

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 486**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/52** (2006.01)

**A61L 27/54** (2006.01)

**A61L 27/58** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2004 PCT/US2004/013260**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.11.2004 WO04098503**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2004 E 04750930 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 1620038**

54 Título: **Fibra biodegradable liberadora de fármaco para el aporte de agentes terapéuticos**

30 Prioridad:

**02.05.2003 US 428901**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.07.2017**

73 Titular/es:

**BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF  
TEXAS SYSTEM (100.0%)  
201 WEST SEVENTH STREET  
AUSTIN, TX 78701, US**

72 Inventor/es:

**NELSON, KEVIN, D. y  
CROW, BRENT, B.**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 623 486 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**

Fibra biodegradable liberadora de fármaco para el aporte de agentes terapéuticos

**Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención**

- 5 Esta invención se refiere al campo de la medicina y la ingeniería tisular, y en particular a fibras biodegradables liberadoras de fármaco usadas en el aporte de agentes terapéuticos.

**2. Descripción de la técnica relacionada**

- 10 La ingeniería tisular es una disciplina en la que se usan células vivas para reemplazar células perdidas como resultado de una lesión, una enfermedad o un defecto de nacimiento en un animal o un ser humano. Estas células de reemplazo pueden ser autólogas, alogénicas o xenogénicas. El campo de la ingeniería tisular es una nueva área de la medicina y todavía se tienen que dilucidar procedimientos óptimos.

- 15 En la actualidad, existen varios caminos para manipular tejidos mediante ingeniería. Un camino es recoger células de un donante sano, preferiblemente del mismo individuo, o al menos de un donante apropiado de la misma especie, y hacer crecer esas células sobre un armazón in vitro. Este armazón es típicamente una red polimérica tridimensional, a menudo compuesta por fibras biodegradables. A continuación, células adherentes a la red polimérica pueden ser inducidas típicamente a la multiplicación. Este armazón cargado con células se puede implantar en el hospedador dañado con el objetivo de que las células realicen su función fisiológica y evitar la destrucción por el sistema inmunitario del hospedador. A este fin, es importante que se usen líneas celulares purificadas, ya que la introducción de células no autoinmunitarias puede regular al alza un fuerte ataque inmunitario del hospedador. La dificultad con este enfoque es que el armazón debe ser pequeño, ya que ninguna célula puede sobrevivir alejada más de un par de milímetros de una fuente de oxígeno y nutrientes. Por lo tanto, no se pueden usar armazones grandes, ya que el armazón no se vascularizará adecuadamente a tiempo de proteger a las células en las regiones interiores.

- 25 En otro enfoque, un armazón polimérico biodegradable tridimensional vacío se implanta directamente en el paciente, con el objetivo de inducir la migración del tipo correcto de células del cuerpo del hospedador al interior del armazón polimérico. El beneficio es que la vascularización puede ocurrir simultáneamente con la migración de las células al interior de la matriz. Un problema importante es que actualmente no hay modo de asegurar que los tipos de célula apropiados migren al interior del armazón, y que las propiedades mecánicas y biológicas se mantengan para cubrir la necesidad fisiológica del paciente.

- 35 En ambos enfoques anteriores, el armazón puede ser biodegradable, lo que significa que a lo largo del tiempo se descompondrá tanto químicamente como mecánicamente. A medida que se produce esta descomposición, las células secretan su propia matriz extracelular, que representa un papel crítico en la supervivencia y la función celulares. En tejido normal, hay un intercambio recíproco activo y dinámico entre las células constitutivas del tejido y la matriz extracelular circundante. La matriz extracelular proporciona señales químicas que regulan las propiedades morfológicas y los rasgos fenotípicos de células y pueden inducir la división, la diferenciación o incluso la muerte celular. Además, las células también están reordenando constantemente la matriz extracelular. Las células tanto degradar como reconstruyen la matriz extracelular y secretan productos químicos al interior de la matriz para ser usados más tarde por sí mismos u otras células que pueden migrar a la zona. También se ha descubierto que la matriz extracelular es uno de los componentes más importantes en el desarrollo embrionario. Las células pioneras secretan señales químicas que ayudan a las siguientes células a diferenciar en el fenotipo final apropiado. Por ejemplo, tales señales químicas provocan la diferenciación de células de la cresta neural en axones, células del músculo liso o neuronas.

- 45 La relación integrada entre la matriz extracelular y las células del tejido establece la matriz extracelular como un parámetro importante en la ingeniería tisular. Si se desea que las células se comporten de un modo específico, entonces la matriz extracelular debe proporcionar el ambiente apropiado y las señales químicas/biológicas apropiadas para inducir ese comportamiento para ese tipo de célula. Actualmente, no es posible reproducir fielmente una matriz extracelular biológicamente activa. Por consiguiente, algunos investigadores usan una matriz biodegradable que permite que las células creen su propia matriz extracelular a medida que la matriz exógena se degrada.

- 55 En los enfoques descritos anteriormente para manipular tejidos mediante ingeniería, un armazón polimérico proporciona no solo el soporte mecánico sino también la conformación tridimensional que se desea para el nuevo tejido u órgano. Debido a que las células deben estar cerca de una fuente de oxígeno y nutrientes a fin de sobrevivir y funcionar, una importante limitación actual es la del suministro de sangre. La mayoría de las metodologías actuales

no proporcionan medios específicos para ayudar activamente a la incorporación de vasos sanguíneos dentro y a través de la matriz polimérica. Esto plantea limitaciones sobre el tamaño físico y la conformación de la matriz polimérica. El único tejido actual que se ha elaborado con un amplio uso clínico es la piel artificial, que por definición es de grosor limitado. La presente invención proporciona composiciones y métodos que promueven la migración dirigida de tipos de célula apropiados al interior de la matriz extracelular manipulada mediante ingeniería. Al dirigir la migración celular tridimensional y los patrones funcionales específicos, se puede inducir la vascularización dirigida, que vence las limitaciones actuales sobre la conformación y el tamaño de los implantes poliméricos. También asegura que tipos de células apropiados se sitúen físicamente en localizaciones específicas dentro de la matriz. Se proporcionan métodos y composiciones para modular la expresión fenotípica como una función tanto del tiempo como del espacio.

La mayoría del aporte de fármacos desde vehículos cargados con fármaco poliméricos se basa en los siguientes formatos: microesferas, nanopartículas, espumas, películas, liposomas, micelas poliméricas o empaquetamientos virales. Existe un número de desventajas inherentes con respecto a los formatos mencionados anteriormente. Varios de los formatos de aporte de fármacos mencionados anteriormente no permanecen en su lugar después de que se hayan implantado. Como resultado, no es posible la retirada del implante en el caso de una reacción adversa al implante. Adicionalmente, estos formatos exhiben una gran superficie específica por unidad de volumen, lo que conduce a tiempos de liberación de fármaco rápidos, una característica que es antitética con el objetivo del aporte del fármaco. Por otra parte, la cantidad de fármaco que se puede cargar en los formatos mencionados anteriormente está algo limitada. Algunos de estos formatos no se pueden usar en condiciones que además del aporte del fármaco, también requieren soporte mecánico.

El documento WO 01/10421 describe composiciones de ingeniería tisular, armazones y métodos que comprenden fibras poliméricas biodegradables para el aporte controlado de agentes terapéuticos. Particularmente, se describen fibras poliméricas degradables que comprenden nanoesferas de hidrogel (cargadas con moléculas biológicas). Ejemplos de agentes terapéuticos que pueden ser aportados por las fibras son factores de crecimiento (tales como promotores de la angiogénesis/la regeneración nerviosa), citocinas y virus. El documento WO 01/10421 divulga un gradiente de agente activo a lo largo del eje. La presente invención proporciona una composición fibrosa que no posee las desventajas de los formatos de aporte de fármacos conocidos en la técnica anterior.

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a composiciones fibrosas que comprenden geles o hidrogeles. La invención se refiere además a la composición de una fibra biodegradable cargada con gel o hidrogel y a métodos para fabricar tales fibras. La presente invención proporciona además composiciones de ingeniería tisular y aporte de fármacos y métodos en los que se preparan matrices tridimensionales para hacer crecer células para uso in vitro e in vivo. La invención también se refiere a métodos para manipular la velocidad de liberación del agente terapéutico tanto al cambiar las propiedades del polímero biodegradable como alterar las propiedades del gel o hidrogel incorporado.

Una realización de la invención proporciona una composición de aporte de fármaco que comprende al menos una fibra, en donde dicha fibra comprende una primera capa integrante y una segunda capa integrante, y en donde dicha primera capa integrante es un polímero biodegradable y dicha segunda capa integrante se selecciona del grupo que consiste en un gel y un hidrogel, en donde la primera capa integrante está presente en la pared externa de la fibra y la segunda capa integrante está presente en el alma de la fibra, y en la que un agente terapéutico está cargado en el gel o el hidrogel, y en donde la concentración del gel o el hidrogel varía como una función de la distancia a lo largo del eje largo de la fibra. Una realización adicional de la invención proporciona una composición de armazón que comprende una o más fibras, en donde dichas fibras comprenden una primera capa integrante y una segunda capa integrante, y en donde dicha primera capa integrante es un polímero biodegradable y dicha segunda capa integrante se selecciona del grupo que consiste en un gel y un hidrogel, en donde la primera capa integrante está presente en la pared externa de la fibra y la segunda capa integrante está presente en el alma de la fibra, y en la que un agente terapéutico está cargado en el gel o el hidrogel, y en donde la concentración del gel o el hidrogel varía como una función de la distancia a lo largo del eje largo de la fibra. Realizaciones de la invención también proporcionan métodos de fabricación de las fibras de la presente invención.

### Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor mediante referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en esta memoria. Los dibujos no pretenden limitar el alcance de la invención.

La Figura 2A representa una fibra de dos componentes con un alma (60) de gel o hidrogel y una pared que comprende un polímero (20) hidrófobo.

La Figura 2B representa una fibra de dos componentes con un alma (60) de gel o hidrogel, una pared que comprende un polímero (20) hidrófobo, y una emulsión (30) acuosa.

La Figura 2C representa una fibra de dos componentes con un alma (60) de gel o hidrogel, una pared que comprende un polímero (20) hidrófobo, y una emulsión (40) de gel o hidrogel.

- 5 La Figura 2D representa una fibra de dos componentes con un alma (60) de gel o hidrogel, una pared que comprende un polímero (20) hidrófobo tanto emulsiones acuosas como emulsiones (50) de gel o hidrogel.

La Figura 4B representa una fibras de varios componentes con un alma (60) de gel o hidrogel rodeada por dos paredes (20 y 100) de polímero hidrófobo, comprendiendo la pared de polímero externa una emulsión (30) acuosa y comprendiendo la pared de polímero interna una emulsión (40) de gel o hidrogel.

- 10 La Figura 6A representa una fibra de dos componentes con un alma (90) de polímero hidrófobo que comprende una emulsión y una emulsión (50) de gel o hidrogel y una pared que comprende un polímero (20) hidrófobo que comprende una emulsión (40) de gel o hidrogel.

- 15 La Figura 6B representa una fibra de dos componentes con un alma (90) de polímero hidrófobo que comprende una emulsión acuosa (30) y una pared que comprende un polímero (20) hidrófobo que comprende una emulsión acuosa y una emulsión (50) de gel o hidrogel.

La Figura 6C representa una fibra de dos componentes con un alma (90) de polímero hidrófobo que comprende una emulsión (40) de gel o hidrogel y una pared que comprende un polímero (20) hidrófobo que comprende una emulsión acuosa y una emulsión (50) de gel o hidrogel.

- 20 La Figura 6D representa una fibra de dos componentes con un alma (90) de polímero hidrófobo que comprende emulsiones tanto acuosa como de gel o hidrogel (50) y una pared que comprende un polímero (20) hidrófobo que comprende emulsiones tanto acuosa como de gel o hidrogel (50).

La Figura 7 representa un aparato de extrusión en húmedo usado para extruir fibras la invención.

La Figura 8 representa una hilera usada en la presente invención.

La Figura 9 representa un aparato triple usado en la extrusión de fibras de la invención.

- 25 La Figura 10 representa una hilera triple usada en la fabricación de fibras de varios componentes.

La Figura 11 representa el flujo de un agente terapéutico a través de las paredes de una fibra cargada con emulsión.

### Descripción de realizaciones ilustrativas

- 30 Una realización de la invención proporciona una composición de aporte de fármaco que comprende al menos una fibra, en donde dicha fibra comprende un primer componente y un segundo componente, y en donde dicho primer componente es un polímero biodegradable y dicho segundo componente se selecciona del grupo que consiste en un gel y un hidrogel. Una realización adicional de la invención proporciona una composición de armazón que comprende una o más fibras, en donde dichas fibras comprenden un primer componente y un segundo componente, y en donde dicho primer componente es un polímero biodegradable y dicho segundo componente se selecciona del grupo que consiste en un gel y un hidrogel. Realizaciones de la invención también proporcionan métodos para  
35 fabricar las fibras de la presente invención.

- Una realización de la invención proporciona una fibra de dos componentes en la que el alma interior de la fibra, es decir, el diámetro interno de la fibra, comprende un gel o hidrogel y la pared exterior de la fibra comprende un polímero biodegradable. Según se usa en la presente, el término "gel" se refiere a un sistema coloidal con al menos  
40 dos fases, una de las cuales forma una red tridimensional continua que actúa como un sólido elástico. Según se usa en la presente, el término "hidrogel" se refiere a un coloide en el que una fase dispersada (coloide) está combinada con una fase continua (agua) para producir un producto gelatinosos viscoso.

- 45 En una realización de la invención, las fibras descritas anteriormente se combinan con fibras de composición similar. En otras realizaciones, se combinan fibras de tipo y composición diferentes.

En una realización, se incorpora un agente terapéutico en una o más de las fibras descritas anteriormente, presente individualmente o en combinación. En otras realizaciones, se incorpora un fármaco en una o más de las fibras descritas anteriormente, presente individualmente o en combinación.

5 En ciertas realizaciones de la invención, una capa de una fibra circunscribe una capa de una fibra interior adyacente. La fibra interior está aproximadamente centrada dentro de la fibra exterior. En ciertas realizaciones, una o más de las capas de las fibras circunscritas comprenden un hidrogel o un gel en la pared de la fibra o en el alma de la fibra. En realizaciones adicionales, un gel o un hidrogel se incorpora como una fase dispersada dentro del polímero biodegradable de una o más capas de las fibras. Realizaciones adicionales de la invención proporcionan fibras de  
10 varias capas, donde cada capa comprende composiciones variables de geles, hidrogeles y agentes terapéuticos. Ciertas realizaciones de la invención proporcionan fibras que comprenden más de un tipo de agente terapéutico dentro de sus una o más capas.

