEFKFK (SEQ ID NO: 1).
- 25 En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde el soporte es poliuretano.
- 30 En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, que también comprende un plastificante. En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde el plastificante se selecciona de citrato de tributilo y citrato de acetil tributilo.
- 30 En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, que también comprende vidrio en polvo.
- 35 En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde el vidrio en polvo tiene un diámetro de 40 μm a 165 μm , preferiblemente de 45 μm , 125 μm o 160 μm .
- 35 En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, que también comprende un agente espumante.
- 40 En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde:
- 40 - la concentración del polímero sintético es del 75 % en peso al 25 % en peso, preferiblemente del 25 % en peso;
 - la concentración del polímero natural es del 60 % en peso al 10 % en peso, preferiblemente del 50 % en peso;
 - 45 - la concentración del péptido de autoensamblaje es del 4 % en peso al 0 % en peso, preferiblemente del 2 % en peso;
 - la concentración del plastificante es del 40 % en peso al 0 % en peso, preferiblemente del 20 % en peso; y
 - 50 - la concentración del vidrio en polvo es del 60 % en peso al 20 % en peso, preferiblemente del 20 % en peso.
- 55 En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, que también comprende fibras donde dichas fibras se seleccionan de alcohol polivinílico, policaprolactona y poli(3,4-etilendioxitiofeno), poli(estirenosulfonato) o combinaciones de los mismos.
- 55 En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, con un grosor entre 500 μm y 1000 μm ; con un diámetro de poro entre 10 μm y 250 μm ; con un módulo de Young entre 0,2 MPa y 0,5 MPa; y con una resistencia a tracción entre 3 KPa y 15 KPa.
- 60 En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, con un tiempo de biodegradación de 6 meses.

En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, que también comprende liposomas, preferiblemente que también comprende liposomas seleccionados de L- α -fosfatidilcolina derivada de soja.

5 En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, que también comprende al menos un agente trófico, preferiblemente donde dicho agente trófico se selecciona de BMP (proteína morfogénica ósea), IGF, VEGF y plasma rico en plaquetas (PRP).

10 En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, que también comprende al menos un factor de crecimiento, donde dicho factor de crecimiento es factor de crecimiento de hepatocitos y/o insulina.

15 En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, que también comprende al menos un fármaco, donde dicho fármaco se selecciona de 5-azacitidina y dexametasona.

En otra realización, la invención se refiere a la composición definida anteriormente, que también comprende células.

Descripción detallada de la invención

20 Como se mencionó anteriormente, la presente invención propone una estructura que es compatible con siembra celular *in vitro* y cultivo celular a usarse como vector para terapia celular. No obstante, como su acción principal es de refuerzo estructural, el dispositivo es totalmente compatible con una terapia celular. A pesar del presente contexto donde el presente dispositivo se ha demostrado orientado hacia CTE, la aplicación del dispositivo presentado no debe limitarse a legrado y aplicaciones cardíacas transmural. De hecho, dicho dispositivo puede usarse para
25 ingeniería de tejidos blandos tales como, aunque sin limitación, hernias, conductos venosos. La composición de la estructura comprende poli(ϵ -caprolactona), alginato y compuestos de los mismos con polímeros naturales tales como quitosano, alginato, fibroína. La porosidad del dispositivo puede personalizarse con un intervalo de poro de 10-250 μm , permitiendo de ese modo la angiogénesis y siembra celular.

30 En cuanto a la importancia de un biomaterial a usarse como dispositivo médico para aplicaciones protésicas, su función principalmente en TE es potenciar la adhesión, crecimiento y diferenciación celular. Por tanto, una extensión del dispositivo médico es una funcionalización con capacidad de agente de señalización celular. El dispositivo propuesto por la presente invención puede funcionalizarse con un gel autoensamblado biocompatible y biodegradable. Aunque su funcionalización no es necesaria para que el dispositivo médico asegure su acción
35 principal, ya se prevé que proporcione a la estructura un micro-entorno tipo ECM, la estructura autoensamblada polimérica, que está compuesta, aunque no limitada, por anfífilos peptídicos o de poliuretano, puede cargarse con señales químicas o biológicas mediante el método de atrapamiento o de forma covalente. Dichas señales pueden ser exógenas o ser PRP. Si se selecciona PRP, el dispositivo médico permanecería como dispositivo médico y no estaría bajo regulación de fármacos.

40 Para iniciar la regeneración del tejido hospedador, es esencial que el biomaterial fomente la revascularización *in vivo*, así como que favorezca la integración con el tejido hospedador. Al mismo tiempo, debe degradarse a una velocidad predefinida para posibilitar su remplazo con tejido recién formado por degradación segura a una velocidad similar de la formación de nuevo tejido y finalmente retirarse del organismo por rutas metabólicas naturales sin
45 producir subproductos tóxicos.

Las necesidades básicas para construcciones biodiseñadas de miocardio incluyen propiedades mecánicas robustas, aunque flexibles, capacidad para resistir la contracción, estabilidad electrofisiológica y capacidad de vascularización. De hecho, se espera que el parche proporcione un soporte mecánico temporal al miocardio infartado para evitar los efectos negativos sobre el tejido disponible y para prevenir la formación de aneurismas en el área infartada, aunque los procesos regenerativos tengan lugar. Se propone un parche cardíaco adecuado tanto para legrado como
50 aplicación transmural.

Desde el punto de vista crítico mencionado anteriormente respecto a la existencia de solución para aplicación de parche cardíaco, la presente invención proporciona un producto final de parche cardíaco basado en una estructura polimérica de porosidad y dimensión adaptables/un sistema de suministro de fármaco/un gel que se puede
55 funcionalizar adornándolo con un soporte de película biocompatible y biodegradable resistente a sutura (Figura 1).

Las aplicaciones previstas son legrado, soporte mecánico, contención del pericardio y aplicación transmural.

60 Este sistema de 4 elementos está propuesto como dispositivo médico para propósitos de refuerzo estructural. La estructura polimérica se inmoviliza en el soporte de película de un modo sin adhesivo.

65 Se inmoviliza un sistema de suministro de fármacos basado en fibras electrohiladas en el lado sin película de la estructura polimérica. El elemento de gel puede inmovilizarse en la arquitectura mencionada anteriormente por impregnación, centrifugación y de forma gravimétrica. La presente afirmación se refiere a la aplicación de un

dispositivo médico para tratamiento de infarto de miocardio.

La aplicación se prevé para aplicación tanto *in vitro* como *in vivo*. El sistema de suministro de fármacos se introduce para su complementariedad con el elemento de gel del dispositivo. Ambas partes del dispositivo pueden cargarse con agente de señalización celular, fármacos para investigación y uso. En la perspectiva de aplicación *in vivo*, el sistema de suministro de fármacos basado en fibras puede preverse como herramienta directa para funcionalización de gel con biocomponentes de la sangre del paciente.

Características inherentes: El parche cardíaco propuesto es un dispositivo médico que proporciona soporte estructural a los tejidos del pericardio y el miocardio. Las propiedades mecánicas del sistema de 4 componentes coinciden con las del tejido a reemplazar. El componente de estructura hidrófoba/hidrófila 3D proporciona un soporte mecánico a un gel que actúa como plastificante de la estructura y proporciona una superficie de contacto hidrófila con el entorno hospedador. El gel puede funcionalizarse fácilmente con el agente de señalización celular por atrapamiento. El gel también puede recoger de su entorno inmediato los agentes de señalización celular. El sistema de suministro de fármacos basado en fibras electrohiladas puede usarse como herramienta complementaria al gel para la carga del dispositivo con agentes de señalización celular, fármacos, etc. Las fibras electrohiladas pueden usarse como funcionalización del gel del elemento intrínseco para aplicación *in vivo* e *in vitro*. Todos los componentes del parche cardíaco propuesto son compatibles por consiguiente a 10993:5 y biocompatibles con células progenitoras cardíacas y de médula ósea.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales gruesos y porosos de polímeros naturales/plastificantes y PCL y derivados del mismo/polímeros naturales/plastificantes

Se han definido diferentes estrategias para el desarrollo de estructuras híbridas basadas en PCL de grosor y porosidad adaptables, la producción de dichas estructuras debe ser fácilmente susceptible para una perspectiva de producción en masa. Como se presenta en la Figura 2, se investigaron rutas de procesamiento y se estudiaron soluciones poliméricas compatibles.

Entre los enfoques y los diferentes sistemas poliméricos estudiados, el lixiviado salino y el moldeado por disolvente no proporcionaron soluciones adecuadas para un sistema altamente poroso. De hecho, en ambos casos, estudios basados en una selección de porógenos acuosos o solubles en disolvente orgánico y agentes de soplado aprobados por la FDA han conducido a una porosidad insatisfactoria.

Por otro lado, estructuras compuestas compatibles con tecnologías rollo a rollo de grosor y porosidad adaptables se han conseguido por procesamiento de fusión (Figura 3).

La naturaleza del comportamiento termocalorimétrico de los polímeros dictamina claramente la selección del sistema. Por ejemplo, PCL es un polímero de termosedimentación de baja temperatura de transición vítrea y por lo tanto puede tratarse/procesarse por prensado en fusión en condiciones compatibles con condiciones híbridas. Por el contrario, no puede procesarse por esta técnica.

En virtud de las restricciones del producto final, por lo tanto, el enfoque fue hacia el enfoque de fusión y presión y se usaron polímeros termoplásticos para dicho diseño (Figura 4).

Fue necesario introducir plastificantes en dichas composiciones debido a la dureza natural de los polímeros naturales e híbridos resultantes. Todos los plastificantes usados en el presente trabajo se han presentado en la bibliografía para aplicaciones biomateriales y están aprobados por la FDA. El efecto de los plastificantes en las propiedades mecánicas de las matrices de las estructuras se midió como se ejemplifica en la Figura 6.

Se estudiaron agentes de soplado y lechos de vidrio (Figura 7 y Figura 8) como agentes generadores de poros.

Se prepararon mezclas empleando diferentes combinaciones de polímeros naturales y sintéticos y plastificantes (Tabla 3).

Tabla 3: Composición de los parches

| COMPOSICIÓN DE LOS PARCHES PREPARADOS POR MEZCLA EN FUSIÓN | | | |
|--|--------------------|----------------------|------------------------|
| COMPONENTE | PAPEL | CANTIDAD (% en peso) | TOLERANCIA (% en peso) |
| PCL (o Lactida-ε-Caprolactona) | Polímero sintético | 50 | ±25 |
| Quitosano, alginato sódico o CAB | Polímero natural | 35 | ±25 |

| COMPOSICIÓN DE LOS PARCHES PREPARADOS POR MEZCLA EN FUSIÓN | | | |
|---|-----------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| COMPONENTE | PAPEL | CANTIDAD (% en peso) | TOLERANCIA (% en peso) |
| Citrato de tributilo o citrato de acetil tributilo | Plastificante | 20 | ±20 |
| Vidrio en polvo (menos de 160 micrómetros) | Agente porógeno | 40 | ±20 |
| Bicarbonato sódico | Agente de soplado | 4 | ±4 |
| Péptido autoensamblado | Sistema de suministro de fármacos | 2 | ±2 |
| COMPOSICIÓN DE LOS PARCHES PREPARADOS POR MOLDEADO Y SECADO | | | |
| COMPONENTE | PAPEL | CANTIDAD (% en peso) | TOLERANCIA (% en peso) |
| PCL (o Lactida-ε-Caprolactona) | Polímero sintético | 50 | ±25 |
| Quitosano, alginato sódico o CAB | Polímero natural | 35 | ±25 |
| Citrato de tributilo o citrato de acetil tributilo | Plastificante | 20 | ±20 |
| Biovidrio S53P4 | Agente de vascularización | 40 | ±20 |
| Péptido autoensamblado | Sistema de suministro de fármacos | 2 | ±2 |

Las estrategias realizadas para seleccionar los componentes más adecuados para los parches se presentan en la Figura 5.

- 5 Se prepararon parches con los polímeros sintéticos (PCL, copolímero de L-lactida/ε-caprolactona), el polímero natural (sal sódica de alginato, quitosano, CAB) y el plastificante citrato de tributilo.

10 Dichos materiales después se caracterizaron por espectroscopia molecular y de forma calorimétrica (Figura 9). La modificación del punto de fusión (Tm) del polímero cristalino con otros polímeros proporciona información acerca de su miscibilidad. El PCL puro empleado para este trabajo presenta un punto de fusión de 60,8 °C. La introducción de plastificantes, polímero natural y vidrio podría afectar al punto de fusión de PCL. PCL puede interaccionar con polímeros naturales mediante enlaces de hidrógeno.

15 Aunque el trabajo inicial se centró en el procesamiento de fusión de los polímeros y el tratamiento adicional con ácido fluorhídrico para obtener estructuras tridimensionales altamente porosas, se han estudiado otras estrategias tales como secado por congelación y procesos de inversión de fase.

20 Para este proceso, las mezclas de la composición se disolvieron o dispersaron (en el caso de quitosano y del vidrio en polvo) en dimetilsulfóxido, que presenta un punto de congelación relativamente alto (18,5 °C). Los componentes estudiados para las estructuras fueron: PCL y L-lactida/ε-caprolactona como polímeros sintéticos, quitosano como polímero natural y biovidrio S53P4 con un tamaño menor de 45 micrómetros como agente generador de poros.

25 Las ventajas e inconvenientes de ambas técnicas de procesamiento (procesamiento de fusión e inversión de fase) se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Ventajas e inconvenientes de las técnicas de procesamiento seleccionadas de las estructuras.

| Técnica de procesamiento | Ventajas | Inconvenientes |
|--|---|---|
| PROCESAMIENTO EN FUSIÓN + TRATAMIENTO HF | 1.- Sin disolvente 2.- Introducción de aditivos 3.- Fácil producción en masa de estructuras gruesas y delgadas 4.- Porosidad superficial: poros más grandes 5.- Porosidad adaptable | 1.- Tratamiento con ácido fluorhídrico (HF) |
| CONGELACIÓN/INVERSIÓN DE FASE | 1.- Sin tratamiento HF 2.- Grosor adaptable 3.- Implantación industrial más fácil | 1.- Porosidad superficial: poros más pequeños |

30 El estudio de la porosidad superficial por SEM muestra que muestras preparadas por inversión de fase presenta poros más pequeños (de aproximadamente 20 micrómetros) que las procesadas por fusión (dimensiones de 50 micrómetros). Además, la porosidad en muestras de procesamiento de fusión puede controlarse por el tamaño del vidrio en polvo usado (véase la Figura 10).

Las propiedades mecánicas de los parches preparados por inversiones de fases demuestran tener elasticidad adecuada (191 % de PCL y 257 % para parches de copolímero de L-lactida/ε-caprolactona) y resistencia a tracción para aplicación de parche cardiaco (véase la Figura 11).

5 **Ejemplo 2**

PCL/polímeros naturales (quitosano, acetil butirato de celulosa, ácido algínico)/FEFEFKFK (PERA-UniMa-PPI)

10 Para facilitar la producción del producto final CP y la aceptación por el usuario final, se ha propuesto una arquitectura multiestratificada con láminas de materiales distintivos pero complementarios, donde un elastómero compatible tal como, aunque sin limitación, poliuretano sirve como base para una estructura porosa gruesa compuesta por, aunque sin limitación, compuestos de poli(ε-caprolactona) con polímeros naturales tales como, aunque sin limitación, alginato y quitosano. Aunque las características micro y macroestructurales son compatibles con la angiogénesis, la siembra celular, el transporte de nutrientes a través de la estructura, se usa un péptido autoensamblado para recubrir este elemento central para proporcionar una característica tipo ECM al dispositivo. La funcionalización del dispositivo con señales químicas y biológicas se consigue a través de la funcionalización de dicho ensamblaje de péptidos. La estructura permite la instauración de un gradiente de concentración, facilitando de ese modo la diferenciación, expansión y proliferación celular.

20 Un dispositivo médico suturable o cosible estará compuesto de 3 elementos: una estructura presada en fusión, congelada-descongelada, secada por congelación con gel polipeptídico autoensamblado impregnado o de soporte. En dicha configuración, el polímero sintético-natural proporcionará un soporte para geles peptídicos fácilmente funcionalizables. El argumento recae sobre el fácil atrapamiento de señal química y biológica dentro de un gel relacionado con una estructura sintética de propiedades mecánicas. Aunque dicha construcción debe colocarse en lugar del tejido de cicatrización para terapia de regeneración de tejido hospedador, se usa un soporte biocompatible y biodegradable de poliuretano para inmovilizar el parche sobre el tejido cardiovascular (Figura 12).