15 La invención se refiere además a métodos para manipular la velocidad de liberación del agente terapéutico tanto al cambiar las propiedades del polímero biodegradable como al alterar las propiedades del gel o hidrogel incorporado. Una fibra cargada con agente terapéutico es adecuada para la implantación en animales, o más preferiblemente en seres humanos bien como hebras individuales para el uso como vehículos de aporte de agente terapéutico, o bien junto con otras fibras (de tipo bien similar o bien diferente) para la formación de un almacén basado en fibras para el uso en ingeniería tisular, curación de heridas, medicina regenerativa u otras aplicaciones médicamente relacionadas.  
20 Estas fibras también se pueden usar fuera del cuerpo para crear almacenes para cultivo celular, cultivo tisular u organogénesis in vitro, en donde las estructuras tridimensionales específicas de estas fibras pueden estar tejidas, tricotadas, trenzadas, ser usadas como una malla no tejida, o estar mantenidas como series paralelas, no paralelas, retorcidas o aleatorias para la creación de almacenes tridimensionales complejos. Como cada fibra dentro de dicho almacén fibroso podría estar cargada con diferentes agentes terapéuticos, y cada una con un perfil cinético de liberación diferente, es posible inducir un crecimiento celular específico en regiones específicas del almacén. Esto proporciona la capacidad de crear una arquitectura biológica tridimensional complicada mediante la colocación deliberada de fibras específicas en emplazamientos específicos dentro del almacén fibroso. Estas estructuras biológicas tridimensionales pueden ser de diseño biométrico o no. Por los mismos medios, es posible liberar diferentes agentes terapéuticos hacia una sección del cultivo celular, el cultivo tisular o el organoide que a otra  
25 dentro de la misma muestra.

Este tipo de fibra tridimensional compleja también se puede implantar dentro de un animal o un ser humano para inducir respuestas biológicas específicas en diferentes emplazamientos dentro de dicho almacén fibroso. Esto se consigue al diseñar el almacén fibroso de modo que fibras con agentes terapéuticos específicos y perfiles de liberación específicos se sitúen en emplazamientos específicos dentro del almacén. Esto permite el control del aporte tanto temporal como espacial del agente terapéutico desde el almacén fibroso.  
35

"Patrón heterogéneo definido" en el contexto de la presente solicitud significa la incorporación de fibras específicas en una matriz de almacén de modo que se alcance una distribución tridimensional deseada de uno o más agentes terapéuticos dentro de la matriz de almacén. La distribución de agentes terapéuticos dentro de las fibras, y posiblemente dentro de sus centros, controla la distribución espacial posterior dentro del medio intersticial del almacén matricial después de la liberación de los agentes desde las fibras poliméricas. De este modo, se pueden crear contornos espaciales de gradientes de concentración deseados dentro de la estructura del almacén tridimensional y el los alrededores inmediatos de la matriz de almacén. La distribución temporal es controlada por la composición del polímero y la composición del gel o hidrogel de la fibra y por el uso de varias capas dentro de una fibra.  
40  
45

Un aspecto de la presente invención es una composición de implante biocompatible que comprende un almacén de fibras de polímero biodegradable. En diversas realizaciones de la presente invención, la distancia entre las fibras puede ser aproximadamente 20 micras, aproximadamente 70 micras, aproximadamente 90 micras, aproximadamente 100 micras, aproximadamente 120 micras, aproximadamente 140 micras, aproximadamente 160 micras, aproximadamente 180 micras, aproximadamente 200 micras, aproximadamente 220 micras, aproximadamente 240 micras, aproximadamente 260 micras, aproximadamente 280 micras, aproximadamente 300 micras, aproximadamente 320 micras, aproximadamente 340 micras, aproximadamente 360 micras, aproximadamente 380 micras, aproximadamente 400 micras, aproximadamente 450 micras o aproximadamente 500 micras. En diversas realizaciones, la distancia entre las fibras puede ser menor de 50 micras o mayor de 500 micras.  
50  
55

Adicionalmente, se prevé que en diversas realizaciones de la invención las fibras tengan un diámetro de aproximadamente 20 micras, aproximadamente 40 micras, aproximadamente 60 micras, aproximadamente 80 micras, aproximadamente 100 micras, aproximadamente 120 micras, aproximadamente 140 micras, aproximadamente 160 micras, aproximadamente 180 micras, aproximadamente 200 micras, aproximadamente 220 micras, aproximadamente 240 micras, aproximadamente 260 micras, aproximadamente 280 micras, aproximadamente 300 micras, aproximadamente 320 micras, aproximadamente 340 micras, aproximadamente 360 micras, aproximadamente 380 micras, aproximadamente 400 micras, aproximadamente 450 micras o aproximadamente 500 micras (incluyendo las longitudes intermedias). En diversas realizaciones, el diámetro de las fibras puede ser menor de aproximadamente 20 micras o mayor de aproximadamente 500 micras. Adicionalmente,  
60  
65

se prevén para ciertas realizaciones fibras grandes con diámetros de hasta 3,5 cm. Preferiblemente, el diámetro de las fibras será de aproximadamente 60 micras a aproximadamente 500 micras.

En otra realización de la presente invención, las fibras o un subgrupo de fibras contienen uno o más agentes terapéuticos de modo que la concentración del agente o los agentes terapéuticos varíe a lo largo del eje longitudinal de las fibras o el subgrupo de fibras. La concentración del agente o los agentes activos puede variar linealmente, exponencialmente o de cualquier modo deseado, como una función de la distancia a lo largo del eje longitudinal de una fibra. La variación puede ser monodireccional, esto es, el contenido de uno o más agentes terapéuticos disminuye desde el primer extremo de las fibras o el subgrupo de las fibras hasta el segundo extremo de las fibras o el subgrupo de las fibras. El contenido también puede variar de modo bidireccional, esto es, el contenido del agente o los agentes terapéuticos se incrementa desde los primeros extremos las fibras o el subgrupo de las fibras hasta un máximo y a continuación disminuye hacia los segundos extremos de las fibras o el subgrupo de las fibras.

En ciertas realizaciones de la presente invención, un subgrupo de fibras que comprenden el armazón puede no contener agente terapéutico. Para fibras que contienen uno o más agentes terapéuticos, el agente o los agentes pueden incluir: un factor de crecimiento, un inmunomodulador, un compuesto que promueve la angiogénesis, un compuesto que inhibe la angiogénesis, un compuesto antiinflamatorio, un antibiótico, una citocina, un agente anticoagulante, un agente procoagulante, un agente quimiotáctico, agentes que promueven la apoptosis, un agente que inhibe la apoptosis, un agente mitogénico, un agente radiactivo, un agente de contraste para estudios de diagnóstico por imagen, un vector viral, un polinucleótido, genes terapéuticos, ADN, ARN, un polipéptido, un glicosaminoglicano, un carbohidrato, una glicoproteína. Los agentes terapéuticos también pueden incluir los fármacos que se van a administrar para el mantenimiento a largo plazo a los pacientes, tales como fármacos cardiovasculares, incluyendo fármacos para la presión sanguínea, electroestimulantes cardíacos, antiarrítmicos, beta-bloqueantes y agentes basados en canales del calcio. Agentes terapéuticos de la presente invención también incluyen fármacos contra los temblores y otros para la epilepsia u otros trastornos del movimiento. Estos agentes también pueden incluir medicaciones a largo plazo tales como anticonceptivos y fármacos contra la esterilidad. Podrían comprender agentes neurológicos tales como dopamina y fármacos relacionados así como fármacos psicológicos u otros fármacos conductuales. Los agentes terapéuticos también pueden incluir eliminadores químicos tales como quelantes, antioxidantes y agentes nutricionales. Cuando el agente terapéutico promueve la angiogénesis, ese agente puede ser factor de crecimiento endotelial vascular. Los agentes terapéuticos pueden ser fármacos sintéticos o naturales, proteínas, ADN, ARN o células (genéticamente alteradas o no). Según se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, siguiendo la práctica de las leyes de patentes de hace mucho tiempo, los términos "un(a)" y "uno", cuando se usan junto con las palabras "que comprende" o "que incluye" significan uno o más.

En general, la presente invención contempla el uso de cualquier fármaco incorporado en las fibras de polímero biodegradable de la invención. La palabra "fármaco", según se usa en la presente, se define como un producto químico capaz de la administración a un organismo, que modifica o altera la fisiología del organismo. Más preferiblemente, la palabra "fármaco", según se usa en la presente, se define como cualquier sustancia destinada al uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad. Fármaco incluye toxinas y sustancias bioinfluyentes sintéticas y presentes en la naturaleza así como productos farmacéuticos reconocidos, tales como los listados en "The Physicians Desk Reference," 471<sup>a</sup> edición, 5 páginas 101-321; "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics" 8<sup>a</sup> Edición (1990), páginas 84-1614 y 1655-1715; y "The United States Pharmacopeia, The National Formulary", USP XXII NF XVII (1990), incorporándose los compuestos de estas referencias en la presente mediante referencia. El término "fármaco" también incluye compuestos que tengan las propiedades indicadas que todavía no se hayan descubierto o estén disponibles en los EE. UU. El término "fármaco" incluye formas de fármacos proactivas, activadas y metabolizadas. También se incluyen factores de estimulación tisular tales como: dímeros de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento insulinoide-1 (IGF-1), IGF-2, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), FGF ácido, factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico 3 (NT-3), factor neurotrófico 4 (NT-4), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento endotelial (EGF), insulina, interleucina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF $\alpha$ ), y todos los otros factores de crecimiento y citocinas, así como hormona paratiroidea (PTH), una prostaglandina tal como prostaglandina E-1 y prostaglandina E-2, factor de estimulante de colonias de macrófagos (MCSF), y corticosteroides tales como dexametasona, prednisolona y corticosterona.

La presente invención también contempla el uso de material formador de hidrogel dentro del núcleo de las fibras. Los hidrogeles son matrices de polímero sintético o biopolímero estructuralmente estables que están muy hidratadas. Estos materiales pueden absorber hasta miles de veces su peso en agua (Hoffman, A.S., Advanced Drug delivery Reviews, 43 (2000), 3-12). Los hidrogeles se pueden clasificar en dos amplias categorías: reversibles o físicos e irreversibles o químicos. Las redes en los geles físicos se mantienen unidas mediante enmarañamientos moleculares y/o fuerzas secundarias incluyendo fuerza iónicas, por enlace de H o hidrófobas. Los hidrogeles físicos se caracterizan por cambios significativos en las propiedades reológicas como una función de la temperatura, la concentración iónica y la dilución. Los geles químicos, también llamados geles permanentes, se caracterizan por redes químicamente reticuladas. Cuando están reticulados, estos geles alcanzan un nivel de hinchamiento en equilibrio en soluciones acuosas que depende principalmente de la densidad de reticulación.

La preparación de hidrogeles se puede alcanzar mediante una variedad de métodos muy conocidos por los expertos normales en la especialidad. Los geles físicos se pueden formar mediante: calentamiento o enfriamiento de ciertas soluciones de polímero (agarosa fría, por ejemplo), uso de ciclos de congelación-descongelación para formar microcristales de polímero, reducción del pH de la solución para formar un gel unido por enlaces de H entre dos polímeros diferentes en la misma solución acuosa, mezcla de soluciones de un polianión y un polication para formar un gel coacervado complejo, gelificación de una solución de polielectrolito con un ion multivalente de carga opuesta, reticulación de polímeros lineales, injerto de polímeros sintéticos en macromoléculas presentes en la naturaleza y quelación de policationes (Hoffman, A.S., *Advanced Drug delivery Reviews*, 43 (2000), 3-12). Los geles químicos se pueden crear mediante reticulación de polímeros en estado sólido o en solución con radiación, reticuladores químicos como glutaraldehído, o compuestos reactivos multifuncionales. También se pueden elaborar mediante copolimerización de un monómero y un reticulador en solución, copolimerización de un monómero y un macrómero multifuncional, polimerización de un monómero dentro de un polímero sólido diferente para formar un gel de IPN o conversión química de un polímero hidrófobo en un hidrogel (Hoffman, A.S., *Advanced Drug delivery Reviews*, 43 (2000), 3-12); Hennick, W.F. y van Nostrum, C.F., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54 (2002), 13-26.

La presente invención contempla el uso de materiales precursores de hidrogel y proteínas y polisacáridos no gelificantes dentro del alma de las fibras. Los materiales precursores de hidrogel son los mismos materiales que los que forman hidrogeles, pero no están expuestos a los agentes o las condiciones que normalmente gelifican los materiales, o pueden ser otras proteínas y polisacáridos que forman geles pero no hidrogeles. Por ejemplo, las sales de alginato, tales como alginato sódico, se gelifican en presencia de cationes divalentes, tales como calcio, mientras que otros materiales crean hidrogeles a través de un cambio en el pH o la temperatura. Ciertas realizaciones de la invención comprenden el uso de materiales precursores que nunca se gelifican. Otras realizaciones de la invención comprenden el uso de materiales precursores en el procedimiento de fabricación que más tarde pueden formar geles o hidrogeles. La formación de geles o hidrogeles en la capa fibrosa puede tener lugar como parte del procedimiento de fabricación de fibras, después de que se haya fabricado la fibra o después de la aplicación de un tipo apropiado de estímulo externo, incluyendo la colocación de la fibra in vitro o in vivo. Los términos "gel" o "hidrogel", según se usan en la presente, están destinados a incluir el gel o hidrogel formado así como las moléculas precursoras apropiadas implicadas en la formación de geles e hidrogeles.

El polímero biodegradable usado para la construcción de fibras puede ser un solo polímero o un copolímero o una combinación de polímeros y puede comprender poli(ácido L-láctico), poli(ácido DL-láctico), policaprolactona, poli(ácido glicólico), polianhídrido, o polímeros o polipéptidos natural, tales como colágeno o seda de araña y polisacáridos reconstituidos.

Las fibras de la invención reivindicada se fabrican usando hilado en húmedo o en seco/húmedo (chorro seco/húmedo). Cada método afecta a las propiedades finales de la fibra que está siendo construida. El hilado en húmedo es un procedimiento en el que un material polimérico se extruye en un baño líquido que contiene un coagulante. El coagulante está comprendido típicamente por un no disolvente para el polímero que es miscible con el disolvente en la solución de polímero, pero también puede contener una mezcla de disolvente/no disolvente. En el hilado en seco/húmedo, la solución de polímero se expone en primer lugar a un espacio con aire antes de entrar en el baño de coagulación.

En una realización de la invención, la fibra comprende una pluralidad de capas coaxiales de polímeros biodegradables. La fibra para aporte de fármaco de la presente invención se puede implantar en muchos lugares del cuerpo incluyendo tejidos dérmicos, tejido cardíaco, tejidos blandos, nervios, huesos y el ojo. La implantación ocular tiene un uso particular para el tratamiento de las cataratas, la retinopatía proliferativa y la retinopatía no proliferativa inducidas diabéticamente, el glaucoma y la degeneración macular.

Un aspecto adicional de la presente invención es un método para producir un armazón fibroso para preparar un implante capaz de controlar la concentración espacial y temporal de uno o más agentes terapéuticos. Este método comprende generalmente formar fibras de polímero biodegradable como un armazón fibroso tridimensional. Las fibras de polímero biodegradable contienen uno o más agentes terapéuticos. El agente o los agentes terapéuticos se distribuyen en el armazón fibroso en un patrón heterogéneo definido.