25 Entre todas las combinaciones evaluadas, se obtienen los mejores resultados con estructuras compuestas de bajas cargas superficiales (bajo contenido de quitosano o ácido algínico) o con polímeros neutros tales como PLC/acetil butirato de celulosa (Figura 13).

30 Las estructuras preparadas como se ha mencionado anteriormente son la base del concepto de parche de 3 componentes. Los componentes detrás de la estructura son capa de poliuretano para coser el parche, estructura y gel para la liberación del factor de crecimiento u otros posibles agentes atrapados. Estos agentes atrapados podrían ser, aunque sin limitación:

- 35 .- Moléculas bioactivas que promueven el reclutamiento, adhesión, proliferación y diferenciación de células madre: IGF-1 (factor de crecimiento tipo insulina 1), HGF (factor de crecimiento de hepatocitos), 5-azacitidina, etc.
- 40 .- Moléculas bioactivas que promueven la angiogénesis: VEGF-A (factor de crecimiento del endotelio vascular A), HGF.
- 45 .- También puede prepararse plasma enriquecido en plaquetas de componentes sanguíneos del propio paciente y atrapados dentro de la formulación de gel para proporcionar un dispositivo médico funcionalizado con señales químicas y biológicas endógenas.

La Figura 14 muestra una representación esquemática del concepto de parche de tres componentes. En los siguientes ejemplos (Ejemplo 3 y 4) se presenta el desarrollo del sistema de tres componentes.

50 El dispositivo puede funcionalizarse adicionalmente con un sistema de suministro de fármacos tal como, aunque sin limitación, poli(ε-caprolactona), y compuestos de la misma donde los polímeros naturales son un segundo componente del dispositivo de suministro de fármacos formulado (Figura 15).

Ejemplo 3

55 Preparación del parche cardiaco

Para facilitar la sutura del parche cardiaco, se inmovilizó un soporte cosible de poliuretano en estructuras basadas en PCL. La Figura 16 representa el procedimiento etapa por etapa para la preparación del parche cardiaco suturable.

60 **Ejemplo 4**

Funcionalización de parches

65 Impregnación del polipéptido

Se ha inmovilizado péptido autoensamblado tal como, aunque sin limitación, gel polipeptídico de FEFKFK (SEQ ID NO: 1) en parches de PCL/quitosano, PCL/alginato y PCL/acetil butirato de celulosa (CAB). Se introdujeron geles de polipéptidos en los parches por centrifugación y calentamiento. Estos también pueden aplicarse por laminación con hierro para estirar o la técnica de aplicación con paleta. El análisis de cromatografía revela que todos los parches ensayados contienen polipéptidos. El contenido de gel de los parches no depende del método de preparación o de la concentración de gel. Depende de la porosidad de la estructura y la estructura del polímero natural. Los mejores resultados se obtuvieron para polímeros neutros tales como CAB (Figura 13).

Impregnación de gel de poliuretano

Se preparan dos tipos de gel de poliuretano:

- Gel reticulado físico: después de 24 horas en agua aumenta su volumen 20-25 veces.
- Gel termorreversible: gel de poliuretano con baja LCST (temperatura de solución crítica inferior) y un tiempo de gelificación de 62 segundos a 28 °C.

Se ha medido la absorción de hidrogel PU en las estructuras. Este valor va del 0,5 % en peso al 5,70 % en peso dependiendo de la porosidad y composición de la estructura y la porosidad de la capa inmovilizada de poliuretano.

Nanofibras funcionalizadas electrohiladas

Además de la impregnación del gel, se han introducido fibras funcionalizadas en los parches para liberación de fármaco tópico/agente trófico (sistema de 4 componentes: capa de poliuretano, parche de biopolímero, sistema de suministro de fármacos basado en fibras electrohiladas y un péptido de autoensamblaje funcionalizable). La introducción de fibras también podría ser un vehículo para cargar los parches con agentes de señalización celular o factores de crecimiento. Tiene depositadas fibras electrohiladas en parches de policaprolactona por la técnica de electrohilado coaxial (Figura 17).

La técnica de electrohilado coaxial permite preparar el núcleo de la nanofibra con un material y la carcasa con uno diferente. Usando esta técnica, se encapsularon liposomas y factores de crecimiento en el núcleo de la fibra en una solución de PVA y la carcasa de la fibra se hizo de PCL. Se ha determinado el perfil de fármaco de los factores de crecimiento atrapados en fibras electrohiladas coaxialmente. Estas nanofibras mostraron buena adhesión al material y fueron adecuadas para su uso adicional en combinación con sustancias bioactivas. De acuerdo con los resultados, el electrohilado coaxial parece adecuado para la funcionalización de la estructura. Además, esta técnica permite la inmovilización del gel.

Ejemplo 5

Caracterización

Ensayo de hinchamiento

PCL no muestra hinchamiento significativo en agua o medios celulares tales como medio de solución salina tamponada con fosfato (PBS) debido a la naturaleza hidrófoba de este polímero. Las mezclas de PCL con polímeros naturales presentan hinchamiento en PBS. Las mezclas de PCL/CAB, aumentado de CAB producen hinchamiento mayor: hasta el 10-12,5 % para una muestra con un 30 % en peso de PCL (Figura 18).

Se ha estudiado el hinchamiento en PBS de mezclas de copolímero de L-lactida/caprolactona. Mezclas de copolímero/quitosano presentan más hinchamiento que PCL debido a la mayor hidrofiliidad de L-lactida/ε-caprolactona. Las mezclas con porcentaje del 20 % de quitosano presentan un 16 % de ganancia de peso para la mezcla de PCL y hasta un 42 % para L-lactida/ε-caprolactona (Figura 19).

Ejemplo 6

Evaluación biológica

Ensayos de biodegradación/biocompatibilidad (toxicidad a largo plazo)

Se realizaron ensayos de acuerdo con el protocolo suministrado.

Protocolo: Se evaluaron las propiedades de degradación *in vitro* en tres soluciones diferentes:

- solución de tampón fosfato (PBS);

- medio de cultivo celular, compuesto por medio de Eagle modificado por Dulbecco con alto contenido de glucosa, suero bovino fetal al 10 %, glutamina 2 mM, penicilina (100 U/ml) y estreptomycinina (100 µg/ml);
- PBS con colagenasa (16 U/ml).

5 Las pérdidas de peso de las estructuras durante la degradación se miden por cambios en el peso seco después de incubación durante periodos especificados de tiempo. Todos los experimentos deben hacerse por triplicado; los resultados son la media (±ET) de tres determinaciones.

- 10 1) Muestras de materiales, cortadas en cuadrados de 1 cm², se secan en horno a 37 °C hasta un peso constante;
- 2) Se determina el peso seco de partida, W_0 , para cada muestra;
- 15 3) Las muestras se introducen en 10 ml de solución y se mantienen en un baño de agitación a 37 °C durante periodos especificados de tiempo (por ejemplo, 1, 3, 7, 14, 21, 30, 45, 60... días);
- 4) En los momentos indicados, las muestras se retiran de la solución, se aclaran en agua bidestilada y se secan en horno a 37 °C hasta un peso constante;
- 20 5) Se determina el peso seco en el momento t de degradación, W_t , para cada muestra;
- 6) Se evalúa la pérdida de peso porcentual de acuerdo con la siguiente ecuación: $(W_0 - W_t) / W_0 \times 100$

En algunos casos, se tienen en consideración los siguientes aspectos adicionales:

- 25 - Determinación cuantitativa de los productos de degradación, usando HPLC o métodos UV;
- Caracterización fisicoquímica de los productos de degradación, así como de las muestras degradadas, a través de FT-IR, DSC, GPC;
- 30 - Variaciones de pH en la solución de degradación.

Dicho protocolo se ha usado con las siguientes modificaciones: (1) para aumentar el área superficial, las muestras se cortaron a 3 cm cuadrados (3 cm²); (2) para mejorar el proceso de secado, las muestras se secaron a 45 °C; (3) para evitar la contaminación microbiana, las muestras se esterilizaron sumergiéndolas en etanol en cada momento de muestreo durante aproximadamente 30 segundos y se secaron al aire para retirar el exceso de etanol; y (4) se han controlado las variaciones de pH. El ensayo se realizó en tampón salino de fosfato (PBS), medio de Eagle modificado por Dulbecco DMEM y PBS/colagenasa.

40 El parche cardiaco basado en ácido algínico (PCL o L-lactida/caprolactona) condujo a algún cambio de pH.

Se han realizado ensayos de citotoxicidad por la University of Pisa. Adicionalmente, también se realizaron ensayos de cultivo. La Figura 20 representa rCPC (células progenitoras cardiacas de rata) y BMC (células progenitoras de médula ósea) en cultivo después de 7 días de cultivo soportando ausencia de toxicidad a corto y largo plazo de un parche cardiaco basado en ácido algínico (PCL o L-lactida/caprolactona).

Ensayo de cultivo de siembra celular del dispositivo de estructura de poli(ε-caprolactona):quitosano

50 Se sembró poli(ε-caprolactona):quitosano con células endoteliales de aorta de rata (rAoEC) y progenitores de células cardiaca de rata (rCPC), 45 x 10³ células/cm² respectivamente. Las Figuras 21 y 22 representan la supervivencia celular en evaluación biológica de toxicidad a largo plazo y crónica. Los resultados muestran que la estructura soporta y promueve la proliferación de rAoEC y rCPC (Figura 23).

Ejemplo 7

Estudios *in vivo*

60 La estructura básica de poliuretano(soporte)/poli(ε-caprolactona):quitosano sembrada del parche cardiaco se implantó *in vivo* y se suturó en la pared libre del ventrículo izquierdo (LV) después de criolesión en el corazón de la rata (Figura 24).

En el día del implante +4 y +10 días respectivamente, el animal se sacrificó para análisis inmunohistoquímico.

La Figura 25 demuestra la estabilidad del dispositivo propuesto después del sacrificio.

65

Las Figuras 26 y 27 demuestran la idoneidad del dispositivo para soporte estructural de tejido blando/terapia acelar (Figura 26), sin estar asociada la terapia celular a ningún proceso inflamatorio.

A partir de la Figura 27, los datos *in vitro* soportan la evaluación biológica estática, que calificó el material de la estructura como no tóxico y capaz de soportar el cultivo de células madre. Además, esto soporta las reivindicaciones del dispositivo propuesto:

a. proporciona un soporte estructural para el tejido dañado

b. puede usarse con terapia celular y de láminas celulares.

c. Las células sembradas en la estructura pueden expandirse *in vitro* e implantarse *in vivo*. Según sucede la migración hacia el interior hacia la zona de la lesión, la estructura propuesta también es adecuada para aplicaciones transmurales.

Ejemplo 8

Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de los parches cardiacos se han determinado como una función del contenido de polímero natural en condiciones en seco y húmedo que muestran las propiedades mecánicas adecuadas de las estructuras poliméricas propuestas (Tabla 4)

Tabla 4 Las propiedades de tracción de parches cardiacos seleccionados basados en PLC y L-lactida/caprolactona

| Tiempo de inmersión en PBS (horas) | MÓDULO ELÁSTICO (MPa) | MÓDULO ELÁSTICO (MPa) |
|------------------------------------|--|---|
| | Muestra: L-lactida-ε-caprolactona/ quitosano/TBC/vidrio (125- 160 μm)/ NaHCO ₃ tratado 10 min. con HF | Muestra: PCL/quitosano/TBC/vidrio (125-160 μm) /NaHCO ₃ tratada 10 min. con HF |
| 0 | 13,14 ± 6 1,41 | 31,94 ± 8,35 |
| 48 | 4,40 ± 2,22 | 28,19 ± 2,84 |
| 120 | 5,04 ± 1,53 | 44,44 ± 58,63 |

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Representación esquemática del dispositivo médico de parche cardiaco

Figura 2: Tecnologías de procesamiento de polímeros estudiadas para la producción de polímeros biocompatibles y biodegradables de tamaño y porosidad controlables para aplicaciones de parche cardiaco

Figura 3: Ejemplos seleccionados de estructuras obtenidas de compuestos de PCL y PVA por A) moldeado por disolvente/lixiviación de partículas; B) liofilización y C) enfoque de presión de fusión.

Figura 4: Representación esquemática de composiciones de parche cardiaco.

Figura 5: Representación esquemática del trabajo experimental cronológico realizado para la preparación de parches

Figura 6: Elongación a carga máxima de los parches con diferentes concentraciones de CAB y plastificantes: citrato de acetil tributilo, aceite de soja epoxidado y citrato de tributilo.

Figura 7: Fotografías SEM de parches de PCL + quitosano + vidrio tratados 5 y 10 minutos con ácido fluorhídrico.

Figura 8: Fotografías SEM de parches de PCL/celulosa/TBC/vidrio en polvo (diámetros de 125 μm y 160 μm)/NaHCO₃ tratados con ácido fluorhídrico.

Figura 9: Termogramas de DSC de A) PCL puro; B) PCL + quitosano al 30 %, C) PCL + quitosano al 40 % y D) PCL + quitosano al 60 %. Las mezclas B, C y D se preparan con citrato de tributilo/vidrio en polvo (125 y 160 micrómetros de tamaño de partícula)/NaHCO₃ sin tratamiento.

Figura 10: Fotografías SEM de parches preparados por procesamiento de fusión y congelación/inversión de fases.

Figura 11: Curvas de tensión-esfuerzo: A) PCL-3 (PCL + quitosano + plastificante + biovidrio) y B) copolímero 3 (L-lactida/caprolactona quitosano + plastificante + biovidrio).

Figura 12: Concepto de parche cardiaco en soporte: 1) una película biodegradable de PEUU; 2) adhesivo de imprimación de poli(hidroxiuretano); 3) estructuras de compuestos basados en PCL con geles de péptido autoensamblado impregnados.

Figura 13: Evaluación del contenido FEFKFK en sistemas de PCL/CAB.

Figura 14: Representación esquemática de un parche cardiaco de 3 componentes.

Figura 15: Representación esquemática de un parche cardiaco de 4 componentes, donde la numeración representa los sitios de señales químicas y/o biológicas.

Figura 16: Representación etapa por etapa de la preparación de parche cardiaco suturable con soporte de poliuretano de estructura 3D y adhesivo de bio-poliuretano.

Figura 17: Fotografías SEM del parche antes y después de la deposición de nanofibras electrohiladas y el perfil de liberación del parche cardiaco + nanofibras coaxiales de PCL/PVA cargadas con FITC dextrano.

Figura 18: Ganancia porcentual de peso de mezclas de PCL/acetil butirato de celulosa en medio PBS:

A) (■) PCL + 10 % CAB, (●) PCL + 20 % CAB, (▲) PCL + 30 % CAB. Se prepararon tres series de mezcla con citrato de tributilo al 20 %, vidrio en polvo al 10 % de 125 micrómetros, vidrio en polvo al 10 % de 160 micrómetros y NaHCO₃ al 3 % y después se trataron con HF durante 10 minutos.

B) (■) PCL + 10 % CAB, (●) PCL + 20 % CAB, (▲) PCL + 30 % CAB .se prepararon tres series de mezcla con citrato de tributilo al 20 %, vidrio en polvo 20 % de 125 micrómetros, vidrio en polvo al 20 % 160 de micrómetros y NaHCO₃ al 3 % y después se trataron con HF durante 10 minutos.

Figura 19: Ganancia porcentual de peso de mezclas de L-lactida/ε-caprolactona/quitosano en medio PBS: (■) quitosano al 40 % y (●) quitosano al 20 %. Ambas series de mezclas se prepararon con citrato de tributilo al 20 %, vidrio en polvo al 20 % de 125 micrómetros, vidrio en polvo al 20 % de 160 micrómetros y NaHCO₃ al 3 % y después se trataron con HF durante 10 minutos.

Figura 20: Análisis confocal de cultivo de 7 días de células progenitoras cardiacas de rata (CPC) del corazón y células progenitoras de médula ósea (BMC) de ratas transgénicas EGFP sobre parche cardiaco basado en ácido algínico (PCL o L-lactida/caprolactona). *Datos suministrados amablemente por el Prof. Quaini, University of Parma.*

Figura 21: Imágenes fluorescentes de rAoEC sembradas en poli(ε-caprolactona):quitosano usando DIL y eGFP como rastreador celular fluorescente

Figura 22: Imágenes fluorescentes de rCPC sembradas en poli(ε-caprolactona):quitosano usando DIL y eGFP como rastreador celular fluorescente

Figura 23: Supervivencia *in vitro* de rAoEC/rCPC sobre la estructura propuesta, el elemento central del parche cardiaco

Figura 24: Imagen del tórax abierto del parche cardiaco implantado en el modelo animal de rata en el momento del sacrificio.