En ciertas realizaciones de la invención, los geles e hidrogeles comprendidos en las capas fibrosas pueden existir en concentraciones infinitamente diluidas, es decir, la concentración de gel o hidrogel es cero, y se usa agua con o sin otras sustancias y/o agentes activos, incluyendo agentes terapéuticos, en lugar del gel o hidrogel.

En una realización de esta invención, el material preferido para el hidrogel contenido en el alma de la fibra será alginato o un material de alginato modificado. Las moléculas de alginato están comprendidas por monómeros de ácido  $\beta$ -D-manurónico (unidades M) y ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (unidades G) conectados (1-4), que varían en proporción y distribución secuencial a lo largo de la cadena de polímero. Los polisacáridos de alginato son sistemas polielectrolíticos que tienen una fuerte afinidad por cationes divalentes (p. ej.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ) y forman estables cuando se exponen a estas moléculas. El polímero biodegradable es poli(ácido L-láctico) (PLLA). En una realización, el alginato está contenido como el núcleo interior y el PLLA es la envuelta exterior. La concentración de alginato está

en el intervalo de 0,25% p/v a 100% p/v (es decir, g/100 ml de agua), preferiblemente en el intervalo de 0,75% p/v a 20% p/v, y lo más preferiblemente en una concentración de 1% p/v. La fuente y la composición de alginato afecta directamente a su concentración utilizable.

5 En otra realización de esta invención, la envuelta de PLLA que rodea el núcleo interior del gel o hidrogel comprende un cóctel de polímeros de PLLA de diferentes pesos moleculares como un medio para incrementar la velocidad de degradación. Las proporciones de polímeros de PLLA y el intervalo de los pesos moleculares del polímero pueden variar. En una realización ejemplar, el cóctel de polímeros comprende 80% en peso de un polímero de PLLA de Mw=100.000 daltons; 15% en peso de un polímero de Mw=2.000 daltons; y 5% en peso de un polímero de Mw=300.000 daltons.

10 En otra realización de la invención, la envuelta de PLLA que rodea el núcleo interior del gel o hidrogel está comprendida por dos fases, una fase continua que comprende un polímero biodegradable y una fase dispersada que comprende una fase acuosa estabilizada por un tensioactivo. Opcionalmente, la fase acuosa puede comprender agentes terapéuticos. La cantidad de la fase dispersada varía de aproximadamente 0% a aproximadamente 85% en peso con relación al peso de la fibra. En una realización preferida, la cantidad de la fase dispersada varía de aproximadamente 33% a aproximadamente 50% en peso con relación al peso de la fibra. A medida que se incrementa la relación de la fase dispersada, lo hace la velocidad de degradación del polímero. Esto conduce a velocidades de liberación incrementadas de los agentes terapéuticos cargados.

15 En una realización de esta invención, agentes que están diseñados para degradar el gel o hidrogel se cargan en la fase acuosa dispersada del componente de polímero biodegradable de la fibra (según se describe anteriormente). Este agente se libera al gel o hidrogel lentamente a lo largo del tiempo para descomponer el gel o hidrogel. Esto incrementa las velocidades de liberación de agente terapéutico. Además, muchos de los geles e hidrogeles potenciales no son directamente biodegradables dentro de los animales, o más especialmente los seres humanos. Por lo tanto, esta degradación planeada ayuda al cuerpo a eliminar los geles o hidrogeles cuando ya no son necesarios.

20 En una realización, el alginato se gelifica internamente mediante la adición de agentes gelificantes añadidos directamente a la solución de alginato. Agentes gelificantes típicos incluyen cloruro cálcico, carbonato cálcico, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) cálcico u otros compuestos que contienen cationes bivalentes que son muy conocidos por los expertos en la especialidad. La concentración del agente de gelificación varía de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM, más preferiblemente de aproximadamente 12 mM a aproximadamente 50 mM, y lo más preferiblemente de aproximadamente 15 mM a 30 mM. El intervalo elegido está determinado por las propiedades del hidrogel deseado. Si no es fácilmente soluble a pH neutro, el agente gelificante típicamente se activa mediante una disminución en el pH de la solución. Esta acidificación se puede conseguir a través de un número de ácidos o lactonas. Esta lista incluye, pero no se limita a, ácido cítrico, ácido clorhídrico, D-glucono-delta-lactona y ácido acético glacial.

30 En otra realización, el gel o hidrogel se gelifica externamente al incorporar la fuente de agente gelificante en la fibra biodegradable. Alternativamente, la fuente de agente gelificante se añade a una fase acuosa que está cargada en una o más capas del polímero biodegradable. De este modo, el agente gelificante se libera lentamente en el gel o hidrogel a medida que la fibra se degrada. En ciertas realizaciones, a medida que la fibra se degrada y se hace más débil y más porosa, el gel se reticula más estrechamente. De este modo, es posible alterar continuamente la velocidad de liberación a medida que la fibra se degrada. Las velocidades de liberación tienden a incrementarse a medida que el polímero se hace más poroso, en este caso, esta tendencia sería contrarrestada por que el gel se reticula más estrechamente, retardando de ese modo las velocidades de liberación a través del gel o hidrogel a medida que la fibra se degrada.

40 En otra realización, el agente gelificante es soluble en el disolvente del polímero y se mezcla con la solución de polímero en el momento de la fabricación de la fibra. En esta realización, en lugar de que el agente gelificante se mantenga en una fase acuosa, se mezcla molecularmente con el polímero. El mismo efecto neto de liberar el agente gelificante en el gel o hidrogel lentamente a medida que la fibra se degrada. Esta realización permite el uso de fuentes de agentes gelificantes orgánicamente solubles.

45 En otra realización, los agentes de gelificación que son transportados dentro de la solución de alginato son activados a lo largo del tiempo, tal como dentro de lipoesferas, microesferas, nanopartículas u otros encapsulantes que son activados más tarde. Estos se pueden activar lentamente a lo largo del tiempo, o activarse intencionalmente mediante algún episodio externo. Esto dará como resultado que el gel se refuerce o se mantenga a lo largo del tiempo.

50 La presente invención proporciona composiciones y métodos para crear fibras de liberación de fármaco individuales así como la composición y métodos para crear un armazón fibroso tridimensional tejido, tricotado, trenzado, no tejido, retorcido, de disposición paralela o aleatorio para hacer crecer células en aplicaciones de ingeniería tisular. Estos armazones se pueden usar in vitro e in vivo, y debido a su heterogeneidad pueden crear distribuciones tanto espaciales como temporales de agentes terapéuticos. En esta invención, los agentes terapéuticos pueden incluir

fármacos, proteínas, péptidos, mono- y disacáridos, polisacáridos, glicoproteínas, ADN, ARN, virus, u otras moléculas biológicas de interés. El término agente terapéutico en esta invención también incluye materiales radiactivos usados para ayudar a destruir tejidos dañinos tales como tumores en el área local, o para inhibir el crecimiento de tejidos sanos, tales como en aplicaciones actuales de endoprótesis; o marcadores que se van a usar en estudios de diagnóstico por imagen.

#### A. Armazones fibrosos tridimensionales

Para crear los armazones heterogéneos de la presente invención, los agentes terapéuticos se encapsulan en fibras individuales de la matriz mediante métodos que se van a describir en la presente. Los agentes terapéuticos se liberan de cada fibra individual lentamente, y de modo controlado. El formato de fibras tiene muchas ventajas como una plataforma de liberación de fármaco sobre otros agentes de liberación de fármaco conocidos por los familiarizados con la especialidad, tales como microesferas, bloques porosos o parches. La principal ventaja de las fibras es que pueden proporcionar un almacén tridimensional tejido o no tejido, con o sin diseño, para permitir que las células se ligen, se extiendan, se diferencien y maduren en células que funcionan apropiadamente. Debido a que pueden formar diseños, se puede producir un "almacén inteligente" para inducir a células de tipos específicos a migrar a regiones específicas del almacén debido a que se liberan factores quimiotácticos específicos. Este almacén imita la función del material de la matriz extracelular tanto durante el desarrollo embrionario como en tejidos posembrionarios. Adicionalmente, se podrían formar filamentos como un almacén único que proporciona un sustrato de crecimiento para la reparación o la reconstrucción de tejidos que no recuerde a una estructura de tipo natural.

Debido a la capacidad de coser diseños para inducir a tipos de células apropiados hacia regiones específicas, es posible incorporar hebras que inducirán la formación de vasos sanguíneos en la tela. Esto se puede conseguir al proporcionar fibras que liberan factores de crecimiento tales como factor de crecimiento endotelial vascular factor (VEGF). Mediante la separación apropiada de las fibras que contienen VEGF en el diseño de costura, se pueden manipular mediante ingeniería tejidos grandes, y las células de tales tejidos se pueden proveer de un suministro de sangre suficiente y de ese modo recibir oxígeno y nutrientes para permitir la retirada de productos residuales.

Las fibras también tienen la ventaja de proveer al cuerpo de un soporte mecánico a corto plazo en aplicaciones tales como endoprótesis, en donde la fibra de polímero puede mantener la luz de cualquier cuerpo tubular, tal como arterias, venas, conductos (p. ej. conducto biliar, uréter, uretra, tráquea, etc.), órganos del tracto digestivo tales como el esófago, el intestino, el colon, y tejido conectivo tal como tendones, ligamentos, músculo y hueso. Las fibras proporcionan una estructura útil para soportar fuerza mecánica o tensión durante el proceso de curación. Las fibras también pueden ser útiles para promover la regeneración o reconstrucción neural de nervios o la médula espinal.

#### B. Formatos de fibras

Existe un gran número de combinaciones y variaciones dentro del alcance de esta invención. Esta invención cubre combinaciones de gel o hidrogel con una fibra de polímero biodegradable en un formato de varias capas y varios componentes, donde cada capa está totalmente contenida dentro de la siguiente capa exterior, y la capa interior generalmente está centrada dentro de la capa exterior. Estas capas pueden estar comprendidas por diferentes geles o hidrogeles, o diferentes polímeros biodegradables.

Esta invención también incluye el uso de geles o hidrogeles como una fase dispersada dentro de una capa de polímero biodegradable, en donde la fase continua es la fase de polímero biodegradable. La fase dispersada se puede estabilizar mediante un tensioactivo bien interno o bien externo

Esto conduce a un tipo básico de fibra con un polímero biodegradable externo con gel o hidrogel interno. La capa de polímero biodegradable puede tener o no una fase acuosa, de gel o hidrogel dispersada.

#### C. Cinética de liberación de fibras individuales

Además, existen diversos medios para controlar la cinética de liberación del agente terapéutico, controlando así temporalmente la liberación del agente terapéutico. El siguiente análisis tratará solamente del formato de fibra en el que la envuelta de polímero rodea un núcleo interior de gel o hidrogel. El primer punto de control para el polímero es mezclar polímero de bajo peso molecular en los polímeros formadores de fibras de peso molecular superior. De este modo, el componente de peso molecular inferior es capaz de degradarse y difundirse desde la fibra rápidamente, haciendo a la fibra más porosa. Esto hace más accesibles los agentes terapéuticos interiores dentro del gel o hidrogel. Un segundo medio para acelerar la velocidad de liberación de la fibra es crear una fibra bifásica, en donde la fase continua es el polímero biodegradable, y la fase dispersada son bolsas acuosas que son estabilizadas por un tensioactivo. A medida que se incrementa la concentración de la fase dispersada, se crea un camino desde el exterior hasta el gel o hidrogel interior donde el único polímero que se debe degradar está entre las diversas bolsas de la fase acuosa dispersada. Esto tiene el efecto de dejar que se degrade mucho menos polímero para conectar el gel o hidrogel con el exterior, acelerando así la liberación del agente terapéutico. También es posible que esta fase

acuosa dispersada contenga un fármaco o agente terapéutico igual o diferente. En este caso, el fármaco o agente terapéutico en la fase acuosa dispersada se liberará en primer lugar, seguido por la liberación del agente terapéutico en el gel o hidrogel. Para alterar la cinética de liberación del fármaco o agente terapéutico en la pared de la fibra polimérica, es posible adaptar ligeramente la descripción anterior de modo que la fase dispersada sea ahora un gel o hidrogel en oposición a ser acuosa. En este caso, existe el acortamiento del camino hidráulico como en el caso de una fase acuosa dispersada; sin embargo, el camino de conexión debe pasar ahora a través de bolsas de gel o hidrogel, en donde la difusión del agente terapéutico se retarda en comparación con un camino puramente acuoso. El grado hasta el que se retarda la difusión es una función del tipo de gel o hidrogel, el tipo y el grado de reticulación y la concentración del gel o hidrogel. Todos estos parámetros están dentro del control de la entidad que forma la fibra. También es posible controlar la concentración de la fase acuosa dispersada o la fase de gel dentro del polímero biodegradable como una función de la distancia a lo largo del eje de la fibra. Por este medio, es posible tener diferentes cinéticas de liberación en un extremo de la fibra que en el otro, con un gradiente definido de cinética de liberación por la longitud de la fibra. Este cambio en la cinética de liberación se puede o no combinar con un gradiente de concentración de agente terapéutico. Por el mismo medio, es posible que el contenido de la fase dispersa varíe como una función de la distancia por la fibra polimérica de modo que un extremo de la fase dispersada sea, por ejemplo, puramente acuoso y en el segundo extremo de la fibra, la fase dispersada pueda ser un gel o hidrogel. También son posibles otros gradientes incluyendo concentraciones variables del gel dentro de la fase dispersa. Así, está disponible una gran cantidad de control sobre la cinética de liberación de la fibra. Aparte de estos cambios en la pared polimérica de la fibra, también es posible controlar la cinética de liberación desde esta fibra al alterar el tipo, la concentración y el grado de reticulación dentro del gel o hidrogel en el núcleo de la fibra, que contiene un agente terapéutico.

La capacidad para cambiar dinámicamente la cinética de liberación del gel o hidrogel que está cargado en el núcleo o como una fase dispersadas dentro de una fibra de polímero biodegradable a lo largo del transcurso del período de aporte de fármaco constituye un aspecto importante de la invención. Esto proporciona oportunidades únicas que no es posible que estén presentes en otras formas de aporte de fármacos de geles o hidrogeles. El primer medio de control disponible debido al gel que se está cargando en una fibra de polímero biodegradable es la capacidad de esta fibra para liberar agentes que se sabe que reticulan el gel. De este modo, a lo largo del tiempo, se incrementa realmente la densidad de reticulación del gel, lo que retardará la liberación del agente terapéutico. Esta liberación del agente de reticulación desde la envuelta de fibra de polímero biodegradable es controlable por los medios esbozados anteriormente, es decir usando un cóctel de pesos moleculares, o cambiando la concentración de la fase acuosa dispersada. Como un caso especial de la envuelta de fibra de polímero biodegradable, está una envuelta de polímero biodegradable de varias capas y varios componentes. Esto permite la creación de especificidad direccional, así como cambios en la cinética de liberación desde cada capa de la envuelta de fibra de polímero biodegradable. Por ejemplo, considérese el caso de dos capas de fibra de polímero biodegradable en la envuelta. La capa más interior puede contener agentes que actúan para reticular el núcleo de gel o hidrogel de la fibra, y esta capa podría estar compuesta por un polímero biodegradable que tenga una velocidad de degradación rápida. Además, esta capa podría contener un alto grado de fase acuosa dispersada. En este mismo ejemplo, la capa más exterior puede estar compuesta por un polímero biodegradable diferente con una velocidad de degradación diferente, y una concentración diferente de fase acuosa (o gel o hidrogel) dispersada, incluyendo cero. Este ejemplo crearía una situación en la que el agente de reticulación se aportaría hacia el interior del gel o hidrogel en el núcleo de la fibra a lo largo del tiempo, creando así una situación en la que el coeficiente de difusión del agente terapéutico cargado en el gel o hidrogel en el núcleo de la fibra disminuye a lo largo del tiempo.

Otro caso especial es cuando la fibra polimérica contiene agentes que degradan el gel o hidrogel en el núcleo de la fibra. Usando la misma lógica que se explica anteriormente, esto crea además una situación en la que el coeficiente de difusión del agente terapéutico en el gel o hidrogel en el núcleo o dispersado dentro de las fibras cambia continuamente a lo largo del tiempo. Sin embargo, en este caso, la velocidad de difusión se incrementa a lo largo del tiempo. Este caso particular también tiene la ventaja de que el cuerpo del animal o preferiblemente el ser humano en el que se implanta la fibra puede no tener las enzimas específicas u otras condiciones químicas para degradar el gel o hidrogel. En este caso, cargar agentes de degradación apropiados en la pared de la fibra permite la degradación del gel o hidrogel, y así ayuda a la depuración del gel o hidrogel desde el hospedador. De nuevo, según se describe anteriormente, la liberación de los agentes de degradación es ampliamente controlable al cambiar las propiedades de las capas de polímero biodegradable en la envuelta de la fibra.

Mediante estos métodos, se observa que la cinética de liberación del agente terapéutico desde un núcleo de gel o hidrogel o dispersado en una envuelta de fibra de polímero biodegradable se puede alterar en virtud de la presencia de la envuelta de polímero biodegradable.

#### D. Polímeros biodegradables

Polímeros preferidos para el uso en la presente invención incluyen un polímero individual, un copolímero o una combinación de polímeros de poli(L-ácido láctico), poli(DL-ácido láctico), policaprolactona, poli(ácido glicólico) o polianhídrido. También se pueden usar polímeros presentes en la naturaleza tales como colágeno o sedas naturales reconstituidos. Los expertos en la especialidad entenderán que estos polímeros son solo ejemplos de una clase de

- 5 matrices de polímero biodegradable que se pueden usar en esta invención. Matrices biodegradables adicionales incluyen polianhídridos, poliortoésteres y poli(aminoácidos) (Peppas y Langer, 1994). Cualquiera de tales matrices se puede utilizar para fabricar una matriz de polímero biodegradable con propiedades controladas para el uso en esta invención. Una lista no exhaustiva de polímeros biodegradables que producen productos de degradación atóxicos se lista en la Tabla 1.

Tabla 1

## Polímeros biodegradables

## 1. Sintéticos

## 2.

Polipéptidos

Polidepsipéptidos

Copoliamidas nailon-2/nailon-6

Poliésteres alifáticos

Poli(ácido glicólico) (PGA) y copolímeros

Poli(ácido láctico) (PLA) y copolímero

Poli(succinatos de alquileo)

Poli(hidroxibutirato) (PHB)

Poli(diglicolato de butileno) Poli( $\epsilon$ -caprolactona) y copolímeros

Polidihidropiranos

Polifosfacenos

Poli(ortoéster)

Poli(cianoacrilatos)

## 3. Naturales

Polisacáridos modificados

celulosa, almidón, quitina

Proteínas modificadas

colágeno, fibrina

- 10 Adaptada de Wong y Mooney, 1997.

## E. Tipos de geles e hidrogeles

- 15 En términos simples, un gel es un sistema líquido que actúa como un sólido. Más técnicamente definido, un gel es un sistema coloidal con al menos dos fases, una de las cuales forma una red tridimensional continua que actúa como un sólido elástico. La formación del gel a través de asociación física, molecular o química da como resultado un peso molecular infinito para el sistema. El material viscoelástico formado tiene un módulo de almacenamiento,  $G'$ , que es mayor que el módulo de pérdida,  $G''$ , y tanto  $G'$  como  $G''$  son casi independientes de la frecuencia. [E. R. Morris, Polysaccharide solution properties: origin, rheological characterization and implications for food systems, *Frontiers in Carbohydrate Research 1: Food Applications* (R. P. Millane, J. N. BeMiller y R. Chandrasekaran, eds.), Elsevier, Londres, 1989, p. 132.] El módulo de almacenamiento caracteriza la rigidez de la muestra, mientras que el
- 20 módulo de pérdida caracteriza la resistencia de la muestra al flujo. [Damodaran, Srinivasan, *Food Proteins and Their Applications*, Food Science and Technology (Marcel Dekker, Inc.); New York Marcel Dekker, Inc., 1997.] Ejemplos son soluciones de polímero, soluciones micelares, microemulsiones y, en los últimos años, el campo se ha ampliado con el gran número de disolventes orgánicos que se gelifican mediante la presencia de moléculas orgánicas pequeñas a concentraciones muy bajas.

- 25 Un hidrogel se define como un coloide en el que la fase dispersa (el coloide) se ha combinado con la fase continua (agua) para producir un producto gelatinoso viscoso. [Dictionary of Chemical Terms, 4<sup>a</sup> Ed., McGraw Hill (1989)]. Los hidrogeles son capaces de hincharse rápidamente en agua en exceso y retener grandes volúmenes de agua en sus estructuras hinchadas. El material polimérico que comprende el hidrogel puede absorber más de 20% de su peso en agua, aunque los hidrogeles formados son insolubles en agua y mantienen redes tridimensionales. [Amidon, Gordon L., *Transport Processes in Pharmaceutical Systems, Drugs and the Pharmaceutical Sciences*; v. 102 New York Marcel Dekker, Inc., 2000]. Habitualmente, están formados por moléculas de polímero hidrófilo reticuladas bien mediante enlaces químicos o bien mediante otras fuerzas de cohesión tales como interacción iónica, enlaces de
- 30

hidrógeno o interacción hidrófoba. [J.I. Kroschwitz, Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, Nueva York, Wiley, XXIX, p 1341, 1990.]

5 Los hidrogeles son sólidos elásticos en el sentido de que existe una configuración de referencia recordada a la que el sistema vuelve incluso después de que se deforme durante un tiempo muy largo.

10 Un organogel se define como una fase orgánica con un componente polimérico entrelazado. Disolventes preferidos incluyen disolventes orgánicos atóxicos incluyendo, pero no limitados a, dimetilsulfóxido (DMSO), aceites minerales y aceites vegetales. El término "organogel" se usó inicialmente para describir un concepto de gelificación específico, mediante una solución de gelatina, de una microemulsión inversa de agua en aceite (véase Luisi y cols. Colloid & Polymer Science, 1990, vol. 268, p. 356-374). El término se ha extendido recientemente a sistemas gelificados que comprenden dos fases inmiscibles (agua en aceite) estabilizadas en lecitina enriquecida con fosfatidilcolina y habitualmente hidrogenadas (véase Williman y cols. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1992, vol. 81, p. 871-874, y Schchipunov y cols., Colloid Journal, 1995, vol. 57, p. 556-560). Estas emulsiones tienen una fase laminar y están en la forma de geles incluso en ausencia de agente gelificantes, de ahí el nombre de organogeles, que indica este tipo de emulsión independientemente de la orientación de la emulsión (agua en aceite o aceite en agua).

20 Los tipos de materiales de gel usados en la presente invención incluyen polisacáridos, incluyendo, pero no limitados a, amilosa, amilopectina, glucógeno, celulosa, hialuronato, condroitina, heparina, dextrina, inulina, manano, quitina, galactosa, goma guar, carragenina, agar, furcellarano, goma de xantano, otras gomas hidrocoloidales, pectina, goma de algarrobo, goma arábica, goma ghatti, pentosano, arabinogalactano, derivados sintéticos de los mismos y mezcla de los mismos.

25 Ejemplos de materiales que pueden formar hidrogeles incluyen polisacáridos naturales y sintéticos y otros polímeros naturales y sintéticos y sus derivados, y combinaciones de estos. Polisacáridos y polímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a: amilosa, amilopectina, glucógeno, celulosa, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, heparina, dextrina, inulina, manano, quitina, galactosa, goma guar, carragenina, agar, furcellarano, goma de xantano, otras gomas hidrocoloidales, ácido péctico y pectina, goma de algarrobo, goma arábica, goma ghatti, pentosano, arabinogalactano, alginatos y derivados de alginato, gelano, goma de gelano, glucosa, colágeno (y gelatina), celulosa, carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa y metoxicelulosa, fibrina, xantano y goma de xantano, agarosa, quitosano (polímeros polisacáricos polianiónicos), albúmina, human gamma globulina, pululano, carragenina (polímeros polisacáricos polianiónicos), dextrina, dextrano, sulfato de dextrano, queratina, inulina, dextrosa, amilosa, glucógeno, amilopectina, polilisina y otros poliaminoácidos, poliésteres tales como polihidroxibutirato y polifosfacinas, poli(alcoholes vinílicos), poli(óxidos de alquileo) particularmente poli(óxidos de etileno), polietilenglicol (incluyendo PEO-PPO-PEO y copolímeros de bloques similares como Pluronic®), poli(alilaminas) (PAM), poli(acrilato), polímeros estirénicos modificados, polioles pluronic, poloxámeros, polipropilenos, poliuretanos, poli(ácidos urónicos), poli(cloruro de vinilo), poli(vinilpirrolidona) y copolímeros, copolímeros de injerto, derivados sintéticos, combinaciones y otras mezclas de los anteriores. Los polisacáridos son los polímeros preferidos para esta invención. El alginato, por ejemplo, es biocompatible, no citotóxico, no carcinógeno, no inflamatorio y no inmunogénico, y, por lo tanto, un buen candidato para el uso.

#### F. Tipos de materiales poliméricos

45 Polímeros naturales ejemplares incluyen polisacáridos presentes en la naturaleza, tales como, por ejemplo, arabinanos, fructanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glucanos, mananos, xilanos (tales como, por ejemplo, inulina), levano, fucoidano, carragenina, galatocarolosa, ácido péctico, pectinas, incluyendo amilosa, pululano, glucógeno, amilopectina, celulosa, dextrano, dextrina, dextrosa, glucosa, poliglucosa, polidextrosa, pustulano, quitina, agarosa, queratina, condroitina, dermatano, ácido hialurónico, ácido alginico, goma de xantano, almidón y varios otros homopolímeros o heteropolímeros naturales, tales como los que contienen uno o más de las aldosas, las cetosas, los ácidos o las aminas siguientes: eritrosa, treosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, glucosa, dextrosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, eritrolosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, fructosa, sorbosa, tagatosa, manitol, sorbitol, lactosa, sacarosa, trehalosa, maltosa, celobiosa, glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, ácido glucurónico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido galacturónico, ácido manurónico, glucosamina, galactosamina y ácido neuramínico y derivados de los mismos presentes en la naturaleza. Según esto, polímeros adecuados incluyen, por ejemplo, proteínas, tales como albúmina.

55 Polímeros semisintéticos ejemplares incluyen carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa y metoxicelulosa. Polímeros sintéticos ejemplares incluyen polifosfacenos, polietilenos (tales como, por ejemplo, polietilenglicol (incluyendo la clase de compuestos denominados Pluronic®, disponible comercialmente de BASF, Parsippany, N.J.), polioxietileno y poli(tereftalato de etileno), polipropilenos (tales como, por ejemplo, polipropilenglicol), poliuretanos, poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(cloruro de vinilo) y polivinilpirrolidona, poliamidas incluyendo nailon, poliestireno, poli(ácido láctico), polímeros hidrocarbonados fluorados, polímeros carbonados fluorados (tales como, por ejemplo, politetrafluoroetileno), acrilato, metacrilato y poli(metacrilato de metilo) y derivados de los mismos.

5 Los materiales poliméricos se seleccionan de los materiales que se pueden polimerizar o su viscosidad se puede alterar in vivo mediante la aplicación de medios exógenos, por ejemplo, mediante la aplicación de luz, ultrasonidos, radiación o quelación, solos o en presencia de catalizador añadido, o por medios endógenos, por ejemplo, un cambio en el pH fisiológico, difusión de iones calcio (alginato) o iones borato (poli(alcohol vinílico)) en el polímero, o cambio en la temperatura hasta temperatura corporal (37°C).

G. Agentes que promueven la angiogénesis

10 Una clase de agentes terapéuticos para ser encapsulados por las fibras poliméricas de la presente invención son los agentes terapéuticos que promueven la angiogénesis. La ingeniería satisfactoria de nuevo tejido requiere el establecimiento de una red vascular. La inducción de la angiogénesis está mediada por una variedad de factores, cualquiera de los cuales se puede usar junto con la presente invención (Folkman y Klagsbrun, 1987, y las referencias citadas allí, cada una incorporada en la presente en su totalidad mediante referencia). Ejemplos de factores angiogénicos incluyen, pero no se limitan a: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o factor de permeabilidad vascular (VPF); miembros de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos, incluyendo factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF); interleucina-8 (IL-8); factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF); factores de crecimiento transformantes alfa y beta (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ); factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ); factor de crecimiento de hepatocitos (HGF); factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1); angiogenina; angiotropina; angiotensina; fibrina y nicotinamida (Folkman, 1986, 1995; Auerbach y Auerbach, 1994; Fidler y Ellis, 1994; Folkman y Klagsbrun, 1987; Nagy y cols., 1995).

H. Citocinas

25 En ciertas realizaciones, se contempla el uso de citocinas particulares incorporadas en las fibras poliméricas de la presente invención. La Tabla 2 posterior es una lista ejemplar, pero no limitativa, de citocinas y factores relacionados contemplados para el uso en la presente invención.