Figura 25: Imágenes del corazón de la rata después del sacrificio y previo a la caracterización inmunohistoquímica

Figura 26: Imágenes tisulares de formación de lesiones en el modelo animal después de criogenización del LV, eliminación quirúrgica del tejido cicatricial e implante de la estructura (sin sembrar)

Figura 27: Tinción inmunohistoquímica de CPC que se sembraron en un parche cardiaco de poli(ε-caprolactona):quitosano.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Tecnologías Avanzadas Inspiralia S.L.

The University of Manchester

INSTITUTUL DE CHIMIE MACROMOLECULARA PETRU PONI

USTAV EXPERIMENTALNI MEDICINY AKADEMIE VED CESKE REPUBLIKY

VEREJNA VYZKUMNA INSTITUCE

<120> Nueva estructura para parche cardiaco

5 <130> PCT2609.1

<160> 4

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de autoensamblaje

20 <400> 1

Phe Glu Phe Glu Phe Lys Phe Lys
1 5

<210> 2

<211> 8

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de autoensamblaje

30 <400> 2

Val Glu Val Glu Val Lys Val Lys
1 5

35 <210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Péptido de autoensamblaje

<400> 3

Pro Gly Ser Pro Phe Glu Phe Glu Phe Lys Phe Lys
1 5 10

45 <210> 4

<211> 11

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de autoensamblaje

55 <400> 4

Ile Gly Phe Phe Glu Phe Glu Phe Lys Phe Lys
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:
- 5 a) una estructura biocompatible y biodegradable que comprende polímeros sintéticos y naturales, en la que el polímero sintético se selecciona de ácido poliláctico, ácido glicólico, lactona, sebacato de poliglicerol y combinaciones de los mismos, y en la que el polímero natural se selecciona de quitosano, alginato sódico y celulosa;
- 10 b) un hidrogel que comprende péptidos de autoensamblaje, en la que los péptidos de autoensamblaje se seleccionan de FEFEFKFK, VEVEVKVK, PGSPFEFEFKFK IGF-FEFEFKFK y combinaciones de los mismos; y
- c) un soporte que comprende poliuretano.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la lactona es policaprolactona (PCL).
- 15 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el copolímero de polímeros sintéticos es L-lactida/ε-caprolactona, poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y L-lactida/ε-caprolactona.
4. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la celulosa es acetil butirato de celulosa (CAB), celulosa carboxilada o celulosa microcristalina.
- 20 5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el polímero sintético es PCL.
6. La composición de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el polímero natural es quitosano.
- 25 7. La composición de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el polímero natural es alginato sódico.
8. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el péptido de autoensamblaje es FEFEFKFK.
- 30 9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el soporte es poliuretano.
10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que también comprende un plastificante.
- 35 11. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que también comprende vidrio en polvo.
12. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que también comprende un agente espumante.
- 40 13. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que también comprende fibras, en la que dichas fibras se seleccionan de alcohol polivinílico, policaprolactona y poli(3,4-etilendioxitiofeno), poli(estirenosulfonato) o combinaciones de los mismos.
- 45 14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en terapia.
15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en el tratamiento de infarto de miocardio, legrado o tratamiento de infarto transmural, preferiblemente en el tratamiento de infarto de miocardio.
- 50 16. La composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el tratamiento comprende regeneración del tejido cardíaco.
17. Un parche cardíaco que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
- 55 18. Un proceso para obtener la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que comprende:
- 60 i. disolución del material;
- ii. moldeado por disolvente y precipitación en frío;
- iii. extracción del disolvente;
- iv. introducción del péptido de autoensamblaje en los polímeros por centrifugación o gravedad;
- iv. secado; y
- v. esterilización.

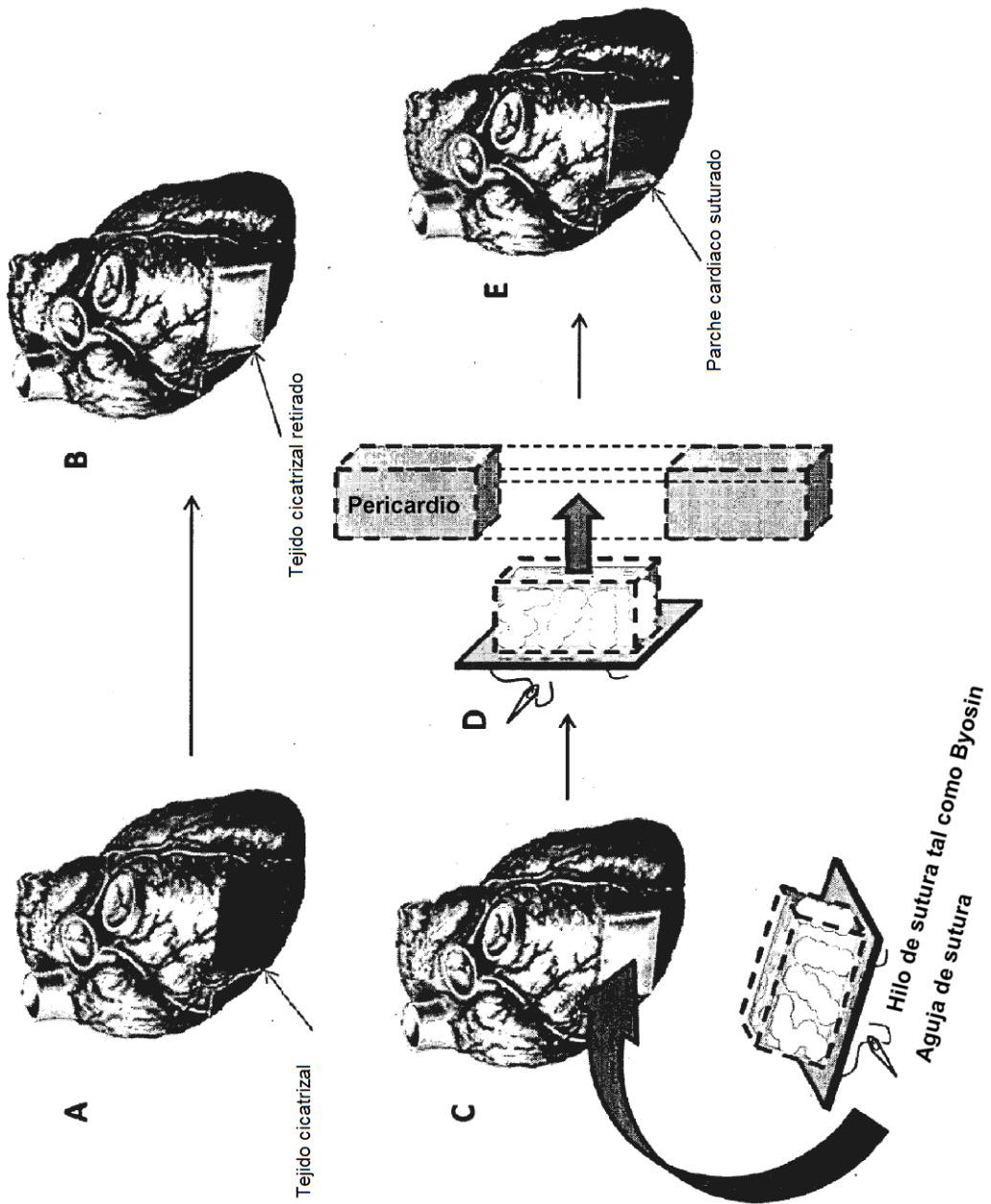


Figura 1 (continuación)

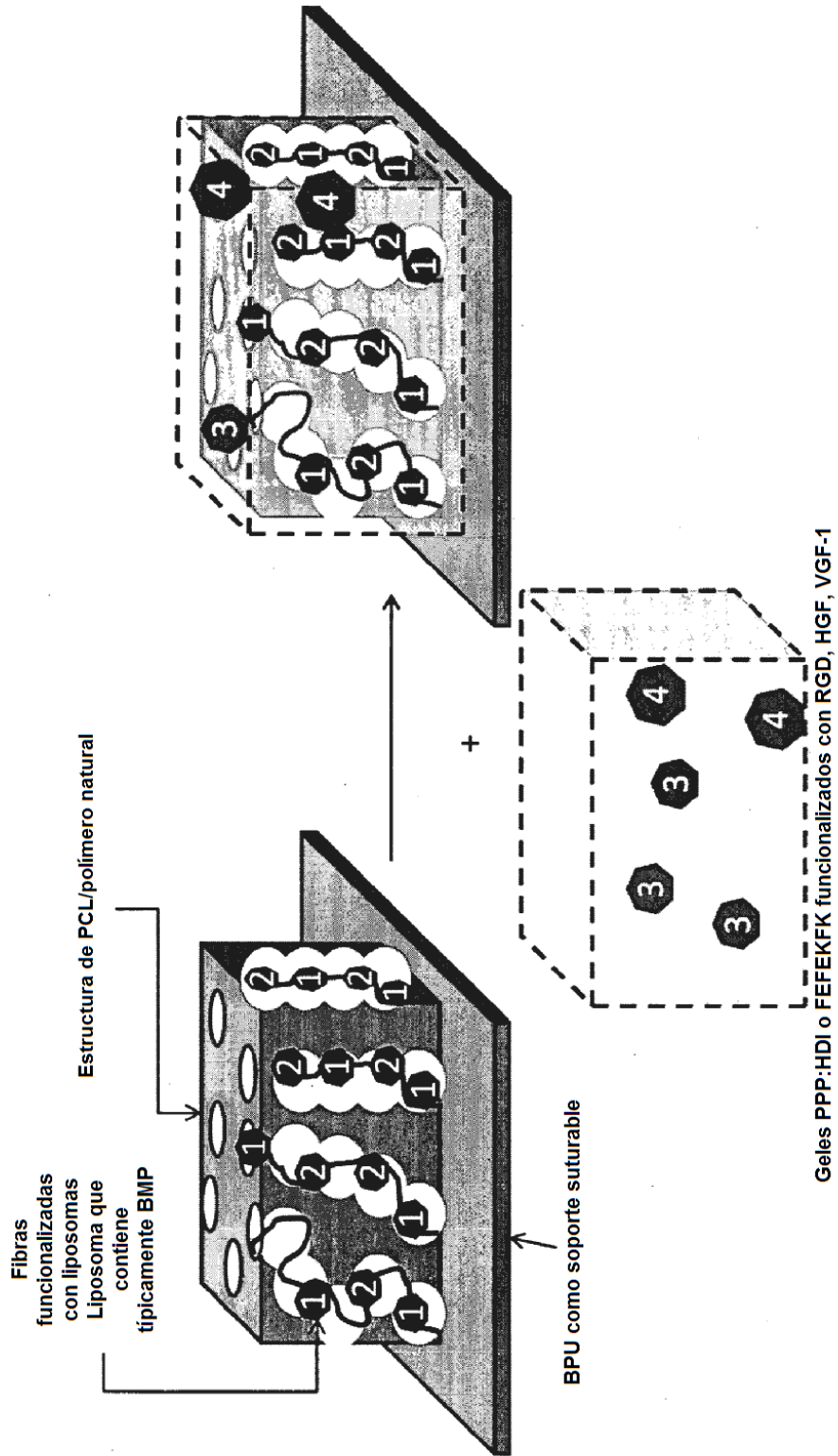


Figura 1

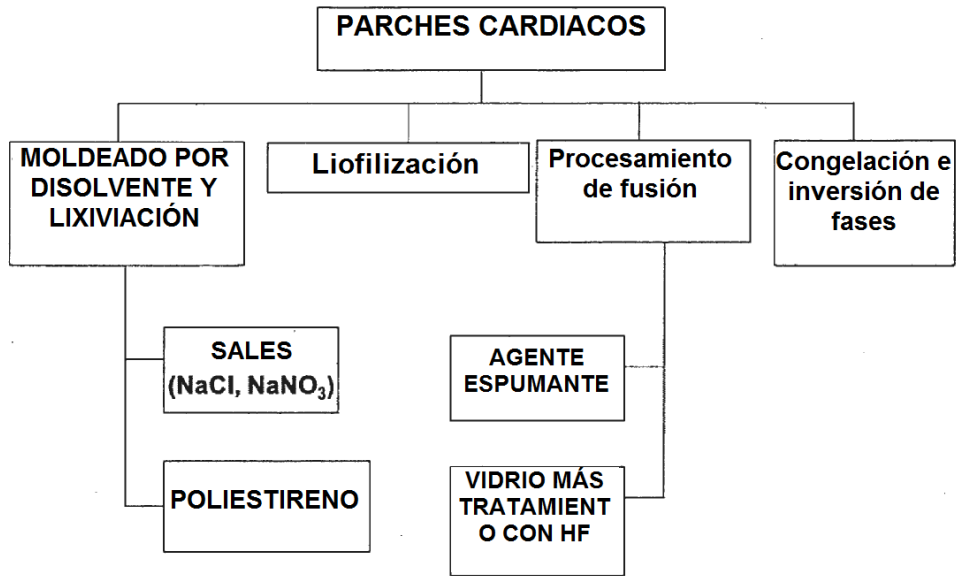


Figura 2

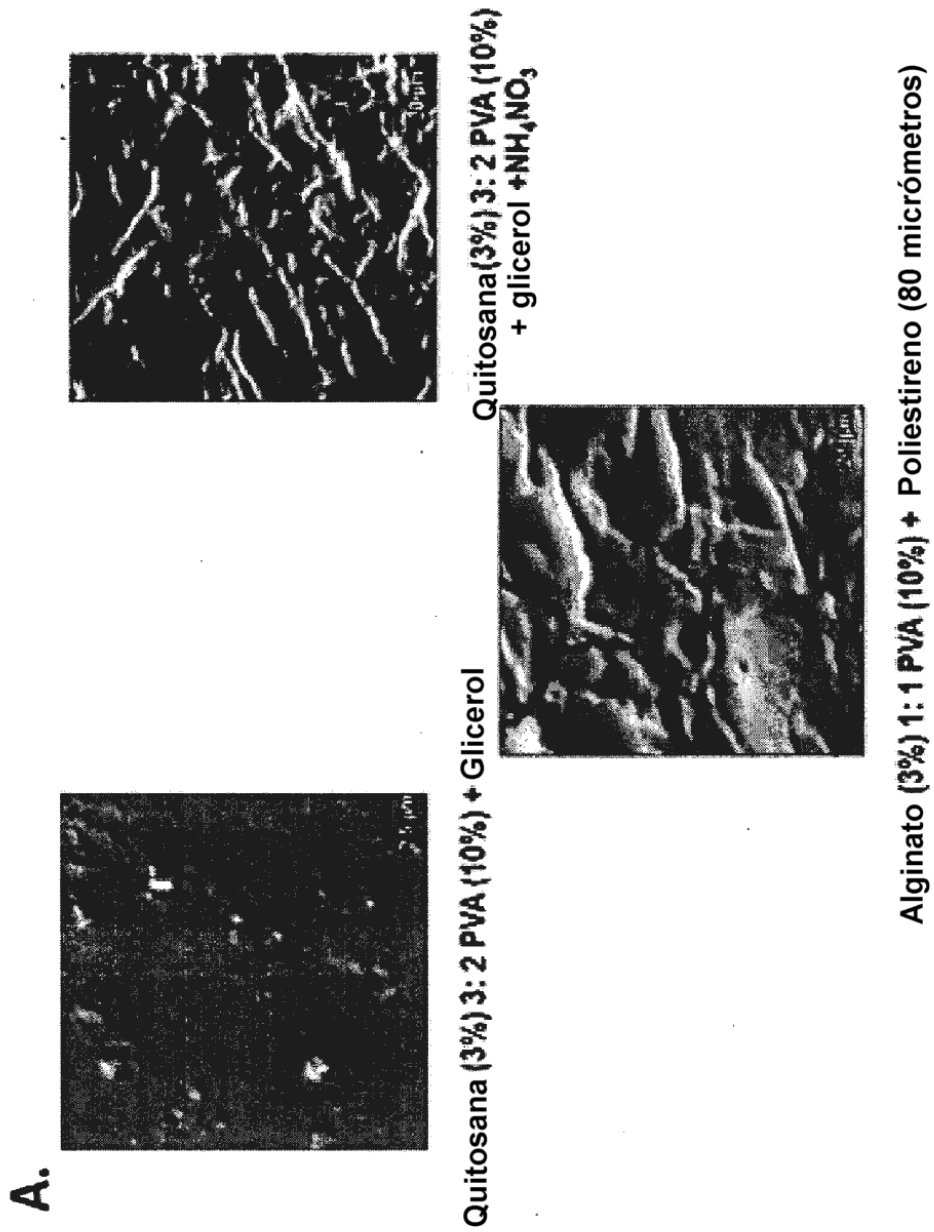
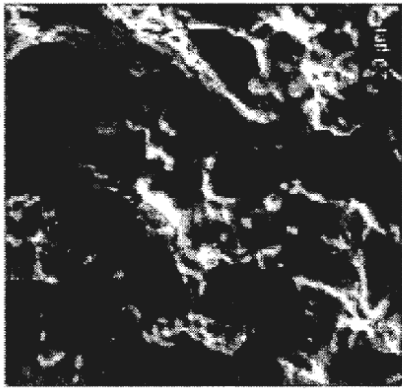
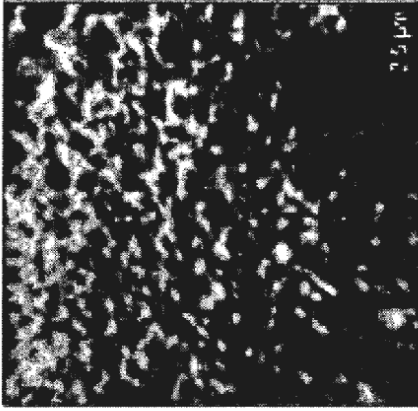


Figura 3 (continuación)

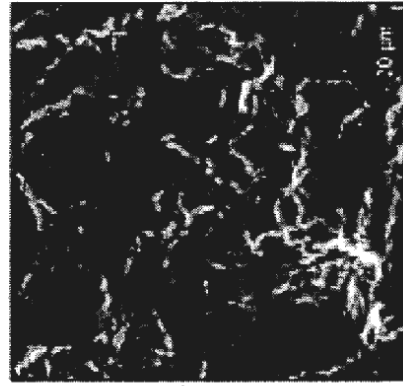
B.