3.1.1.1. Tabla 2

Citocina	Referencia
IL-1 humana	March y cols., Nature, 315:641, 1985
IL-1 murina	Lomedico y cols., Nature, 312:458, 1984
IL-1 humana	March y cols., Nature, 315:641, 1985; Auron y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:7907, 1984
IL-1 murina	Gray, J Immunol., 137:3644, 1986; Telford, NAR, 14:9955, 1986
IL-1ra humana	Eisenberg y cols., Nature, 343:341, 1990
IL-2 humana	Taniguchi y cols., Nature, 302:305, 1983; Maeda y cols., Biochem. Biophys. Res. Commun., 115:1040, 1983
IL-2 humana	Taniguchi y cols., Nature, 302:305, 1983
IL-3 humana	Yang y cols., Cell, 47:3, 1986
IL-3 murina	Yomkota y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1070, 1984; Fung y cols., Nature, 307:233, 1984; Miyatake y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:316, 1985
IL-4 humana	Yomkota y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:5894, 1986
IL-4 murina	Norman y cols., Nature, 319:640, 1986; Lee y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:2061, 1986
IL-5 humana	Azuma y cols., Nuc. Acids Res., 14:9149, 1986
IL-5 murina	Kinashi y cols., Nature, 324:70, 1986; Mizuta y cols., Growth Factors, 1:51, 1988
IL-6 humana	Hirano y cols., Nature, 324:73, 1986
IL-6 murina	Van Snick y cols., Eur. J. Immunol., 18:193, 1988
IL-7 humana	Goodwin y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:302, 1989
IL-7 murina	Namen y cols., Nature, 333:571, 1988
IL-8 humana	Schmid y cols., J. Immunol., 139:250, 1987; Matsushima y cols., J. Exp. Med., 167:1883, 1988; Lindley y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:9199, 1988

ES 2 623 486 T3

<b>Citocina</b>	<b>Referencia</b>
IL-9 humana	Renauld y cols., J. Immunol., 144:4235, 1990
IL-9 murina	Renauld y cols., J. Immunol., 144:4235, 1990
Angiogenina humana	Kurachi y cols., Biochemistry, 24:5494, 1985
GRO humano	Richmond y cols., EMBO J., 7:2025, 1988
MIP-1 murina	Davatelis y cols., J. Exp. Med., 167:1939, 1988
MIP-1 murina	Sherry y cols., J. Exp. Med., 168:251, 1988
MIF humano	Weiser y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:7522, 1989
G-CSF humano	Nagata y cols., Nature, 319:415, 1986; Souza y cols., Science, 232:61, 1986
GM-CSF humano	Cantrell y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:6250, 1985; Lee y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4360, 1985; Wong y cols., Science, 228:810, 1985
GM-CSF murino	Gough y cols., EMBO J., 4:645, 1985
M-CSF humano	Wong, Science, 235:1504, 1987; Kawasaki, Science, 230: 291, 1985; Ladner, EMBO J., 6:2693, 1987
EGF humano	Smith y cols., Nuc. Acids Res., 10:4467, 1982; Bell y cols., NAR, 14:8427, 1986
TGF- humano	Derynck y cols., Cell, 38:287, 1984
FGF ácido humano	Jaye y cols., Science, 233:541, 1986; Giménez-Gallego y cols., Biochem. Biophys. Res. Commun. 138:611, 1986; Harper y cols., Biochem., 25:4097, 1986
-ECGF humano	Jaye y cols., Science, 233:541, 1986
FGF básico humano	Abraham y cols., EMBO J., 5:2523, 1986; Sommer y cols., Biochem. Biophys. Res. Comm., 144:543, 1987
IFN- murino	Higashi y cols., J. Biol. Chem., 258:9522, 1983; Kuga, NAR, 17:3291, 1989
IFN- humano	Gray y cols., Nature, 295:503, 1982; Devos y cols., NAR, 10:2487, 1982; Rinderknecht, J. Biol. Chem., 259:6790, 1984
IGF-I humano	Jansen y cols., Nature, 306:609, 1983; Rotwein y cols., J. Biol. Chem., 261:4828, 1986
IGF-II humano	Bell y cols., Nature, 310:775, 1984
Cadena de NGF humano	Ullrich y cols., Nature, 303:821, 1983
NT-3 humana	Huang EJ. Y cols., Development. 126(10): 2191-203, mayo 1999.
Cadena A de PDGF humano	Betsholtz y cols., Nature, 320:695, 1986
Cadena B de PDGF humano	Johnsson y cols., EMBO J., 3:921, 1984; Collins y cols., Nature, 316:748, 1985
TGF-1 humano	Derynck y cols., Nature, 316:701, 1985
TNF- humano	Pennica y cols., Nature, 312:724, 1984; Fransen y cols., Nuc. Acids Res., 13:4417, 1985
Human TNF- humano	Gray y cols., Nature, 312:721, 1984
TNF- murino	Gray et l., Nucl. Acids Res., 15:3937, 1987
E-selectina humana	Bevliacqua y cols., Science, 243:1160, 1989; Hensley y cols., J. Biol. Chem., 269:23949, 1994
ICAM-1 humana	Simmons y cols., Nature, 331:624, 1988
PECAM humana	Simmons y cols., J. Exp. Med., 171:2147, 1990
VCAM-1 humana	Hession y cols., J. Biol. Chem., 266:6682; Osborn y cols., Cell, 59:1203, 1989
L-Selectina humana (unida a la membrana)	Ord y cols., J. Biol. Chem., 265:7760, 1990; Tedder y cols., J. Exp. Med., 170:123, 1989
L-Selectina humana (forma soluble)	Ord y cols., J. Biol. Chem., 265:7760, 1990; Tedder y cols., J. Exp. Med., 170:123, 1989
Calcitonina humana	Le Moullec y cols., FEBS Lett., 167:93, 1984

Citocina	Referencia
Hirudina humana (optimizada para <i>E. coli</i> )	Dodt y cols., FEBS Lett., 165:180, 1984

## I. Polinucleótidos

5 Los polinucleótidos que se van a incorporar dentro de las fibras poliméricas de la presente invención se extienden a una amplia variedad de moléculas de ácido nucleico. Los ácidos nucleicos incluyen así ADN genómico, ADNc, ADN de una sola hebra, ADN de doble hebra, ADN de triple hebra, oligonucleótidos, Z-ADN, ARNm, ARNt y otros ARN. Generalmente se prefieren las moléculas de ADN, incluso cuando el ADN se usa para expresar un ARN terapéutico, tal como una ribozima o ARN antisentido.

10 Un "gen" o segmento de ADN que codifica una proteína o ARN seleccionados se refiere generalmente a un segmento de ADN que contiene secuencias que codifican la proteína o el ARN seleccionados, pero se aísla de, o se purifica libre de, ADN genómico total de la especie de la que se obtiene el ADN. Se incluyen dentro de los términos "gen" y "segmento de ADN" segmentos de ADN y fragmentos menores de tales segmentos, y también vectores recombinantes, incluyendo, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, un fago, retrovirus, adenovirus, y similares.

15 El término "gen" se usa por simplicidad para referirse a una unidad que codifica un péptido o proteína funcional. Como se entenderá por los expertos en la especialidad, este término funcional incluye tanto secuencias genómicas como secuencias de ADNc. "Aislado sustancialmente de otras secuencias codificantes" significa que el gen de interés forma la parte significativa de la región codificante del segmento de ADN, y que el segmento de ADN no contiene porciones grandes de ADN codificante presente en la naturaleza, tales como fragmentos cromosómicos grandes u otros genes funcionales o regiones codificantes de ADNc. Por supuesto, esto se refiere al segmento de ADN según se aísla originalmente, y no excluye genes o regiones codificantes, tales como secuencias que codifican péptidos líder o secuencias dirigidas, añadidos más tarde por el hombre.

20 La presente invención no requiere que se usen ADN o vectores muy purificados, con la condición de que cualquier segmento codificante empleado codifique una proteína o ARN seleccionados y no incluya ninguna secuencia codificante o reguladora que tenga un efecto adverso significativo sobre las células diana. Por lo tanto, también se entenderá que secuencias de ácido nucleico útiles pueden incluir residuos adicionales, tales como secuencias no codificantes adicionales que flanquean cualquiera de las porciones 5' o 3' de la región codificante o pueden incluir diversas secuencias internas, es decir, intrones, que se sabe que se presentan dentro de los genes.

30 Muchos segmentos de ADN adecuados se pueden obtener a partir de fuentes existentes, incluyendo las comerciales. También se puede obtener un nuevo segmento de ADN que codifica una proteína de interés usando una cualquiera o más de una variedad de técnicas biológicas moleculares generalmente conocidas por los expertos en la especialidad. Por ejemplo, bibliotecas de ADNc o genómicas se pueden cribar usando cebadores o sondas con secuencias diseñadas. También se puede usar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para generar un fragmento de ADN que codifica una proteína de interés.

40 Después de identificar un gen o molécula de ADN seleccionados apropiados, se puede insertar en uno cualquiera de los muchos vectores actualmente conocidos en la especialidad, de modo que dirigirá la expresión y la producción de la proteína seleccionada cuando se incorpore en una célula diana. En un vector de expresión recombinante, la porción codificante del segmento de ADN se sitúa bajo el control de un elemento promotor/potenciador. El promotor puede estar en la forma del promotor que está asociado naturalmente con un gen seleccionado, como se puede obtener al aislar las secuencias no codificantes 5' situadas aguas arriba del segmento o exón codificante, por ejemplo, usando clonación recombinante y/o tecnología de PCR.

45 En otras realizaciones, se contempla que se obtendrán ciertas ventajas al situar el segmento de ADN codificante bajo el control de un promotor recombinante, o heterólogo. Según se usa en la presente, un promotor recombinante o heterólogo está destinado a referirse a un promotor que normalmente no está asociado con un gen seleccionado en su ambiente natural. Tales promotores pueden incluir los normalmente asociados con otros genes seleccionados, y/o promotores aislados de cualquier otra célula bacteriana, viral, eucariótica o mamífera. Naturalmente, será importante emplear un promotor que dirija eficazmente la expresión del segmento de ADN en las células diana elegidas.

55 El uso de promotores recombinantes para alcanzar la expresión de proteínas es conocidos generalmente por los expertos en la especialidad de la biología molecular, por ejemplo, véase Sambrook y cols. (1989; incorporado en la presente mediante referencia). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, o inducibles, y se pueden usar bajo las condiciones apropiadas para dirigir una expresión de alto nivel o regulada del segmento de ADN introducido. La expresión de genes bajo el control de promotores constitutivos no requiere la presencia de un sustrato específico para inducir la expresión génica y se producirá bajo todas las condiciones de crecimiento celular. En contraste, la

expresión de genes controlada por promotores inducibles es sensible a la presencia o ausencia de un agente inductor.

5 Se pueden usar con los mismos promotores aislados del genoma de virus que crecen en células mamíferas, p. ej., RSV, virus variolovacunal 7.5K, SV40, HSV, adenovirus MLP, MMTV LTR y promotores de CMV, así como promotores producidos mediante técnicas de ADN recombinante o sintéticas. Promotores actualmente preferidos son aquellos tales como CMV, RSV LTR, el promotor de SV40 solo, y el promotor SV40 en combinación con el potenciador de SV40.

10 Elementos promotores/potenciadores específicos de tejidos y regiones de control de la transcripción que exhiben especificidad tisular ejemplares incluyen, pero no se limitan a: la región de control del gen de elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas; la región de control del gen de insulina que es activa en células pancreáticas; la región de control del gen de inmunoglobulina que es activa en células linfoides; las regiones de control de los genes de albúmina, 1-antitripsina y –fetoproteína que son activas en el hígado; la región de control del gen de –globina que es activa en células mieloides; la región de control del gen de proteína básica de mielina que es activa en oligodendrocitos del cerebro; la región de control del gen de la cadena ligera 2 de miosina que es activa en el músculo esquelético; y la región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica que es activa en el hipotálamo.

20 También se pueden requerir señales de iniciación específicas para la traducción suficiente de secuencias codificantes de proteína insertadas. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. En casos en los que toda la secuencia codificante, incluyendo el codón de inicio y secuencias adyacentes, se inserta en los vectores de expresión apropiados, pueden no ser necesarias señales de control de la traducción adicionales. Sin embargo, en casos en los que solo se inserta una porción de la secuencia codificante, se deben proporcionar señales de control de la traducción exógenas, incluyendo el codón de inicio ATG. El codón de inicio debe estar en fase con el marco de lectura de las secuencias codificantes de proteína para asegurar la traducción de toda la inserción. Estas señales de control de la traducción exógenas y codones de inicio pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia y el control de la expresión se pueden potenciar mediante la inclusión de secuencias de atenuación de la transcripción, elementos potenciadores, etc.

30 Se puede usar una variedad de vectores, incluyendo, pero no limitados a, los derivados de ADN bacteriofágico recombinante, ADN plasmídico o ADN cosmídico. Por ejemplo, se pueden usar vectores plasmídicos tales como pBR322, pUC 19/18, pUC 118, 119 y la serie de vectores M13 mp. Vectores bacteriofágicos pueden incluir gt10, gtl 1, gtl8-23, ZAP/R y la serie de vectores bacteriofágicos EMBL. Vectores cosmídicos que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, pJB8, pCV 103, pCV 107, pCV 108, pTM, pMCS, pNNL, pHSG274, COS202, COS203, pWE15, pWE16 y la serie de vectores carómido 9. También se pueden usar vectores que permiten la transcripción in vitro de ARN, tales como vectores SP6, para producir grandes cantidades de ARN que se puede incorporar en matrices.

40 Los genes y los segmentos de ADN seleccionados también pueden estar en la forma de una inserción de ADN situada dentro del genoma de un virus recombinante, tal como, por ejemplo, un herpesvirus recombinante, retrovirus, virus variolovacunales, adenovirus, virus adenoasociados o papilomavirus bovino. Aunque se pueden usar vectores integradores, a menudo se preferirán sistemas no integradores, que no transmiten el producto génico a células hijas durante muchas generaciones. De este modo, el producto génico se expresa durante un proceso biológico definido, p. ej., un proceso de curación de heridas, y como el gen se diluye en generaciones descendientes, la cantidad de producto génico expresado se disminuye.

50 En tales realizaciones, para poner el gen en contacto con una célula diana, se prepararán las partículas virales recombinantes, cuyo genoma incluye la inserción génica, y entran en contacto con las células o los tejidos diana a través de la liberación desde la fibra polimérica de la presente invención, con lo que el virus infecta las células y transfiere el material genético.

También se contemplan para el uso en la invención genes con secuencias que varían con respecto a las descritas en la bibliografía, con tal de que el gen alterado o modificado todavía codifique una proteína que funcione para afectar a las células diana del modo (directo o indirecto) deseado. Estas secuencias incluyen las provocadas por mutaciones puntuales, las debidas a las degeneraciones del código genético o variantes alélicas presentes en la naturaleza, y modificaciones adicionales que se han introducido mediante ingeniería genética, es decir, por el hombre.

60 Técnicas para introducir cambios en las secuencias nucleotídicas que están diseñadas para alterar las propiedades funcionales de las proteínas o los polipéptidos codificados son muy conocidas en la especialidad. Tales modificaciones incluyen la supresión, inserción o sustitución de bases, y así cambios en la secuencia de aminoácidos. Los cambios se pueden realizar para incrementar la actividad de una proteína, para incrementar su estabilidad biológica o semivida, para cambiar su patrón de glicosilación, conferir sensibilidad a la temperatura o alterar el patrón de expresión de la proteína, y similares. Todas estas modificaciones de las secuencias nucleotídicas están abarcadas por esta invención.

65

Una ventaja de la presente invención es que se puede usar uno o más de un gen seleccionado en los métodos y las composiciones de transferencia génica. Los métodos de aporte de ácidos nucleicos pueden así implicar la administración de uno, dos, tres o más genes seleccionados. El número máximo de genes que se puede aplicar está limitado solamente por consideraciones prácticas, tales como el esfuerzo dedicado a preparar simultáneamente un gran número de construcciones génicas o incluso la posibilidad de provocar un efecto citotóxico adverso. La combinación de genes particular se puede elegir para alterar rutas bioquímicas iguales o diferentes. Por ejemplo, un gen de factor de crecimiento se puede combinar con un gen de hormona; o un primer gen de hormona y/o factor de crecimiento se puede combinar con un gen que codifica un receptor de la superficie celular capaz de interactuar con el producto polipeptídico del primer gen.