Quitosana (3%) 3: 1 PVA (5%) + CaCO₃



Quitosana (3%) 3: 1 PVA (5%) + 3% NaCl



Quitosana (3%) 3: 1 PVA (5%)

Figura 3 (continuación)

C.

PCL + Acetil butirato de celulosa al 30 % + TBC al 20 %

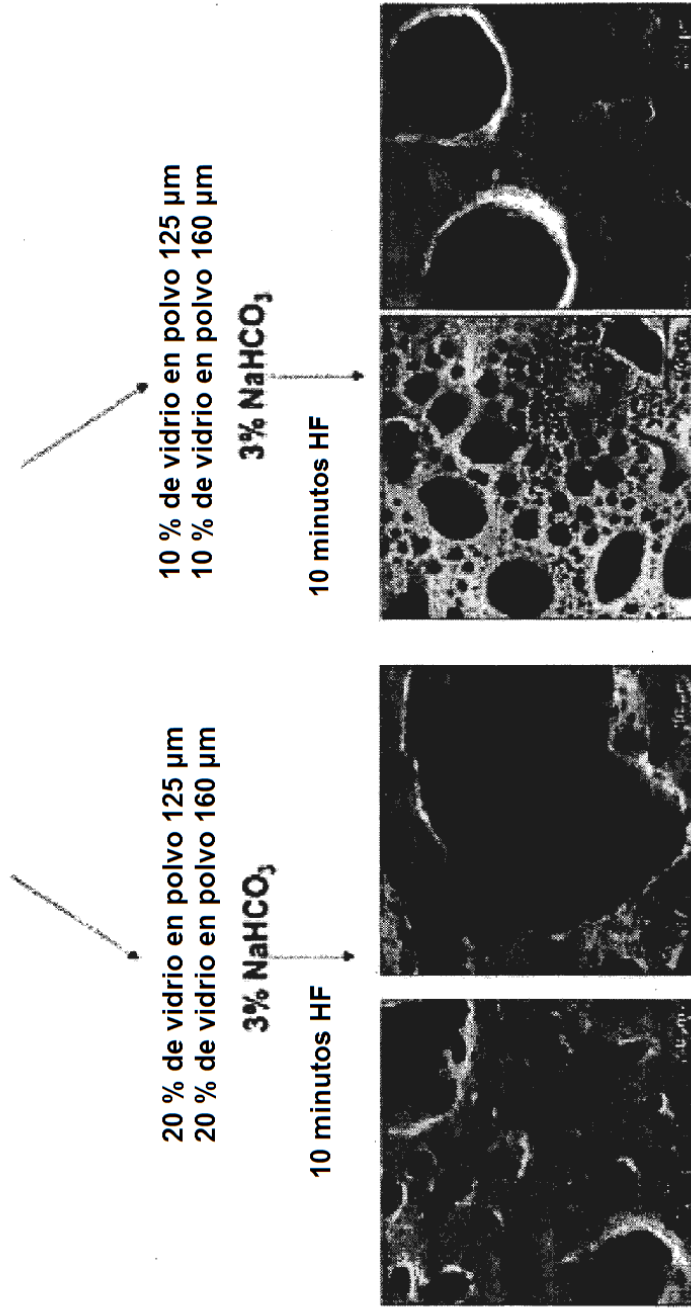


Figura 3

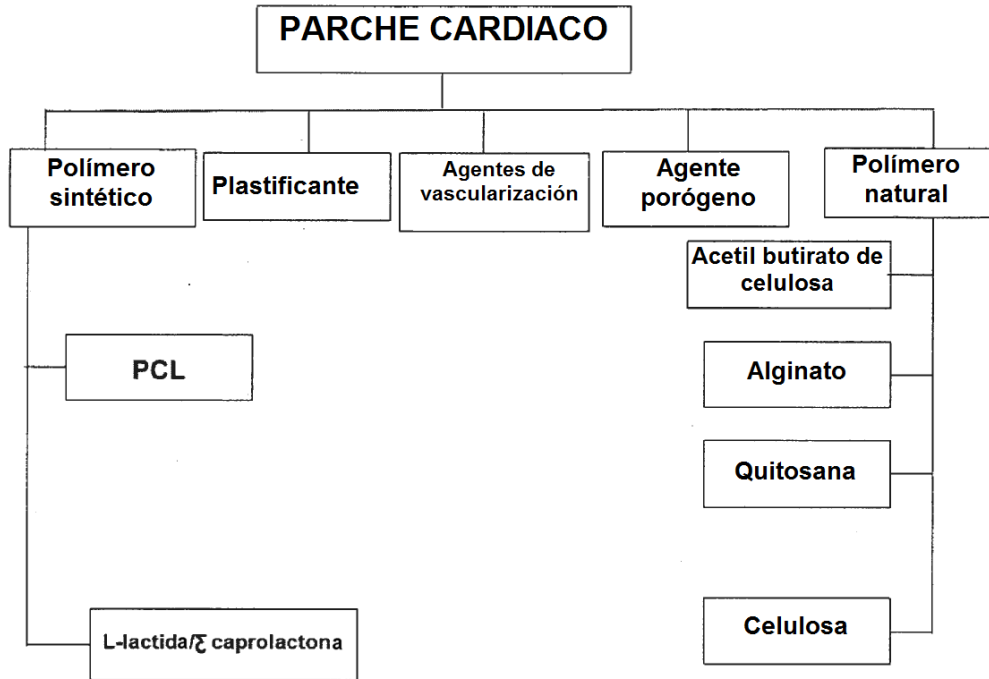


Figura 4

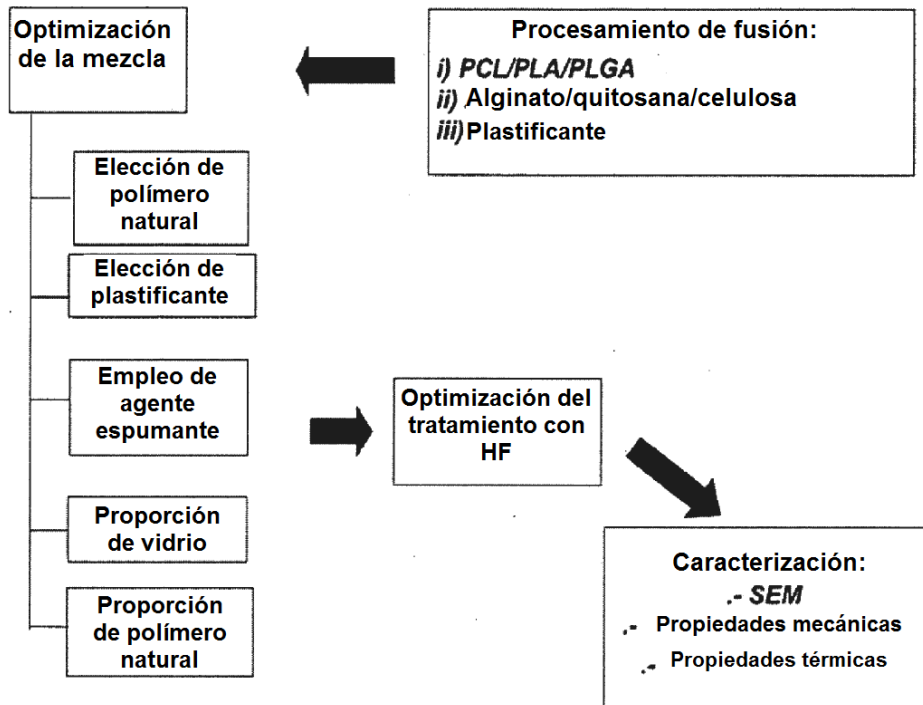


Figura 5

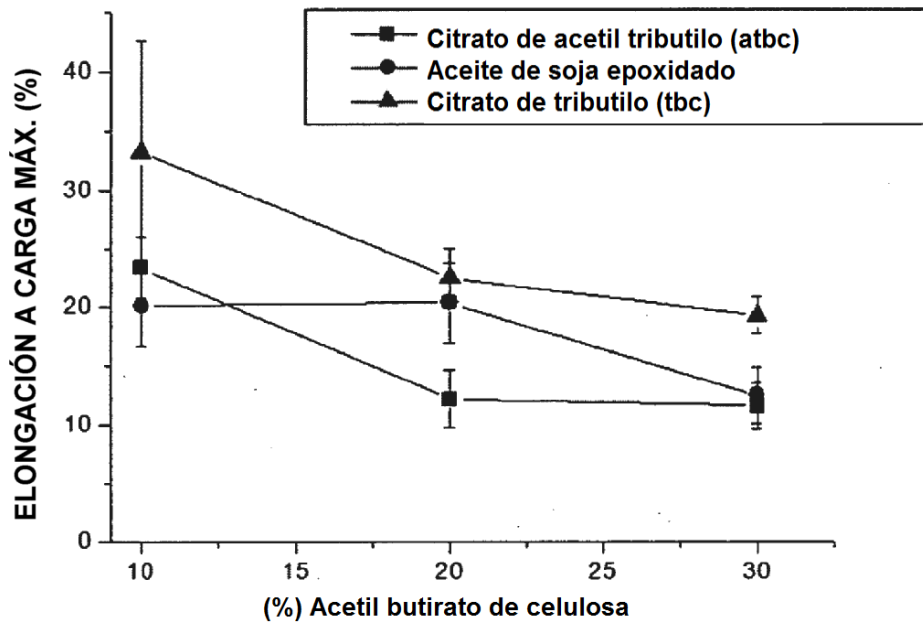


Figura 6

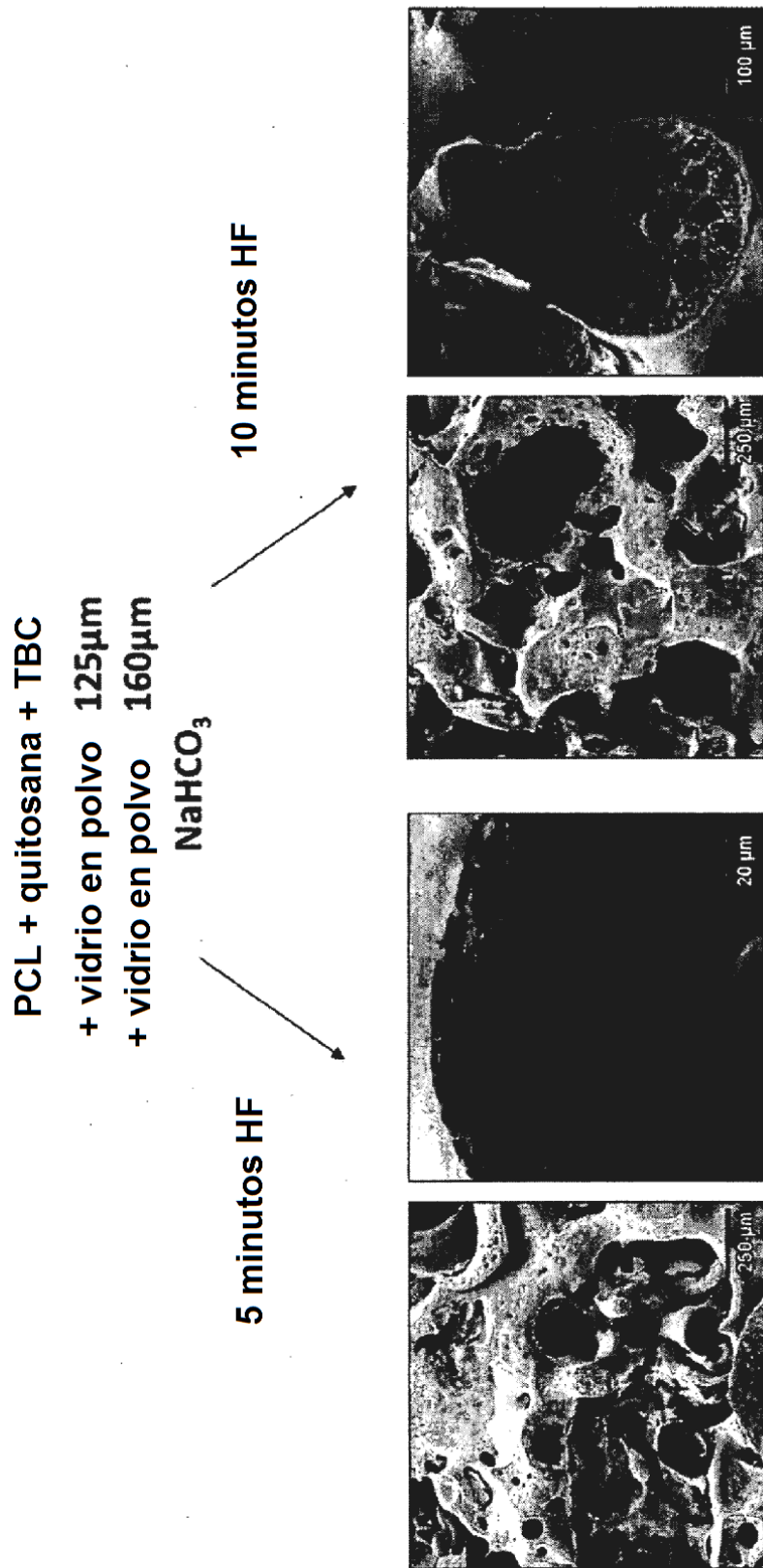


Figura 7

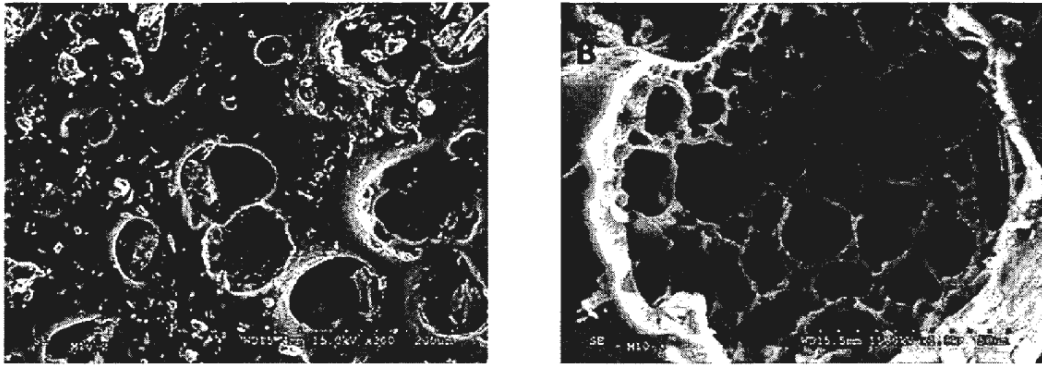


Figura 8

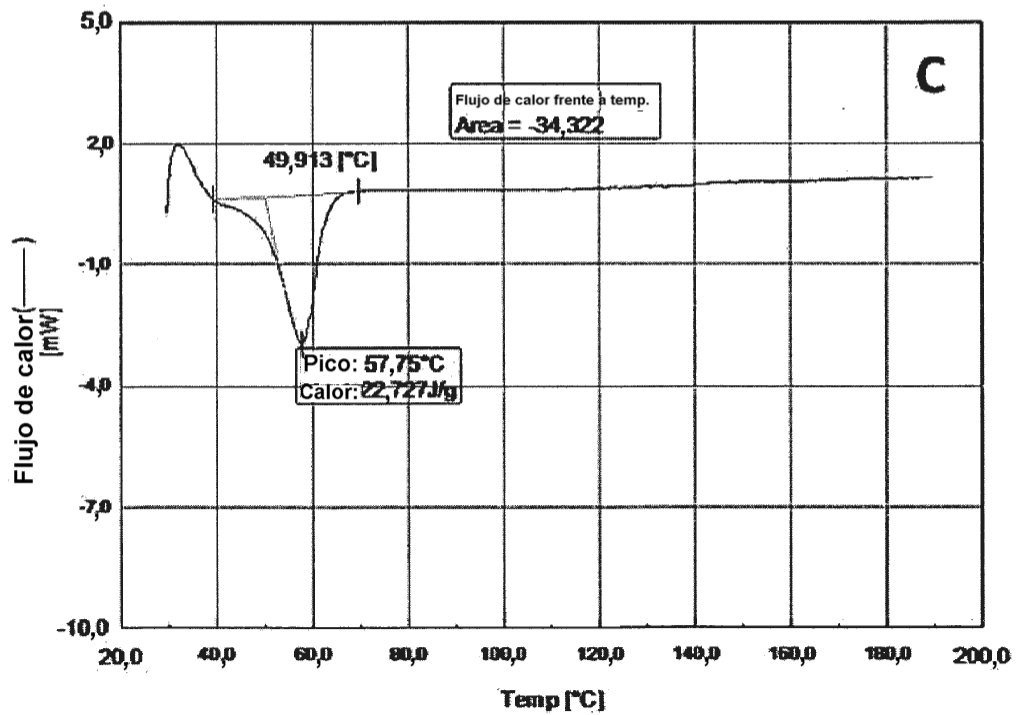
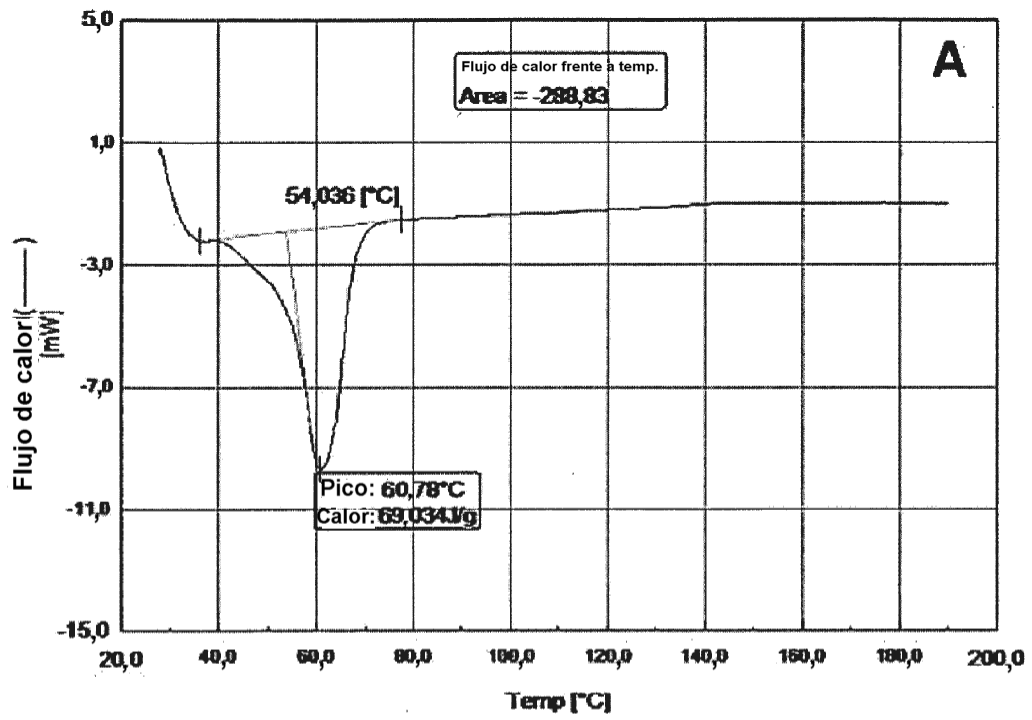


Figura 9 (continuación)

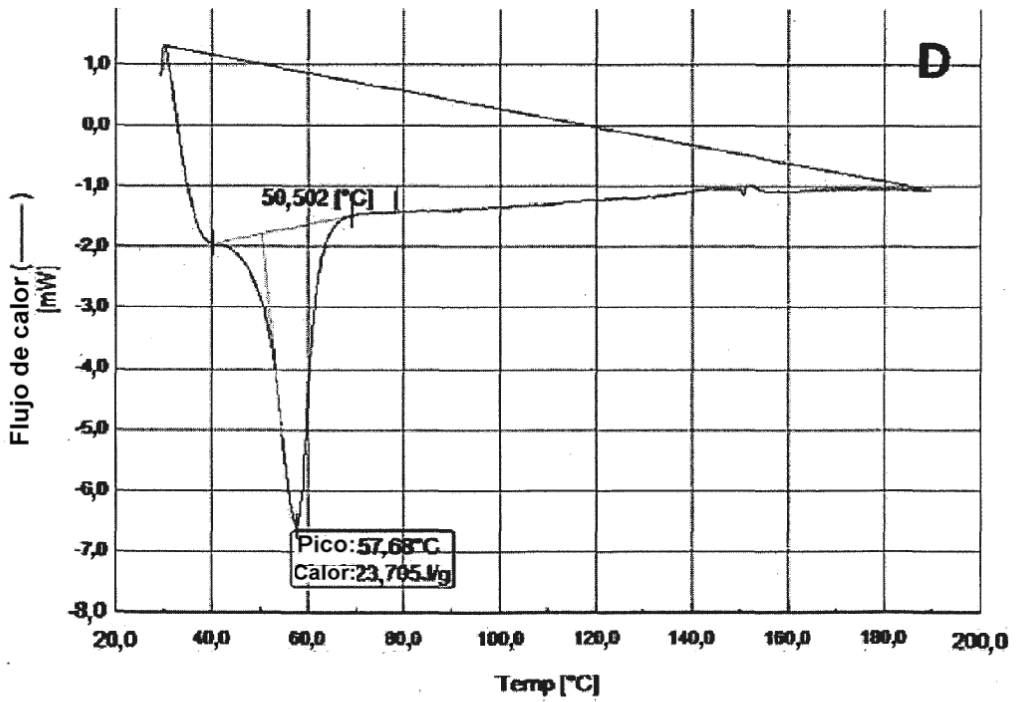
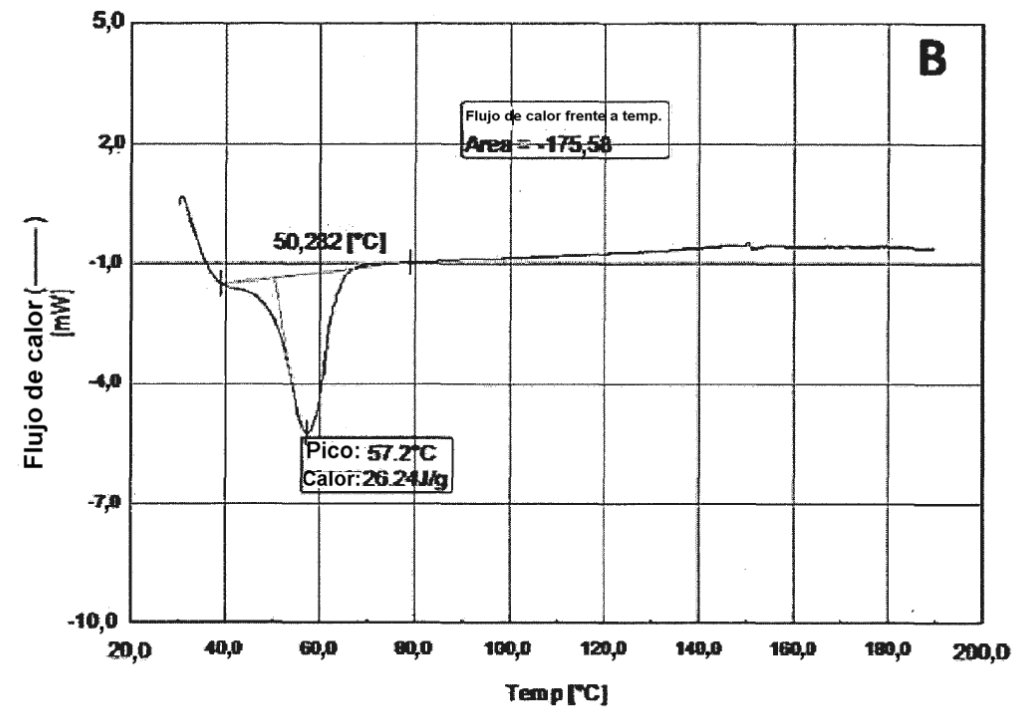
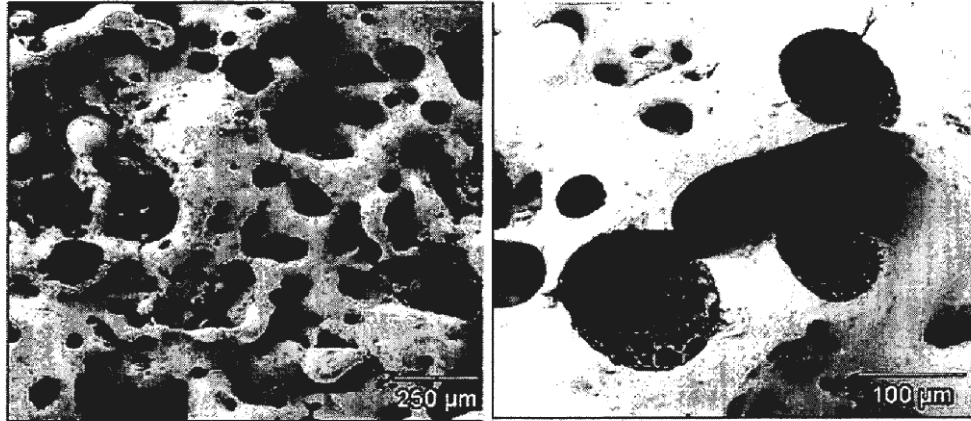
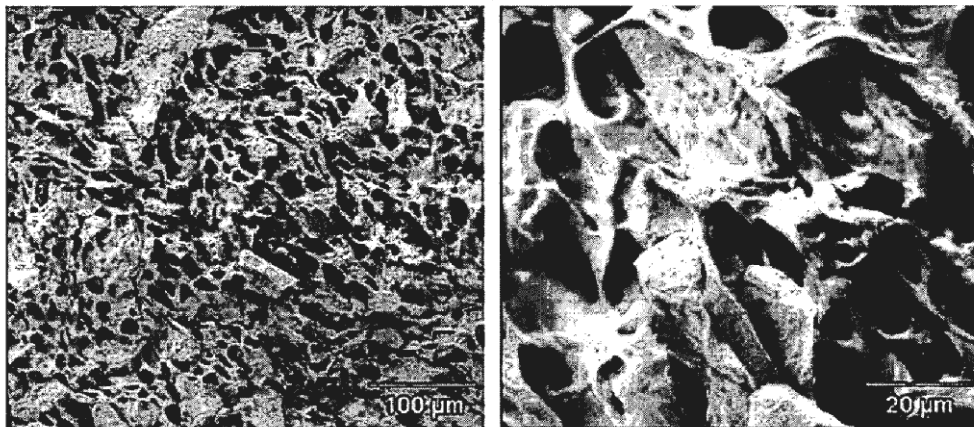


Figura 9

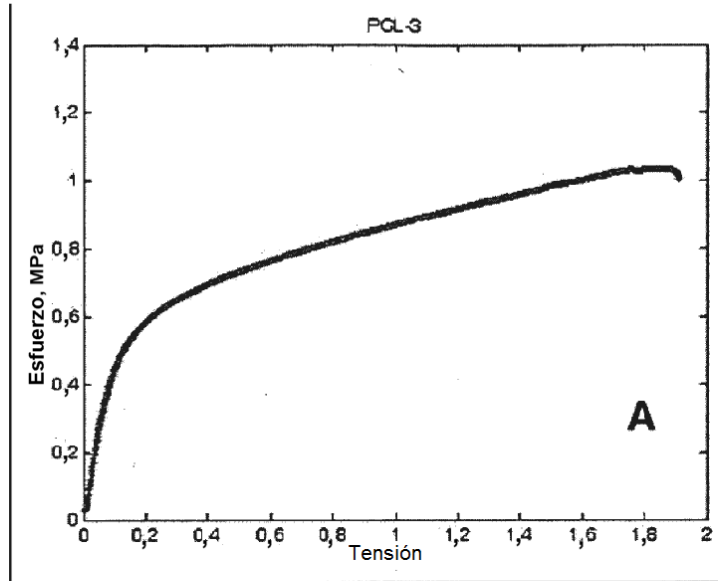


Procesamiento de fusión y tratamiento adicional con HF

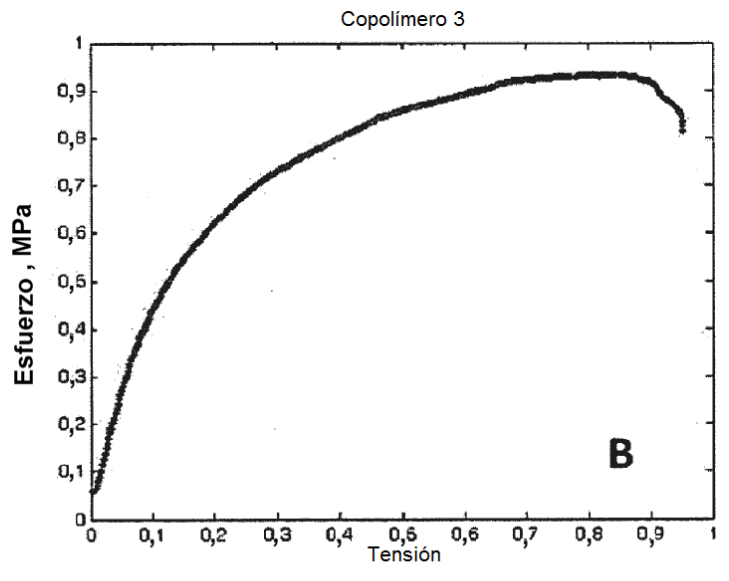


Congelación/inversión de fases

Figura 10

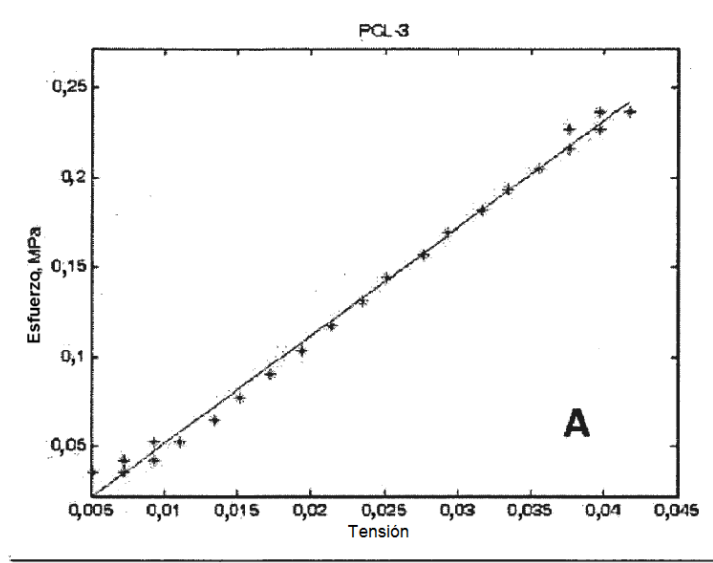


Curva de tensión-esfuerzo de las estructuras PCL-3.
Elongación a rotura 191 %
Resistencia a tracción 1,061 MPa
Dureza 1,5665,705 MPa

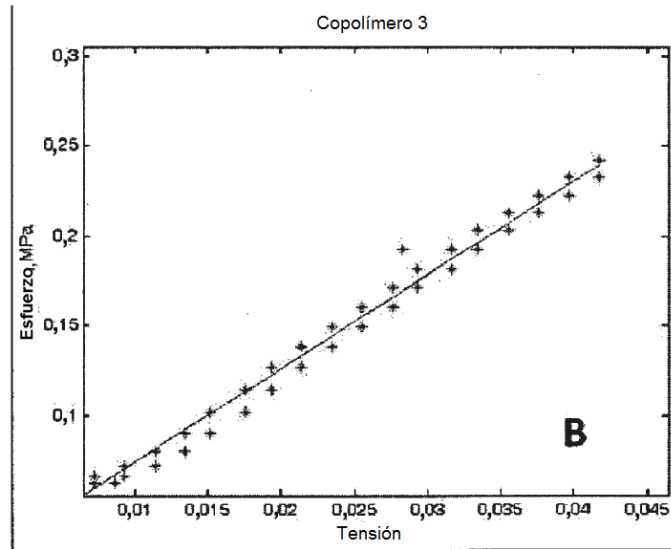


Curva de tensión-esfuerzo del copolímero 2.
Elongación a rotura 257 %
Resistencia a tracción 1,364 MPa
Dureza 3,1229 MPa