Al usar múltiples genes, se pueden combinar en una sola construcción genética bajo el control de uno o más promotores, o se pueden preparar como construcciones separadas de tipos iguales o diferentes. Así, se puede emplear una combinación casi infinita de diferentes genes y construcciones genéticas. Ciertas combinaciones de genes se pueden diseñar para, o su uso puede dar como resultado de otro, la consecución de efectos sinérgicos sobre la estimulación celular y el crecimiento tisular, todas y cada una de estas combinaciones pretenden estar dentro del alcance de la presente invención. En efecto, se han descrito en la bibliografía científica muchos efectos sinérgicos, de modo que un experto normal en la especialidad sería capaz de identificar fácilmente combinaciones de genes sinérgicos similares, o incluso combinaciones de genes-proteínas.

Se entenderá que, si se desea, el segmento nucleico o gen se podría administrar en combinación con agentes adicionales, tales como, p. ej., proteínas o polipéptidos o diversos agentes farmacéuticamente activos. Con tal de que el material genético forme parte de la composición, virtualmente no hay límite para otros componentes que también se puedan incluir, dado que los agentes adicionales no provocan ningún efecto adverso significativo al entrar en contacto con las células o los tejidos diana. Los ácidos nucleicos se pueden aportar así junto con varios otros agentes, por ejemplo, en ciertas realizaciones, se puede desear administrar un factor angiogénico como el descrito en la Patente de EE. UU. 5.270.300 e incorporada en la presente mediante referencia.

Como la naturaleza química de los genes, es decir, como una cadena de nucleótidos, es esencialmente invariable, y como el proceso de transferencia y expresión génica es fundamentalmente el mismo, se entenderá que el tipo de genes transferidos por las matrices fibrosas de la presente invención es virtualmente ilimitado. Esto se extiende desde la transferencia de una mezcla de material genético que expresa fragmentos antigénicos o inmunogénicos para el uso en la vacunación con ADN; hasta la estimulación de la función celular, como en la curación de heridas; hasta aspectos de destrucción celular, tal como en la transferencia de genes supresores de tumores, oncogenes antisentido o genes inductores de apoptosis a células cancerosas.

Solamente a modo de ejemplo, genes que van a ser suministrados por la invención incluyen, pero no se limitan a, los que codifican y expresan: hormonas, factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, interferones, interleucinas, quimiocinas, citocinas, factores estimulantes de colonias y factores quimiotácticos; factores de transcripción y elongación, proteínas de control del ciclo celular, incluyendo cinasas y fosfatasa, proteínas de reparación de ADN, genes inductores de la apoptosis; genes inhibidores de la apoptosis, oncogenes, oncogenes antisentido, genes supresores de tumores; proteínas angiogénicas y antiangiogénicas; proteínas estimulantes y moduladoras de respuestas inmunitarias; receptores de la superficie celular, moléculas de señalización y proteínas de transporte accesorias; enzimas; y proteínas antibacterianas y antivirales.

#### J. Estuches

Todos los materiales y reactivos esenciales requeridos para los diversos aspectos de la presente invención se pueden reunir en un estuche. Los estuches de la presente invención también incluirán típicamente medios para contener los viales que comprenden los componentes deseados confinados para venta comercial tal como, p. ej., una inyección o recipientes de plástico moldeados por soplado en los que se retienen los viales deseados. Independientemente del número o el tipo de recipientes, los estuches de la invención típicamente están envasados con instrucciones de uso de los componentes del estuche.

#### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para mostrar realizaciones preferidas de la invención y no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la invención. Se debe apreciar por los expertos en la especialidad que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención, y así se debe considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la especialidad deben apreciar, a la luz de la presente divulgación, que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se divulgan y mantener sin embargo un resultado igual o similar sin apartarse del alcance de la invención.

## Ejemplo 1

## Extrusión de fibras con alma de gel o hidrogel

En una realización de la presente invención, se usa el siguiente procedimiento para crear fibras de liberación de fármaco con alma de gel o hidrogel. El aparato usado se representa en la Figura 7, que detalla una hilera para fibras en la que se alimenta un fluido coagulante interno a través de un tubo hipodérmico de pequeño diámetro, que está centrado en una aguja hipodérmica de extremo romo. Sin embargo, se incluye dentro del alcance de la invención cualquier configuración similar que incluya versiones aumentadas a escala y aparatos contruidos específicamente. Esta configuración permite que un anillo de polímero fluya a través de la hilera, con un alma de gel o hidrogel basado en agua. En primer lugar, un polímero biodegradable tal como poli(L-ácido láctico) (PLLA), poli(DL-ácido láctico), policaprolactona, poli(ácido glicólico), polianhídrido, o copolímeros o combinaciones de estos u otros polímeros biodegradables se disuelve en algún disolvente (A) apropiado en concentraciones que varían de 5 a 30% en peso dependiendo del tipo de polímero, prefiriéndose 10% en peso para PLLA con un peso molecular de 200 kD. En esta realización, el disolvente (A) tiene baja miscibilidad con agua, y es muy miscible con el disolvente del baño de coagulación (B), pero no con el agua del gel o hidrogel del alma. El agua no funciona como un disolvente o codisolvente en esta aplicación. Elecciones preferidas del disolvente (A) incluyen cloroformo y cloruro de metileno. Una vez que el polímero se disuelve en el disolvente elegido, típicamente se añade un no disolvente (disolvente C) a la solución de polímero en una concentración apropiada para reducir el poder de solvatación del sistema disolvente, y sin embargo no lleva a la solución hasta su punto de turbidez. Este no disolvente es muy miscible con el disolvente (A) y con el disolvente (B), y en algunos casos puede ser el mismo que el disolvente (B). Elecciones típicas incluyen isoocetano, ciclohexano y hexano. Este no disolvente lleva al polímeros de la solución cerca de su punto de turbidez, de modo que la solución precipitará más rápidamente para formar una fibra cuando se extruya en el baño coagulante, disolvente (B).

El gel o hidrogel se prepara usando procedimientos estándar conocidos por los que tienen práctica en la especialidad. Como un ejemplo, para un fluido interno de alginato gelificado internamente, polvo de alginato sódico se disuelve en primer lugar en agua destilada-desionizada para dar una concentración en el intervalo de 0,5 a 50% en peso, deseándose para este ejemplo 1% en peso. Una vez disuelto, la solución se filtra estérilmente para proporcionar una materia prima apropiada para el procedimiento de extrusión de gel. Para promover la gelificación interna del alginato, una cantidad apropiada de carbonato cálcico,  $\text{CaCO}_3$ , se añade a la solución y se mezcla a fondo mediante turbidez, ultrasonidos u homogeneización. El carbonato cálcico no es soluble en agua a pH neutro, de modo que el polvo se suspende finalmente en la solución de alginato. Se añade a esta solución una cantidad apropiada de D-glucono-delta-lactona (GDL) para reducir lentamente el pH de la solución, lo que inicia la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  libre del  $\text{CaCO}_3$  para reticular los residuos de ácido gulurónico del alginato, formando así un hidrogel. La velocidad de gelificación y las propiedades del gel se pueden controlar a través de la concentración de  $\text{CaCO}_3$  y la relación de GDL a  $\text{CaCO}_3$  usada en la solución.

A continuación, la solución de gel preparada y la solución de polímero se extruyen inmediatamente en el baño de coagulación que contiene el disolvente (B), a través del dispositivo de hilera representado en la Figura 7, de modo que el polímero fluya alrededor de un tubo central que contiene el gel o hidrogel y, si se desea, un fármaco de elección bien disuelto en el gel o bien encapsulado en nanoesferas o liposomas y suspendido en el gel. La solución de polímero y el núcleo de gel o hidrogel se extruyen en el baño de coagulación a través de una hilera según el tamaño de la fibra deseada, puesto que estas fibras típicamente no se estiran, el tamaño final de la fibra está cerca del tamaño de la hilera. La relación óptima de anillo externo a diámetro del gel o hidrogel se necesita determinar experimentalmente. Por ejemplo, para obtener fibras cuyo diámetro externo es aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ , el laboratorio del inventor ha usado una luz exterior de calibre 18 con una luz interior de calibre 24 o 25 para el fluido del alma. Cualquier gel basado en agua, componente de hidrogel precursor o hidrogel se puede aportar a través del tubo central. Frecuentemente, el gel o hidrogel interior está soportando un fármaco que es incompatible con disolventes orgánicos, o el gel o hidrogel no tolera la presencia de disolventes orgánicos. Por lo tanto, generalmente se prefiere que el disolvente para el gel o hidrogel (generalmente agua) sea inmisible con los disolventes (A), (B) y (C). El disolvente (B) debe ser altamente miscible con los disolventes (A) y (C), inmisible con el componente acuoso del fluido del alma y debe ser un no disolvente para el polímero; el hexano y el pentano son las elecciones más típicas, pero teóricamente funcionará cualquier disolvente que cumpla los criterios anteriores y extraiga rápidamente el disolvente de la solución de polímero. Por eso, el cloroformo y el pentano constituyen una buena combinación de disolvente y baño de coagulación con isoocetano como el no disolvente añadido. Debido a que el disolvente (A) es altamente miscible con el disolvente (B) del baño de coagulación, se difunde libremente desde la corriente de solución de polímero hacia el baño de coagulación, reduciendo el poder disolvente de la solución de polímero por debajo del punto de turbidez, lo que hace que el polímero empiece a precipitar para formar una envuelta polimérica sólida. Ocasionalmente, la envuelta polimérica debe empezar a precipitarse y formarse antes de que se someta al estrés de ser expuesta al gel o hidrogel que fluye en la luz interior. Esto requiere que las posiciones axiales de la luz interior sobresalgan por debajo de la salida del anillo externo (0-2 mm típicos en el laboratorio del inventor) para asegurar que la solución de polímero se esponga al baño coagulante justo antes de que el fluido del alma de gel o hidrogel entre en contacto con el polímero. El no disolvente (C), incorporado en la solución de polímero, acelera el proceso de precipitación. Como ni el disolvente (A) ni el (B) se difunden libremente en el fluido del alma, solamente

se crea un único frente de coagulante a medida que el polímero sale de la hilera, encapsulando de ese modo el gel o hidrogel del alma. La distancia que cae la fibra en el baño de coagulación es importante para la formación de la fibra y sus propiedades definitivas, y es típicamente 10-30 cm. En el laboratorio del inventor, se ha dejado que la fibra caiga libremente y se recoja en el fondo del recipiente del baño de coagulación; sin embargo, otros diseños, incluyendo la fibra fuera del baño de coagulación, se incluyen como parte de esta invención. La fibra extruida se puede procesar posteriormente y almacenar de un número de modos, incluyendo liofilizada, congelada o secada al horno, y ponerse en un desecador o congelador, dependiendo de las condiciones de almacenamiento recomendadas de las biomoléculas cargadas y las propiedades del gel o hidrogel.

#### Ejemplo 2

10 Técnica de fabricación alternativa para el ejemplo 1, para fibra hidrófila

La única diferencia es usar como un baño de coagulación una molécula tal como poli(etilenglicol) (PEG) de bajo peso molecular (en el intervalo de 200 a 600 daltons es típico). Este polímero es miscible con cloroformo y cloruro de metileno, y sin embargo un no disolvente para el polímero, tal como PLLA. Por lo tanto, se califica como un baño de coagulación, sin embargo, este baño de coagulación único crea un red interpenetrante de PEG en la pared de la fibra, haciéndola hidrófila al exponer a un ambiente acuoso. Esto puede tener implicaciones interesantes para la implantación y puede alterar la respuesta celular a las fibras.

#### Ejemplo 3

##### Ingeniería de tejido neural

En este aspecto de la presente invención, series paralelas de fibras se empaquetan en tubos 25 y se cargan con neurotrofinas para el crecimiento axonal. El tubo puede ser una versión muy grande de una fibra de la composición reivindicada en esta invención, en la que el núcleo de gel o hidrogel puede tener una concentración de cero, o alternativamente se puede diseñar con una envuelta externa de gel o hidrogel, con un núcleo interior de gel o hidrogel de varios componentes con una capa intermedia que consiste en polímero biodegradable. El gel o hidrogel más interior puede tener una concentración de cero, y la capa de polímero biodegradable puede estar cargada con agentes terapéuticos bien en una fase dispersada o bien directamente mezclada con el polímero. El gel o hidrogel exterior también puede contener agentes terapéuticos como también el gel o hidrogel interior. Dentro del tubo hay una serie paralela de fibras, cuya composición puede estar descrita o no por esta invención o la invención previa de los presentes inventores. Para este ejemplo, al menos un componente, bien el tubo o bien al menos una fibra debe ser de una composición como la descrita en esta invención. Esta serie de fibras dentro del tubo se coloca en varios nervios periféricos o centrales. Los agentes terapéuticos se pueden cargar en un gradiente lineal o algún otro apropiado en cada elemento del dispositivo en el que se carguen (el gel o hidrogel exterior del tubo, la capa de polímero biodegradable intermedia o el núcleo más interior del tubo, así como las fibras individuales dentro del tubo en todos y cada uno de los posibles constituyentes que se describen en la presente), pero el gradiente puede diferir en cada presencia dentro del dispositivo según se desee. Este dispositivo se implanta salvando el espacio entre los extremos de los muñones nerviosos. A medida que el dispositivo libera sus agentes terapéuticos, que pueden consistir en neurotrofinas, agentes antiinflamatorios, factores angiogénicos, agentes quimiotácticos o quimiorrepulsivos específicos, etc., los axones, la vasculatura y otras células y tejido de soporte empiezan a migrar a través de la lesión. Una vez que los axones alcanzan el extremo distal, se proporcionan indicaciones de guía por células de Schwann o gliales existentes y a continuación se pueden realizar reconexiones. Se ha encontrado previamente que los axones reciben una guía de contacto mediante estos haces de fibras y son capaces de atravesar al menos 1,8 cm en una resección de nervio ciático de rata usando fibras no cargadas. La densidad óptima de fibras no cargadas en el tubo es aproximadamente 32 fibras en un tubo de 1,5 mm de diámetro para el crecimiento de nervio ciático de rata.

#### Ejemplo 4

45 Preparación de uso de endoprótesis de fibra polimérica

En otra realización, las fibras se pueden cargar con un fármaco de interés y usar en endoprótesis u otros dispositivos médicos en los que se requiera resistencia mecánica. Las endoprótesis pueden estar tejidas de tal modo que tengan fibras cargadas entremezcladas con fibras no cargadas si es necesario para las propiedades mecánicas.

Las fibras también se pueden usar junto con endoprótesis disponibles comercialmente para aportar fármacos en la zona de colocación. En este caso, las fibras no deben proporcionar soporte mecánico, sino que solo servirán como un depósito para aporte de fármaco.