Figura11 (continuación)



Curva de tensión-esfuerzo de la estructura PCL 3 hasta el límite elástico. $E_j=6,500$ MPa; $U_e = 0,0048$ MPa



Curva de tensión-esfuerzo del copolímero 3 hasta el límite elástico. $E_j = 5,2164$ MPa; $U_e = 0,0053$ MP3a

Figura 11

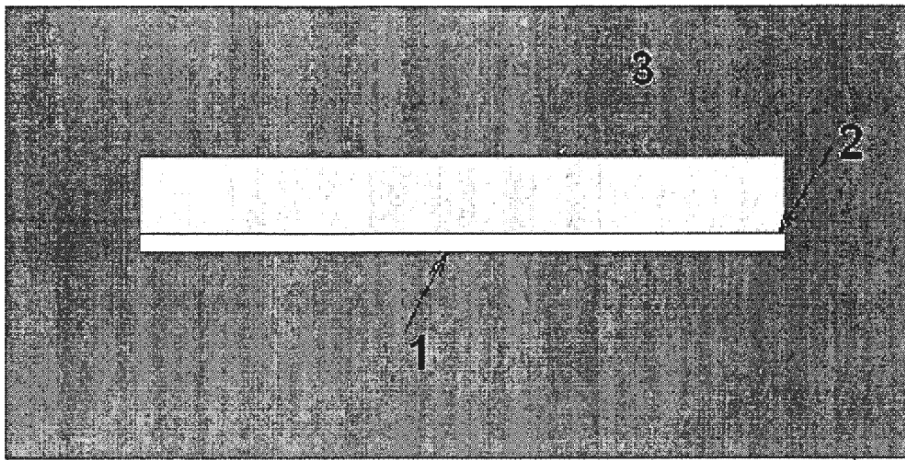


Figura 12

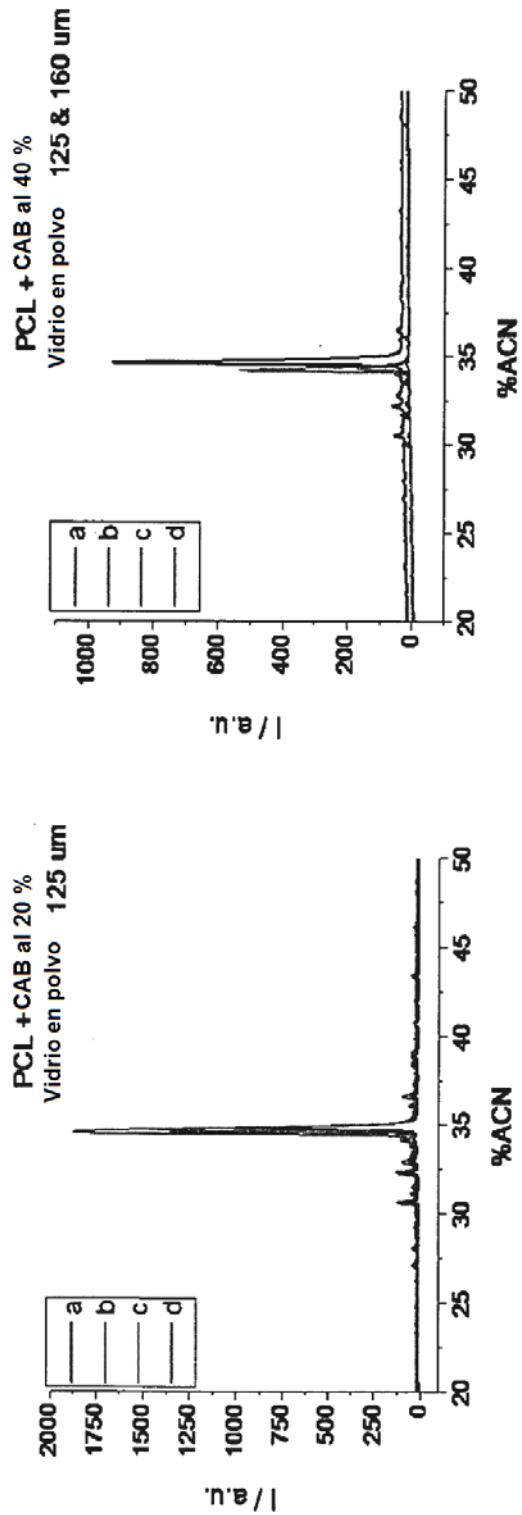


Figura 13

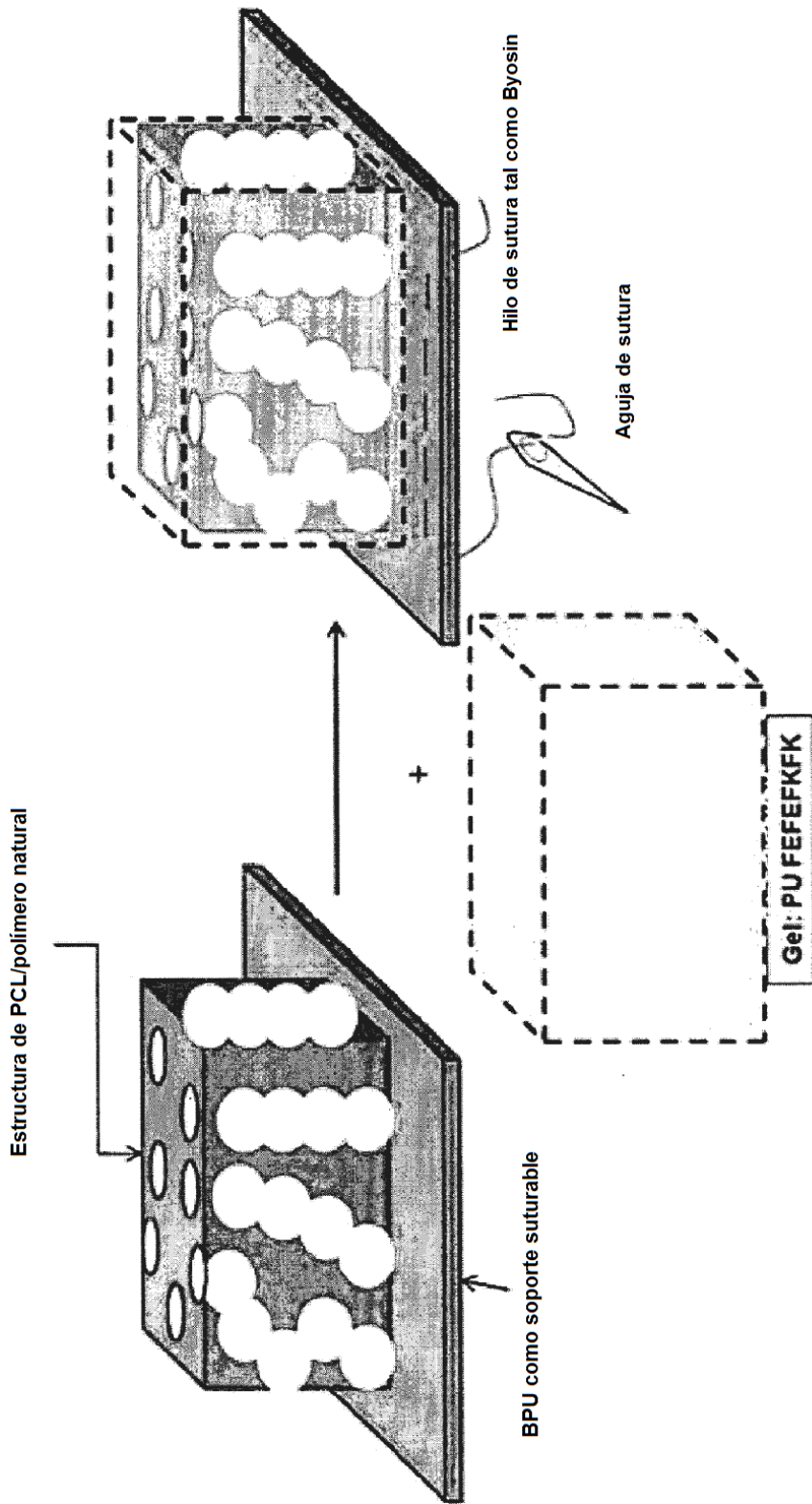


Figura 14

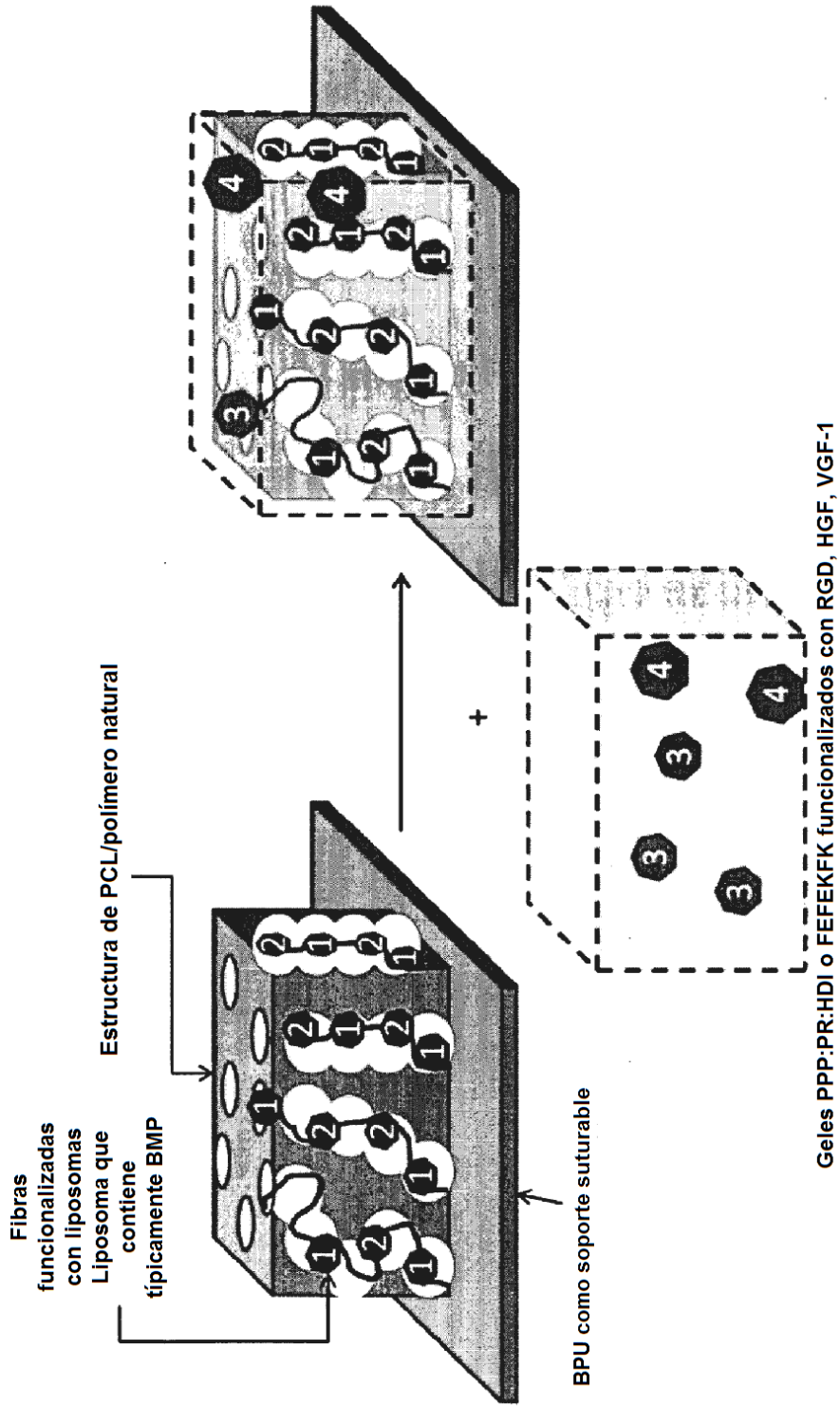


Figura 15