Ejemplo 5

Preparación y uso de apósitos para heridas

5 En otra realización, una gasa o apósito se puede elaborar a partir de estas fibras. Este apósito puede tener dos caras, una superficie superior que liberará moléculas para la reepitelialización y proporcionará un sustrato para estas células. La superficie inferior promoverá la regeneración de tejido dérmico. Este apósito está diseñado para la curación de heridas dérmicas, incluyendo quemaduras, heridas dérmicas de profundidad total y heridas y escaras crónicas o que no se curan. Cada fibra puede tener una configuración de varios componentes y varias capas para proporcionar liberación temporal de fármacos o factores que corresponden aproximadamente a las tres fases de la curación de heridas dérmicas.

10 Como un ejemplo, en el caso de un apósito diseñado para pacientes con traumatismo, el primer producto químico a liberar podría ser un procoagulante para ayudar a detener la hemorragia. La siguiente capa podría liberar a continuación citocinas para ayudar a incorporar neutrófilos y macrófagos para la siguiente fase de la curación de la herida. Finalmente, una liberación de factores ayuda a reducir el tejido cicatrizal excesivo y a inhibir las contracciones, que son particularmente incapacitantes para pacientes quemados.

Ejemplo 6

Fabricación de arterias artificiales

20 Es posible construir una arteria artificial usando técnicas descritas en la presente. Una serie de secciones cilíndricas concéntricas huecas se puede tricotar, coser, trenzar o fabricar usando tecnología no tejida con fibras cargadas con diversos agentes biológicos. El cilindro más interior preferiblemente está tejido apretadamente y contiene fármacos o agentes para promover la migración, la extensión y el funcionamiento de una capa de células endoteliales intactas. El siguiente cilindro está compuesto por una arquitectura tejida o tricotada con fibras predominantemente arrolladas circunferencialmente alrededor del cilindro interior. Esta capa inducirá la migración y la proliferación de fibras del músculo liso, y promoverá la expresión de elastina para crear el medio elástico interno. El siguiente cilindro está compuesto por fibras tricotadas o no tejidas y contendrá fármacos para promover el crecimiento infiltrante de fibroblastos, macrófagos y la creación de una matriz extracelular. La última capa estará compuesta por fibras longitudinales que promoverán la vascularización de las células arteriales a través de vasos vasculares artificiales, creados mediante fibras que liberan VEGF, u otros promotores de la angiogénesis.

Ejemplo 7

30 3.7. Armazón para aporte de fármaco

35 En otra realización de aplicación, estas fibras se pueden usar para armazones para aporte de fármacos en lugares en los que es apropiado un formato fibroso. Por ejemplo, dentro del ojo, donde es más probable que las microesferas u otros formato interfieran con la visión del sujeto, una fibra se podría fijar y no flotar en el campo de visión. Las fibras pueden ser capaces de permanecer en su lugar mejor que las microesferas u otros formatos tales como nanopartículas, hidrogeles, etc.

Ejemplo 8

Angiogénesis in situ dirigida

40 En esta realización, una o más fibras que contienen uno o más de la familia de factores angiogénicos tales como VEGF, bFGF, angiotensina u otros que se sabe que inducen la angiogénesis se colocan dentro del cuerpo a lo largo del camino en el que se desea la angiogénesis dirigida. Cuando la fibra empieza a liberar los factores angiogénicos, células endoteliales procedentes de la vasculatura circundante serán inducidas a migrar hacia la fibra o las fibras después de un proceso similar a la angiogénesis normal. La fibra o las fibras usadas pueden tener una o más de las composiciones descritas en esta invención, o puede ser un tubo con VEGF o un factor de crecimiento similar que es quimiotáctico para células endoteliales sobre el interior, y un factor diferente para músculos lisos sobre el exterior. De este modo, se puede determinar el tamaño del vaso creado. En esta aplicación, las células son guiadas a armazones inicialmente libres de células por factores de crecimiento específicos para las células.

Ejemplo 9

Curación de fracturas óseas

5 En otra realización de curación de heridas, proteínas que se sabe que potencian la curación de fracturas óseas se cargan en una fibra. Esta fibra se puede envolver a continuación alrededor del hueso en la zona de la fractura, liberando los factores de crecimiento y aumentando la velocidad de reparación de la fractura.

Estas fibras bien pueden tener una estructura helicoidal (hélice simple o múltiple) o bien pueden estar tejidas en una tela abierta floja. En el formato bien helicoidal o bien tejido, las fibras se colocan alrededor de los fragmentos de hueso, manteniéndolos en su lugar mientras liberan sus factores de crecimiento.

10 En el caso de una fractura que no se cura debido a suministro sanguíneo perdido o pobre a la zona de la fractura, se puede usar una fibra o un grupo de fibras que contienen VEGF o su equivalente para potenciar el suministro de sangre al área fracturada.

15 En esta realización, las fracturas óseas se pueden curar a velocidades aceleradas en comparación con las fracturas no tratadas, y en ciertos casos se pueden curar pseudoarticulaciones.

20 En una tercera aplicación más de curación de huesos, se pueden usar fibras que liberan analgésicos en el área local de la fractura. En este caso, la fibra se puede usar en casos en los que se implantan placas, tornillos u otros dispositivos ortopédicos o se realizan otras manipulaciones quirúrgicas del hueso. El alivio del dolor local puede conducir al paciente a aplicar carga a la fractura más pronto y puede conducir a una reparación más fuerte y más rápida, así como hacer la vida más cómoda al paciente.

Ejemplo 10

Curación de úlceras cutáneas

25 De forma similar al ejemplo 5 que describía una forma de curación de heridas dérmicas, otro ejemplo importante de esta tecnología es el potencial de curación de úlceras cutáneas crónicas de diversos orígenes, tales como úlceras podales diabéticas, úlceras venosas y escaras de decúbito generales. Estas afecciones, y potencialmente otras afecciones similares, se puede curar basándose en la creación de una malla no tejida de fibras que liberan factores que se sabe que aceleran la curación de heridas dérmicas, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante-beta (TGF-beta) y VEGF o una proteína similar. Esta malla no tejida se puede insertar o rellenar directamente en la úlcera o herida, donde estos factores de crecimiento pueden ayudar a acelerar el proceso de curación de heridas. Estos apósitos pueden estar diseñados para la curación de escaras y úlceras dérmicas. En este caso, existe poca necesidad de reducir la hemorragia; en cambio, una de las mayores necesidades de estos pacientes, particularmente aquellos con úlceras diabéticas, es la falta de suministro de sangre a la zona de la herida. Por lo tanto, los factores que inducen la angiogénesis pueden ser capaces de incrementar la circulación y ayudar a rejuvenecer el tejido en la zona de la escara o la úlcera.

35

Cada apósito puede estar diseñado para las necesidades particulares de los diversos tipos de heridas o escaras al alterar las biomoléculas que se liberan, y la cinética a la que se liberan.

Ejemplo 11

40 Injertos musculares

En otra realización, series paralelas de fibras se pueden cargar con células madre musculares. Estas células madre pueden ser de origen de músculo cardíaco, liso o esquelético. Una vez que estas células madre musculares se siembran sobre la serie de fibras, las fibras se pueden estirar mecánicamente in vitro para ayudar a que estas fibras se alineen y se diferencien apropiadamente. El alineamiento también se puede conseguir al usar fibras de diámetro muy pequeño. La experiencia de los presentes inventores con axones indica que con fibras del orden de 50 µm de diámetro, tienden a ayudar a que las células se alineen paralelas al eje de las fibras. Otras fibras de este haz pueden liberar factores angiogénicos para crear un suministro vascular para las células musculares. En el caso de tejido muscular esquelético o liso, también se pueden incluir fibras para el crecimiento nervioso para inducir la formación de uniones neuromusculares. Diversas condiciones experimentales usadas para recoger, aislar, reproducir y diferenciar estas células madre son conocidas por los expertos en la especialidad, y no es parte de esta patente.

50

## Ejemplo 12

## Tratamiento del glaucoma

De forma similar al aporte de fármaco en el ojo, descrito en el ejemplo 7, y la endoprótesis neural descrita brevemente en el ejemplo 3, el glaucoma se puede tratar al combinar un aporte de fármaco intraocular con un tratamiento neural aplicado al nervio óptico. Las células ganglionares retinales sufren apoptosis que conduce a una muerte de los axones del nervio óptico. Se establece como hipótesis que si las células se pudieran soportar tanto dentro del ojo como a lo largo del camino del nervio óptico, las células podrían ser capaces de sobrevivir. Un haz de fibras que libera factores de crecimiento tales como NT-4, BDNF, CNTF se puede aplicar tópicamente al exterior del nervio óptico. Simultáneamente, fibras que liberan inhibidores de la apoptosis o factores para soportar las células ganglionares retinales se implantan dentro del ojo. Este esfuerzo combinado puede prolongar o salvar la vista de los que sufren glaucoma.

Como se observa a partir de los ejemplos precedentes, es posible coser a otros tejidos, órganos o estructuras una vez que se entienda la estructura fisiológica básica. Esto se puede extender a órganos del sistema digestivo, el sistema musculoesquelético, el sistema urológico, el sistema circulatorio y el sistema nervioso.

## Ejemplo 13

Creación de un núcleo de gel o hidrogel en una envuelta de polímero biodegradable que contiene una fase acuosa dispersada.

En otra realización de la invención, las fibras con alma de gel también pueden contener agentes terapéuticos en una fase acuosa dispersada, de gel o hidrogel dentro de la pared de la fibra de polímero biodegradable. El aparato y las condiciones de extrusión son similares al ejemplo 1 excepto cuando se apunte en la presente.

Una vez que el polímero se disuelve en el disolvente (A), una solución acuosa o un gel o un hidrogel (incluyendo precursores) que contiene tanto la biomolécula o biomoléculas de interés como un tensioactivo se añade a la solución de polímero. Adicionalmente, se puede añadir un tensioactivo al disolvente (A). La concentración de la fase acuosa está típicamente en el intervalo de 1 a 70% v/v de la solución de polímero, siendo 4-20% lo más típico para fibras de PLLA cargadas con gel o hidrogel. El tensioactivo puede ser uno o una combinación de sustancias familiares para los expertos en la especialidad, tales como albúmina de suero bovino (BSA), poli(alcohol vinílico), pluronics, o tensioactivos biológicos tales como la familia de fosfolípidos. Otros tensioactivos no mencionados específicamente en la presente, pero conocidos por los expertos en la especialidad, se incluyen por extensión. En un uso típico, se usa BSA como el tensioactivo en concentraciones que varían de aproximadamente 10 veces a 100 veces superiores que la molécula biológica de interés variando las concentraciones típicas de 2% en peso a 50% en peso de la fase acuosa. Nótese que la experiencia de los inventores ha demostrado que las concentraciones altas de proteína son difíciles en el caso de un gel o hidrogel, y, por lo tanto, el tensioactivo de elección puede depender del tipo de la fase dispersada.

Usando alguna forma de energía mecánica tal como ultrasonidos, turbulencia o fuerzas de cizalladura generadas al forzar el líquido a través de un orificio pequeño, se forma una emulsión de tipo de agua en aceite entre las fases acuosa y orgánica. Dependiendo del volumen de solución acuosa con relación a la solución de polímero, la emulsificación se puede efectuar por pasos, usando adiciones parciales de la fase acuosa hasta que el volumen total se incorpore en la solución de polímero. Esta emulsión debe ser estable durante períodos muy por encima del tiempo requerido para la extrusión para asegurar la homogeneidad de la emulsión a través del procedimiento de extrusión. El tamaño de las gotículas de la fase acuosa dispersada depende principalmente de la calidad del tensioactivo y la cantidad total de energía mecánica impartida al sistema al formar la emulsión. El tamaño de la fase acuosa es una variable importante tanto en la cinética de liberación como en las propiedades mecánicas de la fibra. Esta emulsión se usa a continuación como la solución de polímero, y todos los otros detalles son los mismos que los explicados en el ejemplo 1.

## Ejemplo 14

Creación de una fibra hueca con exterior de gel o hidrogel con una fase de gel o hidrogel dispersada dentro de la pared de la fibra.

Este ejemplo es similar al ejemplo 3 en todos los detalles excepto que se añade una fase dispersada a la solución de polímero que se describe en el ejemplo 13.

Todas las composiciones y los métodos divulgados y reivindicados en la presente se pueden elaborar y ejecutar sin experimentación excesiva a la luz de la presente divulgación. Aunque las composiciones y los métodos de esta

invención se han descrito en cuanto a realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a las composiciones y los métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en la presente sin apartarse del alcance de la invención. Más específicamente, será evidente que los agentes descritos en la presente se pueden sustituir por ciertos agentes que están tanto químicamente como fisiológicamente relacionados mientras se alcancen resultados iguales o similares. Se considera que todos estos sustitutos y modificaciones similares evidentes para los expertos en la especialidad están dentro del alcance de la invención según se define por las reivindicaciones adjuntas.

## REFERENCIAS

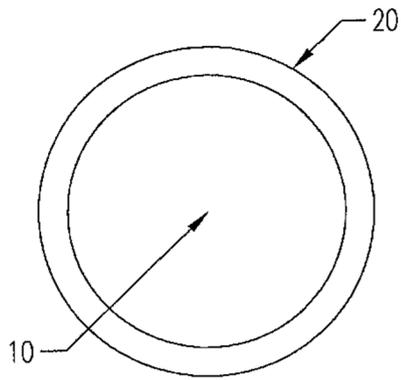
- 10 Aigner, Tegeler, Hutzler, Campoccia, Pavesio, Hammer, Kastenbauer, Naumann, "Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester," *J. of Biomed. Materials Res.*, 42(2):172-81, 1998.
- Auerbach y Auerbach, "Angiogenesis inhibition: a review," *Pharmac. Ther.*, 63:265, 1994.
- Breitbart, Grande, Kessler, Ryaby, Fitzsimmons, Grant, "Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells," *Plastic & Reconstructive Surgery*, 101(3):567-74, 1998.
- 15 Cao, Rodríguez, Vacanti, Ibarra, Arévalo, Vacanti, "Comparative study of the use of poli(glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage," *J. of Biomaterials Sci., Polymer Edition*, 9(5):475-87, 1998.
- Dillon, Yu, Sridharan, Ranieri, Bellamkonda, "The influence of physical structure and charge on neurite extension in a 3D hidrogel scaffold," *J. of Biomaterials Sci., Polymer Ed.*, 9(10):1049-69, 1998.
- 20 Elcin, Dixit, Lewin, Gitnick, "Xenotransplantation of fetal porcine hepatocytes in rats using a tissue engineering approach," *Artificial Organs*, 23(2):146-52, 1999.
- Fauza, Fishman, Mehegan, Atala, "Videofetoscopically assisted fetal tissue engineering: skin replacement," *J. of Pediatric Surgery*, 33(2):357-61, 1998.
- Fidler y Ellis, "The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis," *Cell*, 79:185, 1994.
- 25 Folkman y Klagsbrun, "Angiogenic factors," *Science*, 235:442-447, 1987.
- Folkman, "How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue," *Cancer Res.*, 46:467, 1986.
- Folkman, J., "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease," *Nature Med.*, 1:27, 1995.
- Grande, Halberstadt, Naughton, Schwartz, Manji, "Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts," *J. of Biomed. Mat. Res.*, 34(2):211-20, 1997.
- 30 Gutsche, Lo, Zurlo, Yager, Leong, "Engineering of a sugar-derivatized porous network for hepatocyte culture," *Biomaterials*, 17(3):387-93, 1996.
- Hoerstrup, Zund, Lachat, Schoeberlein, Uhlschmid, Vogt, Turina, "Tissue engineering: a new approach in cardiovascular surgery-seeding of human fibroblasts on resorbable mesh," *Swiss Surgery, (Supl.)*, 2:23-5, 1998.
- 35 Hoerstrup, Zund, Schoeberlein, Ye, Vogt, Turina, "Fluorescence activated cell sorting: a reliable method in tissue engineering of a bioprosthetic heart valve," *Annals of Thoracic Surgery*, 665(5):1653-7, 1998.
- Isogai, Landis, Kim, Gerstenfeld, Upton, Vacanti, "Formation of phalanges and small joints by tissue-engineering," *J. of Bone & Joint Surgery, American Vol.*, 81(3):306-16, 1999.
- Martin, Padera, Vunjak-Novakovic, Freed, "In vitro differentiation of chick embryo bone marrow stromal cells into cartilaginous and bone-like tissues," *J. of Orthopaedic Res.*, 16(2):181-9, 1998.