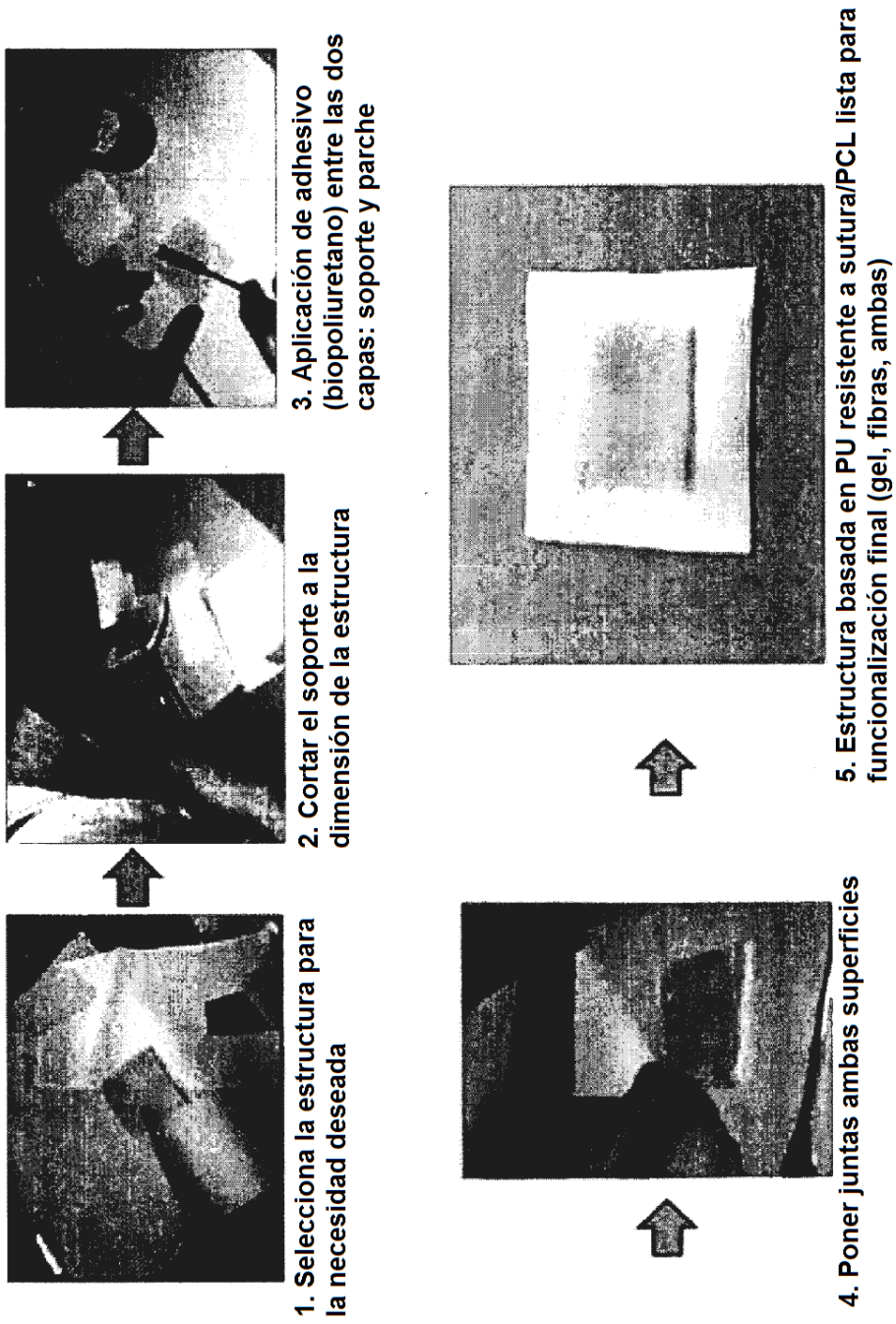


Figura 16

Perfil de liberación del parche cardiaco + nanofibras coaxiales PCL/PVA

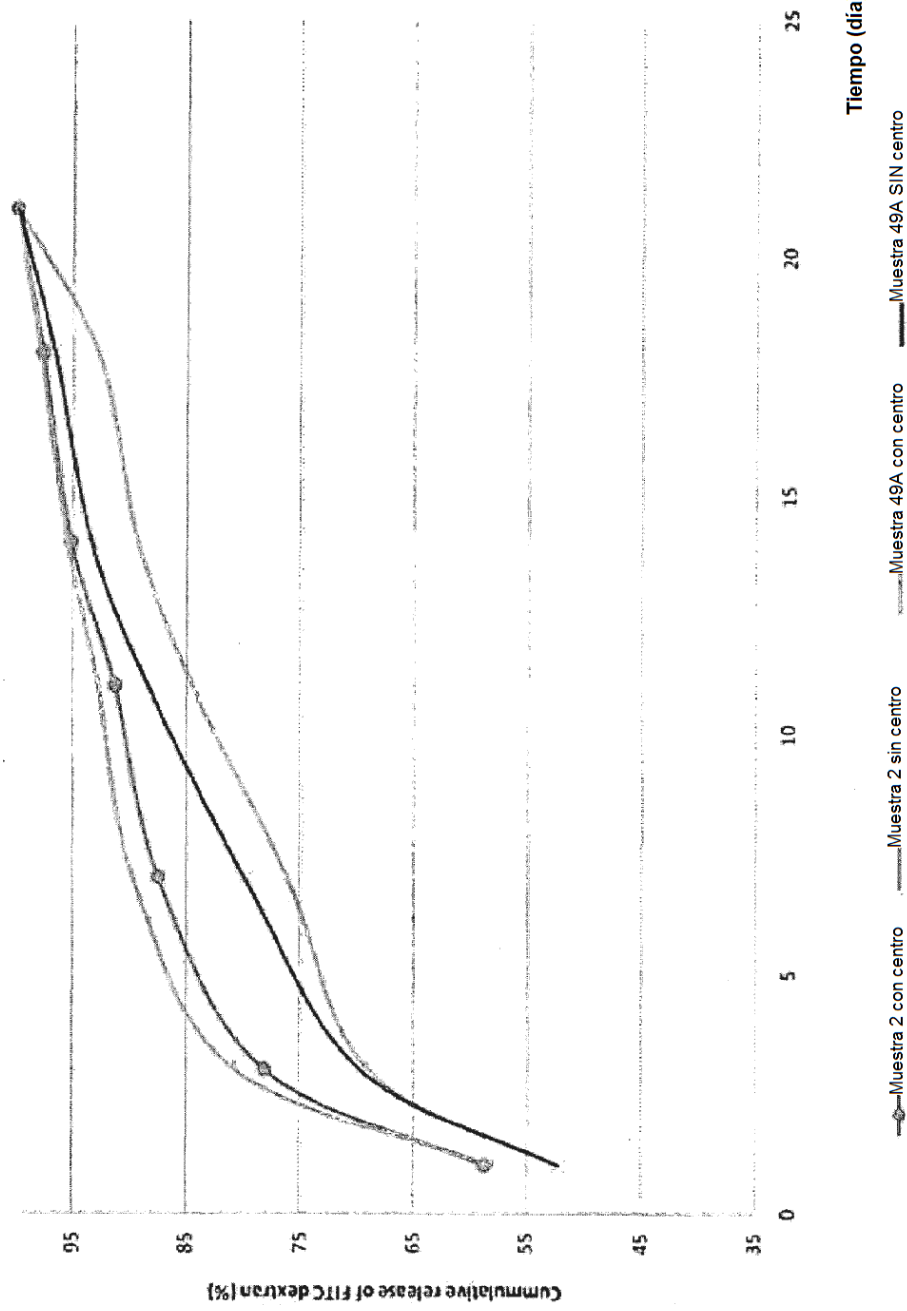
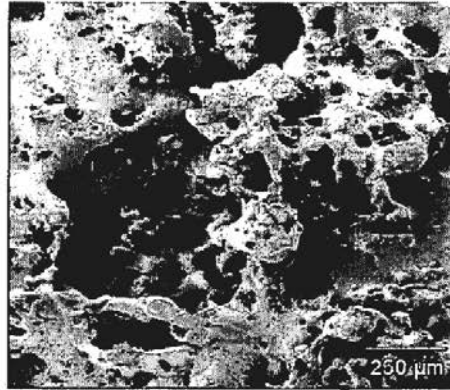


Figura 17 (continuación)

**Parche
inicial**



Electrohilado

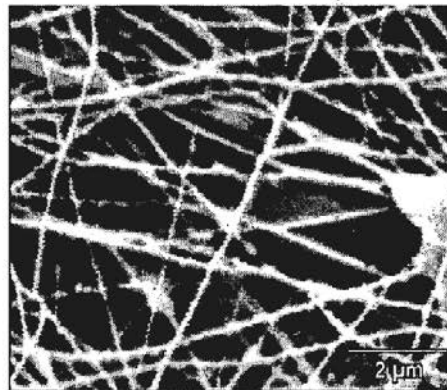


Figura 17

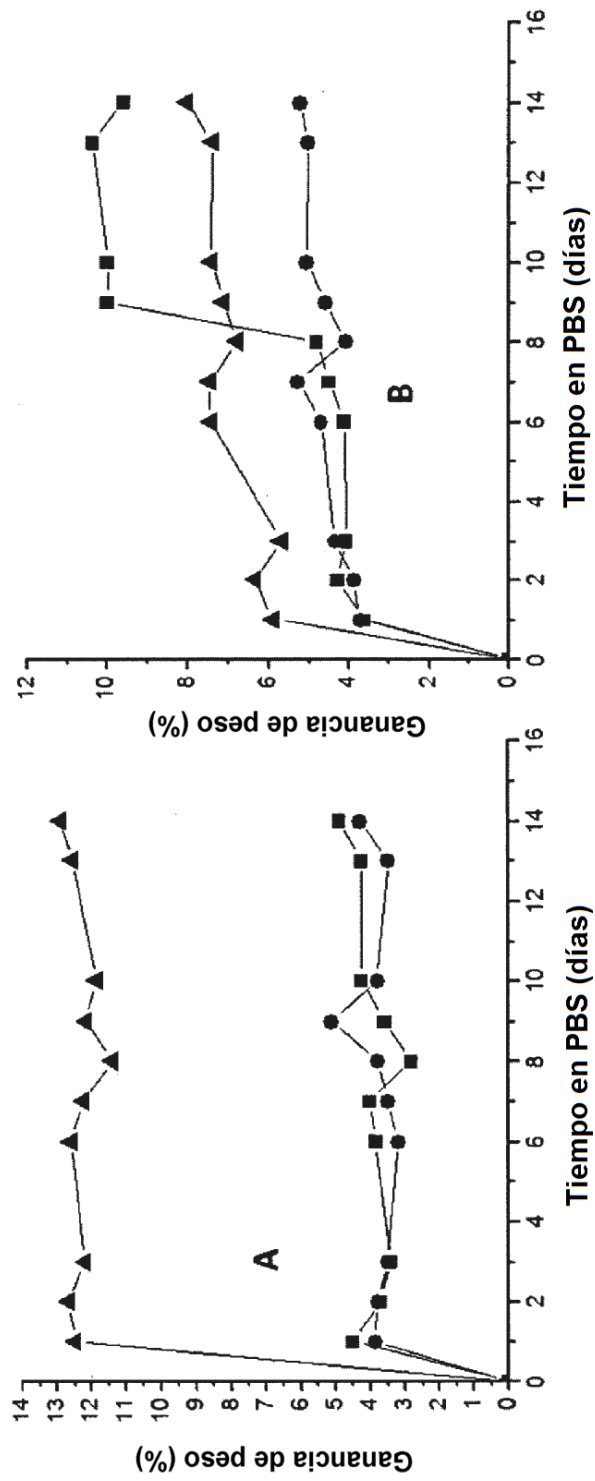


Figura 18

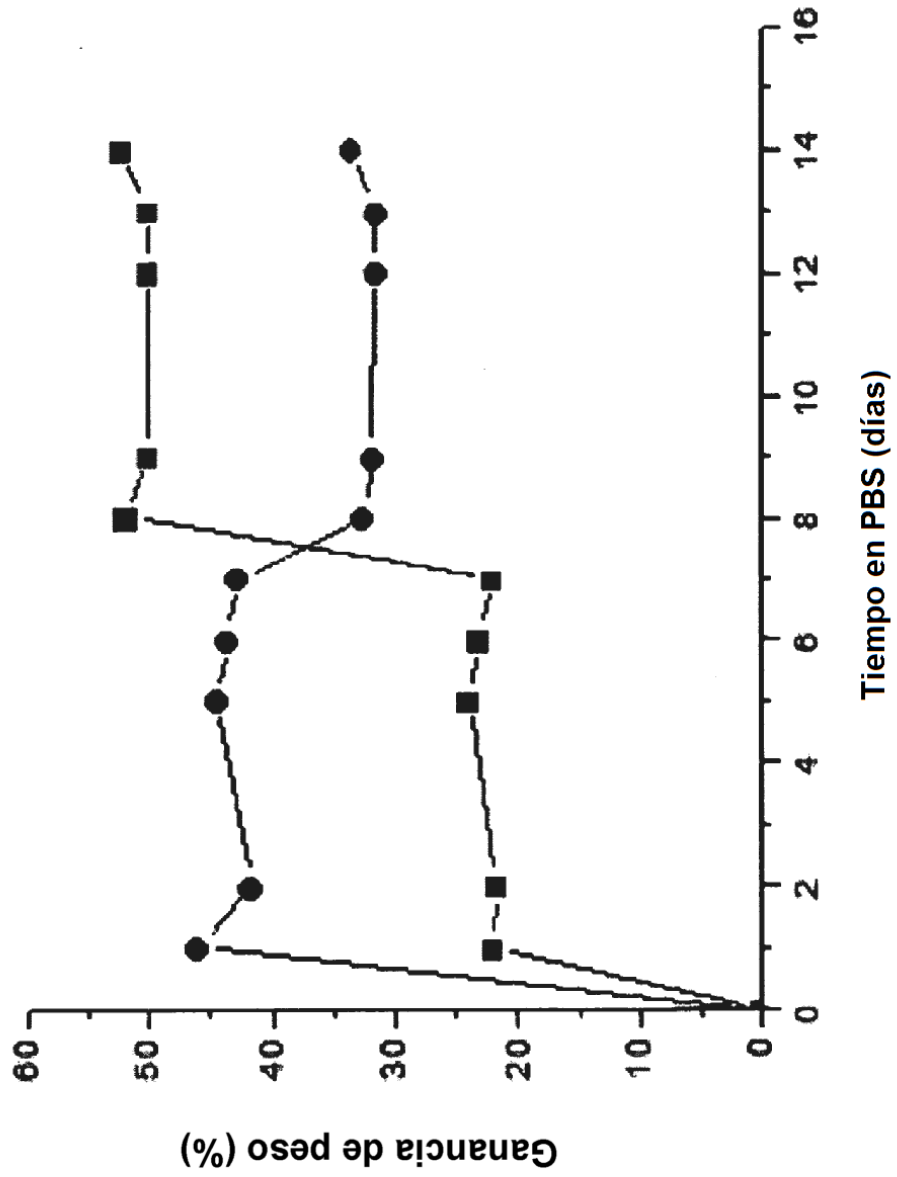
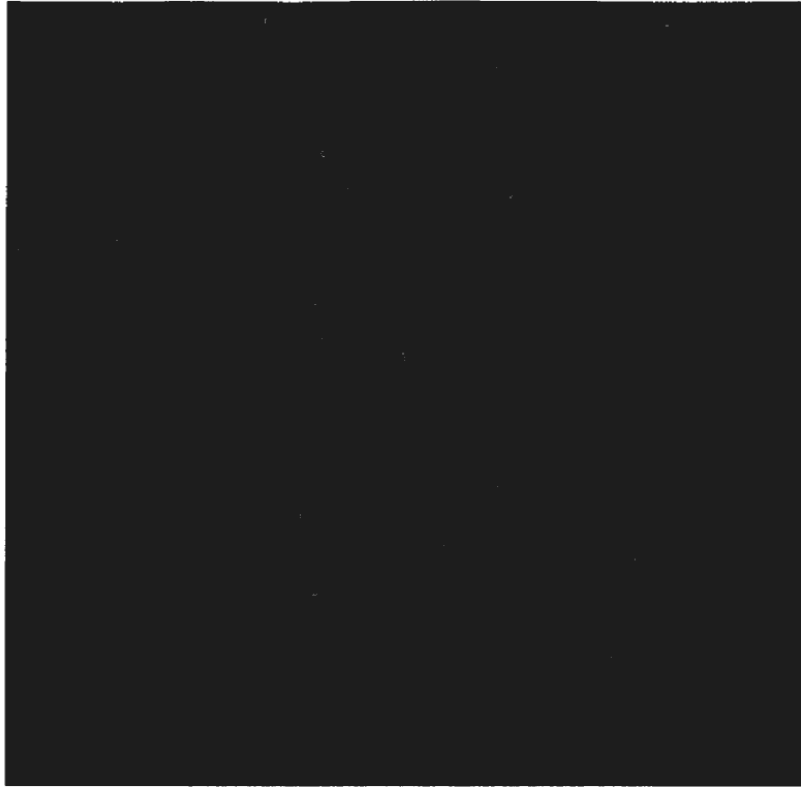
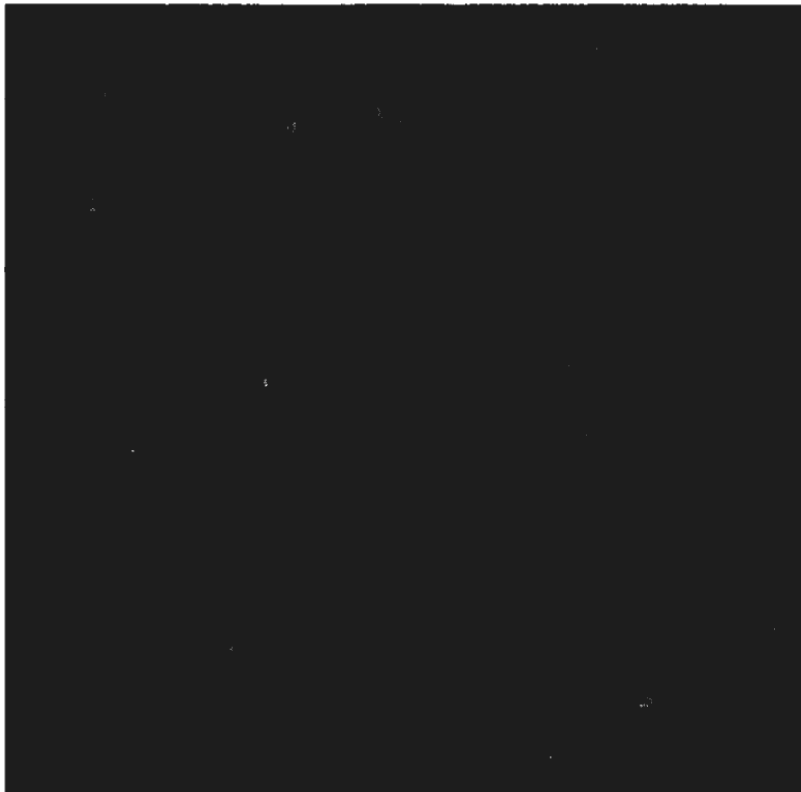


Figura 19



Chl+ BMCs 10x 1272,79 μm x 1272,79 μm x 203,00 μm



Chl + CPC 10x 1272,79 μm x 1272,79 μm x 395,00 μm

Figura 20

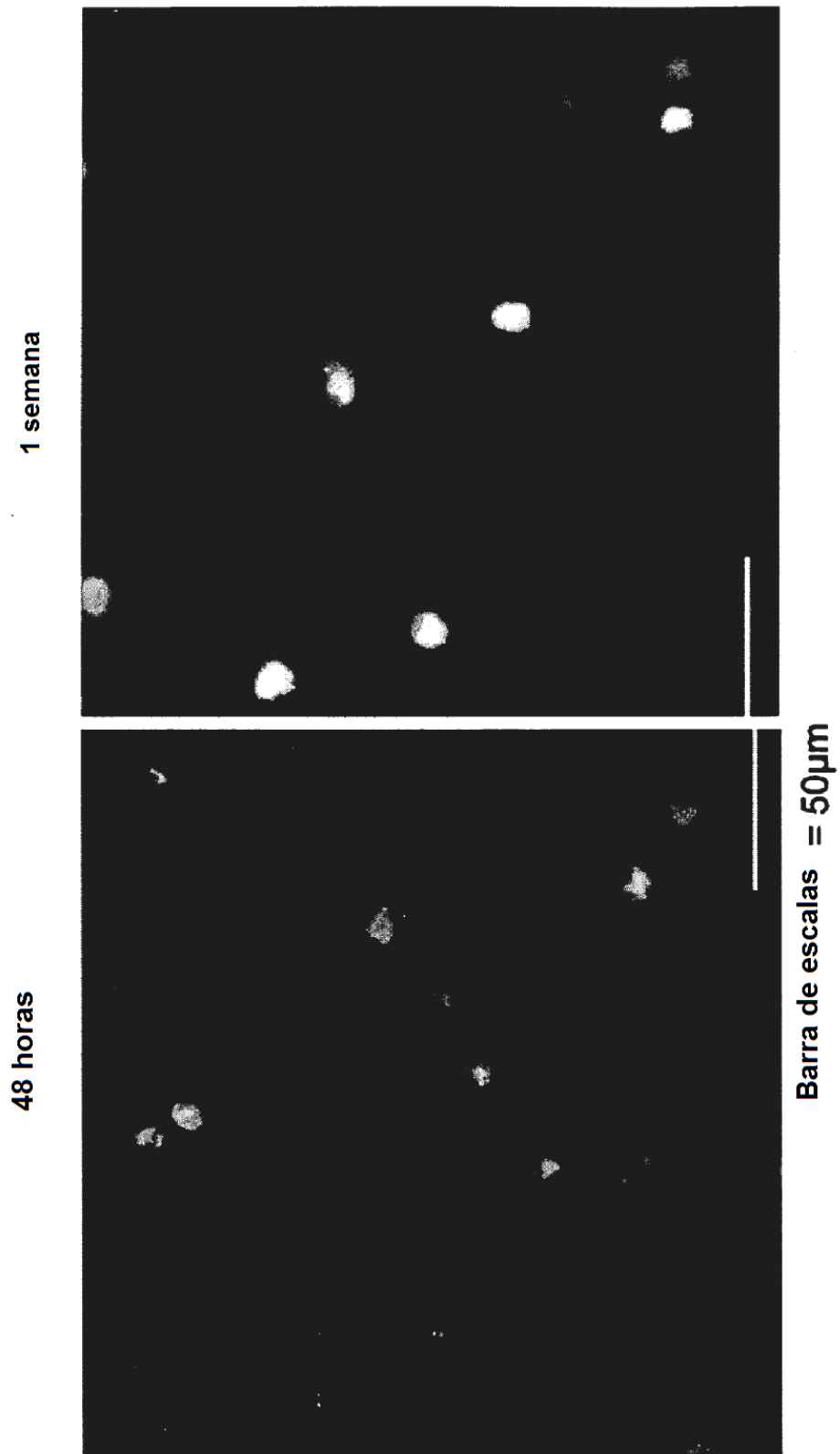
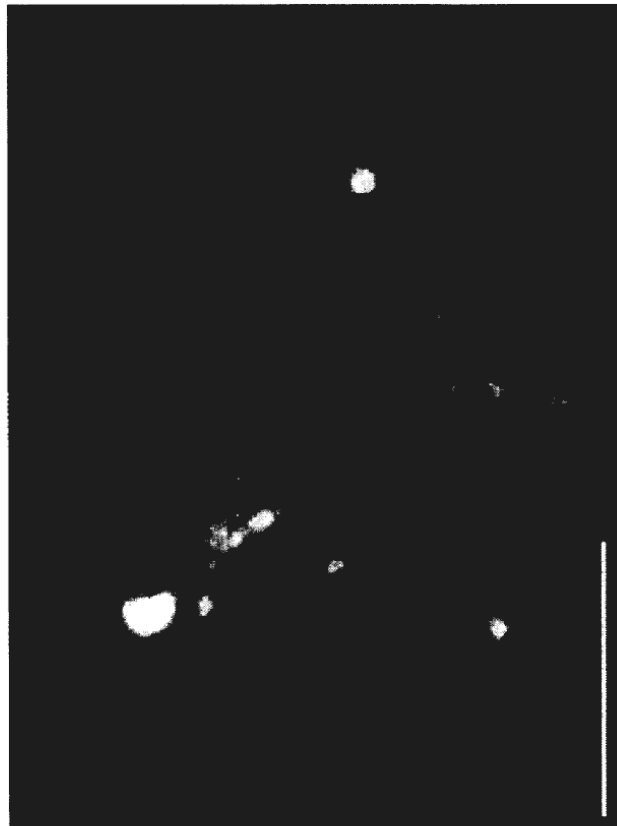


Figura 21

1 semana



48 horas



Barra de escalas = 100µm

Figura 22

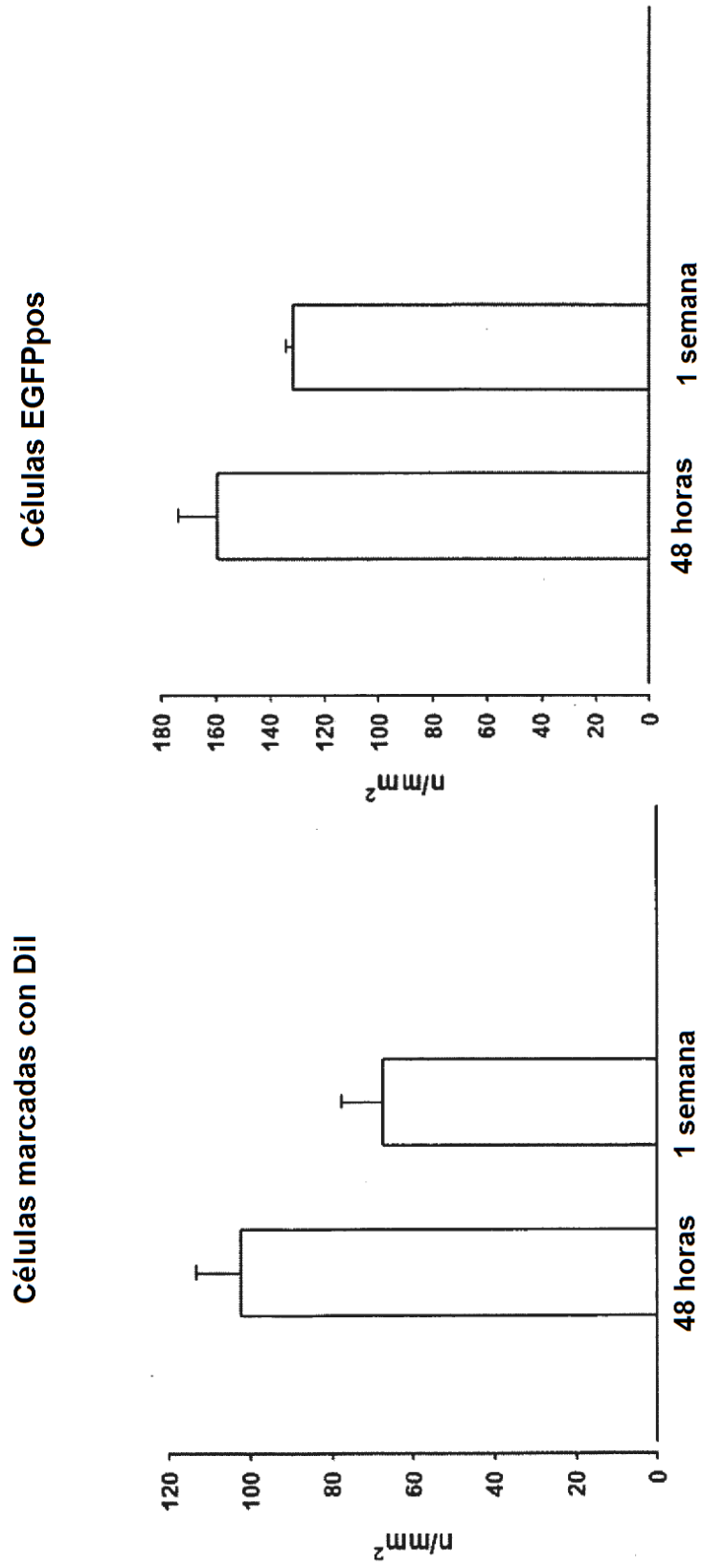


Figura 23



Figura 24

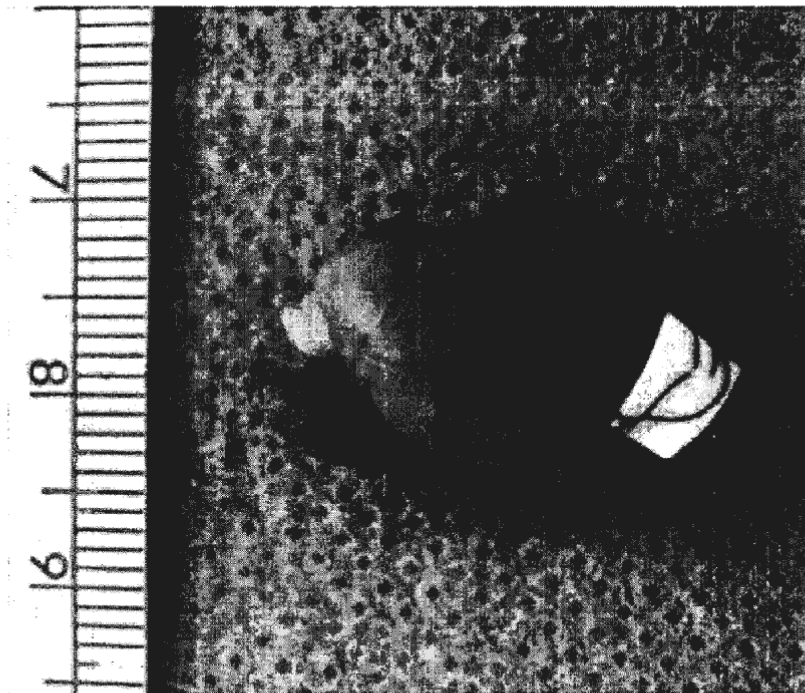


Figura 25

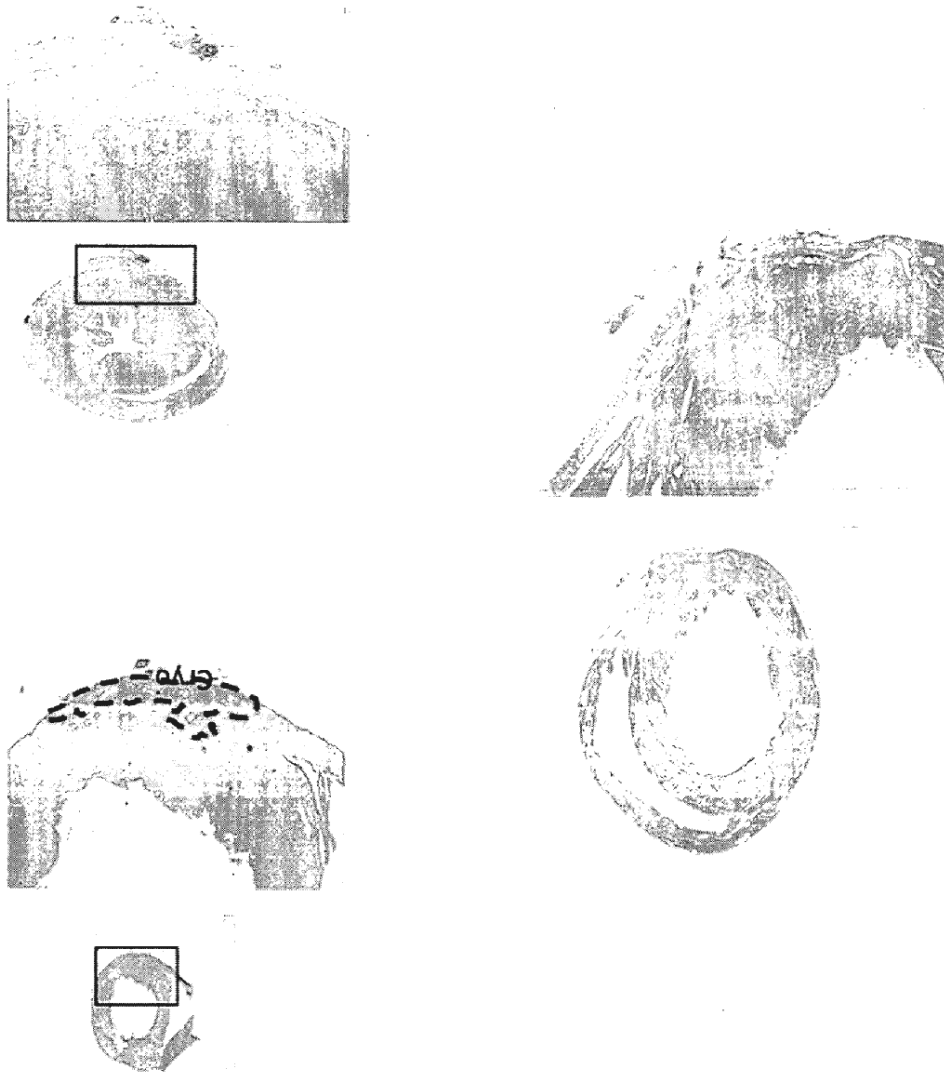


Figura 26

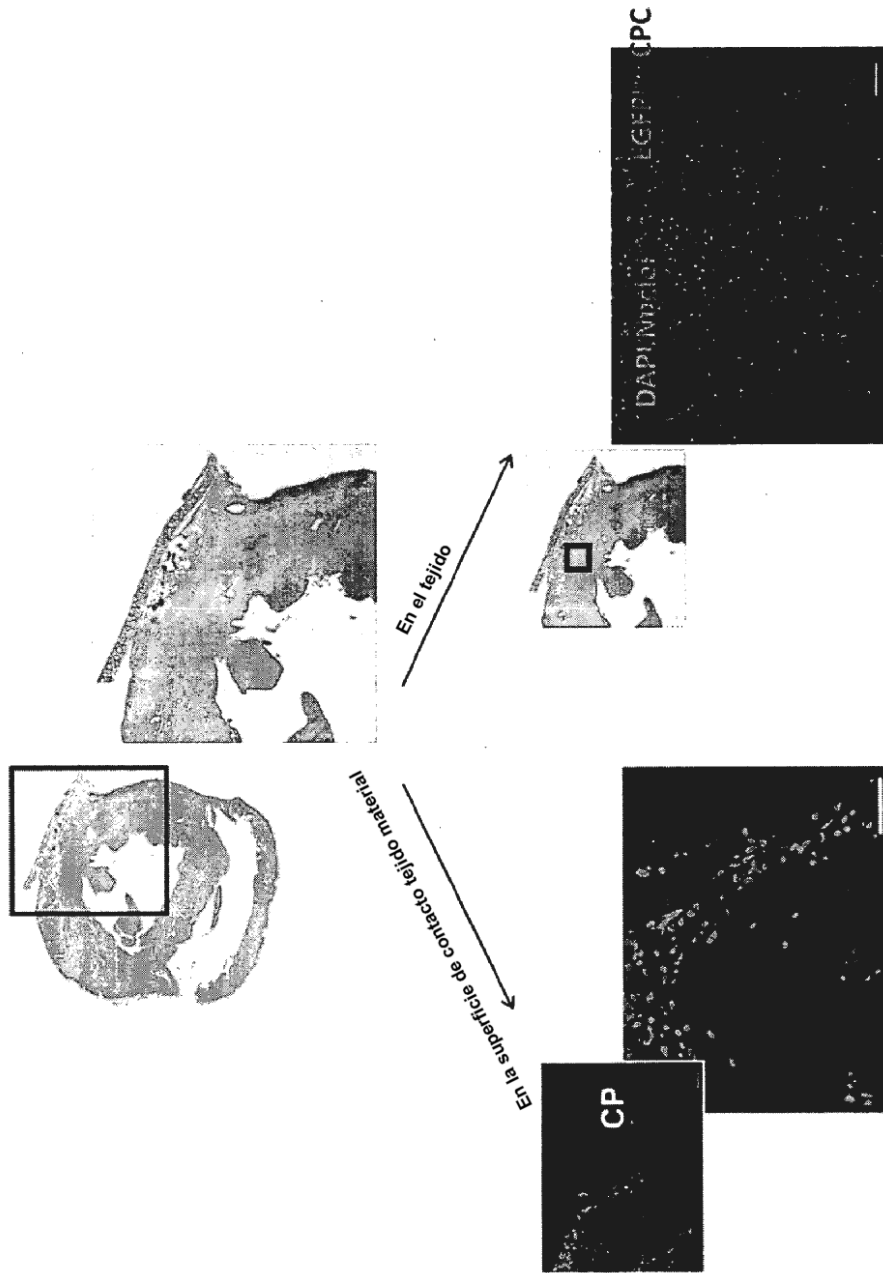


Figura 27