- Nagy y cols., "Pathogenesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation," *Cancer Res.*, 55:360, 1995.
- Peppas y Langer, "New challenges in biomaterials," *Science*, 263:1715-1720, 1994.
- 5 Peter, Miller, Yasko, Yaszemski, Mikos, "Polymer concepts in tissue engineering," *J. of Biomed. Materials Res.*, 43(4):422-7, 1998.
- Sacks, Chuong, Petroll, Kwan, Halberstadt, "Collagen fiber architecture of a cultured dermal tissue," *J. of Biomed. Engineering*, 119(1):124-7, 1997.
- Sambrook y cols., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.
- 10 Shinoka, Shum-Tim, Ma, Tanel, Isogai, Langer, Vacanti, Mayer, "Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering," *J. of Thoracic & Cardiovascular Surgery*, 115(3):536-45, 1998.
- Sims, Butler, Cao, Casanova, Randolph, Black, Vacanti, Yaremchuk, "Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes," *Plastic & Reconstructive Surgery*, 101(6):1580-5, 1998.
- 15 Vunjak-Novakovic, Obradovic, Martin, Bursac, Langer, Freed, "Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering," *Biotechnology Progress*, 14(2):193-202, 1998.
- Whang, Tsai, Nam, Aitken, Sprague, Patel, Healy, "Ectopic bone formation via rhBMP-2 delivery from porous bioabsorbably polymer scaffolds," *J. of Biomed. Materials Res.*, 42(4):491-9, 1998.
- Wong y Mooney, "Synthesis and properties of biodegradable polymers used in tissue engineering," In: *Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds*, (Atala y Mooney, eds.), Birkhauser Press, Boston, MA, pp. 51-82, 1997.
- 20 Yoo y Atala, "A novel gene delivery system using urothelial tissue engineered neoorgans," *J. of Urology*, 158(3 Pt 2):1066-70, 1997.

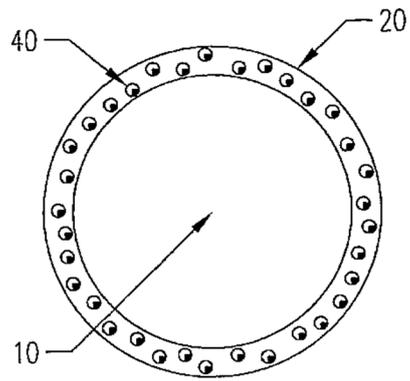
## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de aporte de fármaco que comprende al menos una fibra, en donde dicha fibra comprende una primera capa integrante y una segunda capa integrante, y en donde dicha primera capa integrante es un polímero biodegradable y dicha segunda capa integrante se selecciona del grupo que consiste en un gel o un hidrogel, en donde la primera capa integrante está presente en la pared externa de la fibra y la segunda capa integrante está presente en el alma de la fibra, y en la que un agente terapéutico está cargado en el gel o el hidrogel, y en donde la concentración del gel o el hidrogel varía como una función de la distancia a lo largo del eje largo de la fibra.
- 10 2. La composición según la reivindicación 1, en la que la primera capa integrante comprende además agentes de liberación capaces de reticular el gel o hidrogel.
3. La composición según la reivindicación 1, en la que la primera capa integrante comprende una envuelta de polímero biodegradable de varias capas y varios componentes.
- 15 4. La composición según la reivindicación 1, que comprende además al menos una fibra adicional, en donde dicha fibra adicional circunscribe una fibra interior adyacente.
- 20 5. La composición según la reivindicación 4, en la que dicha fibra interior adyacente está aproximadamente centrada dentro de la fibra exterior.
6. La composición según la reivindicación 1, en la que el agente terapéutico es un factor de crecimiento.
- 25 7. La composición según la reivindicación 6, en la que dicho factor de crecimiento es un promotor de la angiogénesis.
8. La composición según la reivindicación 6, en la que dicho factor de crecimiento promueve la regeneración nerviosa.
- 30 9. La composición según la reivindicación 1, en la que el agente terapéutico es un virus.
- 35 10. La composición según la reivindicación 1, en la que el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en una proteína, enzimas, factores de transcripción, moléculas de señalización, mensajeros internos, segundos mensajeros, cinasas, proteasas, citocinas, quimiocinas, proteínas estructurales, interleucinas, hormonas, anticoagulantes, procoagulantes, agentes antiinflamatorios, antibióticos, agentes que promueven la angiogénesis, agentes que inhiben la angiogénesis, factores de crecimiento, inmunomoduladores, agentes quimiotácticos, agentes que promueven la apoptosis, agentes que inhiben la apoptosis y agentes mitogénicos.
- 40 11. La composición según la reivindicación 1, en la que dicho gel o hidrogel es un gel precursor o hidrogel precursor.
12. La composición según la reivindicación 1, en la que dicha fibra de polímero biodegradable comprende un fármaco hidrófobo.
- 45 13. La composición según la reivindicación 1, en la que dicho gel o hidrogel comprende un material radiactivo.
- 50 14. Una composición de armazón que comprende una o más fibras, en donde dichas fibras comprenden una primera capa integrante y una segunda capa integrante, y en donde dicha primera capa integrante es un polímero biodegradable y dicha segunda capa integrante se selecciona del grupo que consiste en un gel o un hidrogel, en donde la primera capa integrante está presente en la pared externa de la fibra y la segunda capa integrante está presente en el alma de la fibra, y en la que un agente terapéutico está cargado en el gel o hidrogel, y en donde la concentración del gel o el hidrogel varía como una función de la distancia a lo largo del eje largo de la fibra.
- 55 15. La composición según la reivindicación 14, en la que la primera capa integrante comprende además agentes de liberación capaces de reticular el gel o hidrogel.
- 60 16. La composición según la reivindicación 14, en la que la primera capa integrante comprende una envuelta de polímero biodegradable de varias capas y varios componentes.
17. La composición según la reivindicación 14, que comprende además al menos una fibra adicional, en donde dicha fibra adicional circunscribe una fibra interior adyacente.
- 65 18. La composición según la reivindicación 17, en la que dicha fibra interior adyacente está aproximadamente centrada dentro de la fibra exterior.
19. La composición según la reivindicación 14, en la que el agente terapéutico es un factor de crecimiento.

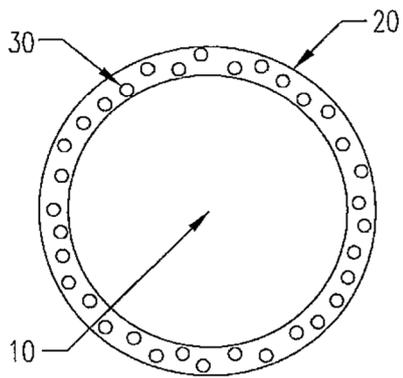
20. La composición según la reivindicación 19, en la que dicho factor de crecimiento es un promotor de la angiogénesis.
- 5 21. La composición según la reivindicación 19, en la que dicho factor de crecimiento promueve la regeneración nerviosa.
22. La composición según la reivindicación 14, en la que el agente terapéutico es un virus.
- 10 23. La composición según la reivindicación 14, en la que el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en una proteína, enzimas, factores de transcripción, moléculas de señalización, mensajeros internos, segundos mensajeros, cinasas, proteasas, citocinas, quimiocinas, proteínas estructurales, interleucinas, hormonas, anticoagulantes, procoagulantes, agentes antiinflamatorios, antibióticos, agentes que promueven la angiogénesis, agentes que inhiben la angiogénesis, factores de crecimiento, inmunomoduladores, agentes quimiotácticos, agentes que promueven la apoptosis, agentes que inhiben la apoptosis y agentes mitogénicos.
- 15 24. La composición según la reivindicación 14, en la que dicho gel o hidrogel es un gel precursor o hidrogel precursor.
- 20 25. La composición según la reivindicación 14, en la que dicha fibra de polímero biodegradable comprende un fármaco hidrófobo.
26. La composición según la reivindicación 14, en la que dicho gel o hidrogel comprende un material radiactivo.
- 25 27. Un método para fabricar una fibra, en donde dicha fibra comprende una primera capa integrante y una segunda capa integrante, y en donde dicha primera capa integrante es un polímero biodegradable y dicha segunda capa integrante se selecciona del grupo que consiste en un gel o un hidrogel, en donde la primera capa integrante está presente en la pared externa de la fibra y la segunda capa integrante está presente en el alma de la fibra, y en el que un agente terapéutico se carga en el gel o hidrogel, y en donde la concentración del gel o el hidrogel varía como una función de la distancia a lo largo del eje largo de la fibra
- 30



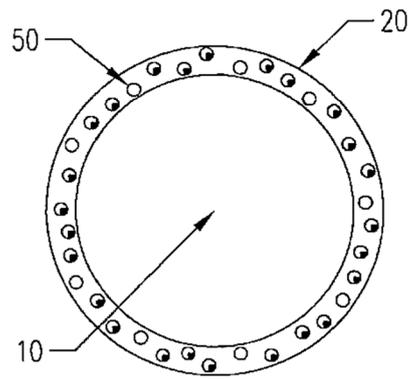
*FIG. 1A*



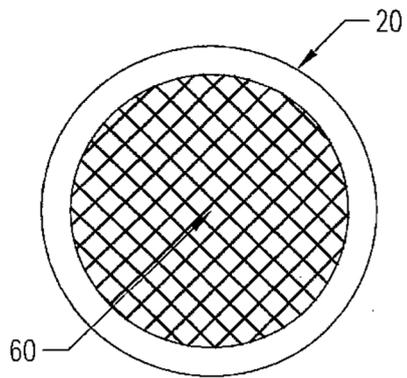
*FIG. 1C*



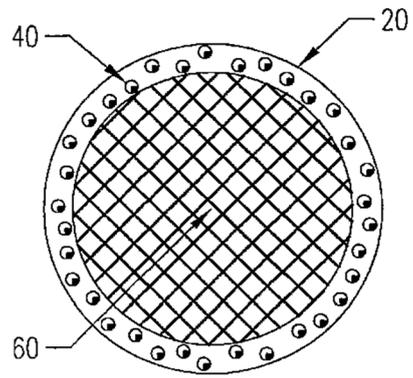
*FIG. 1B*



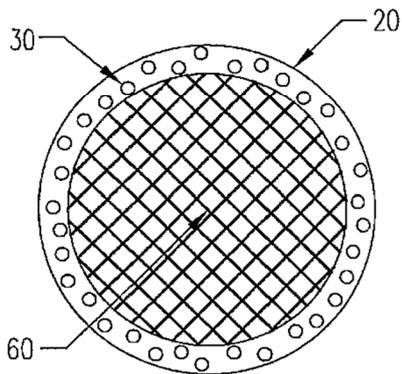
*FIG. 1D*



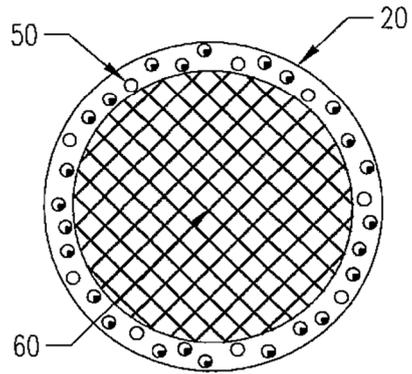
*FIG. 2A*



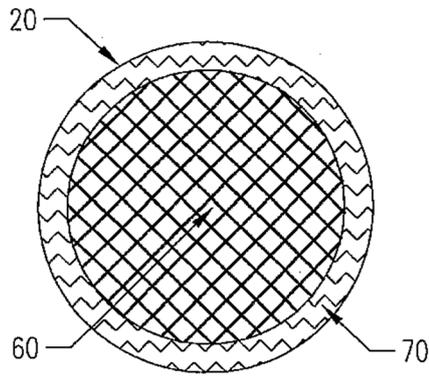
*FIG. 2C*



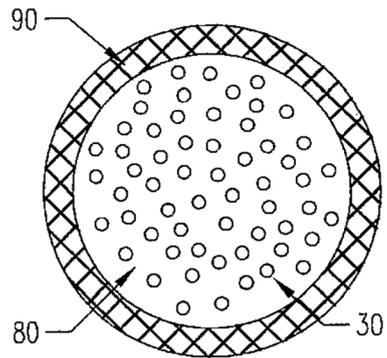
*FIG. 2B*



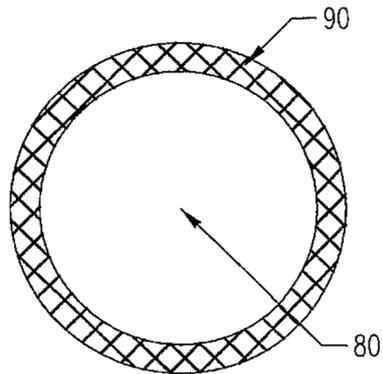
*FIG. 2D*



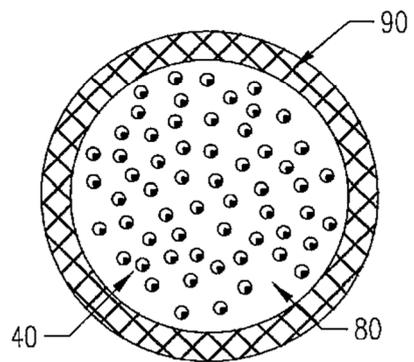
*FIG. 3A*



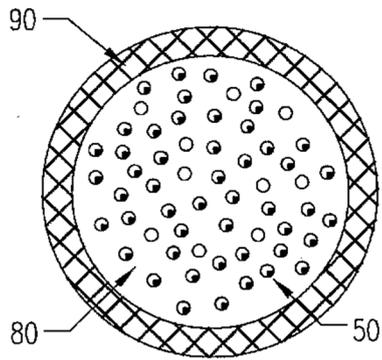
*FIG. 3C*



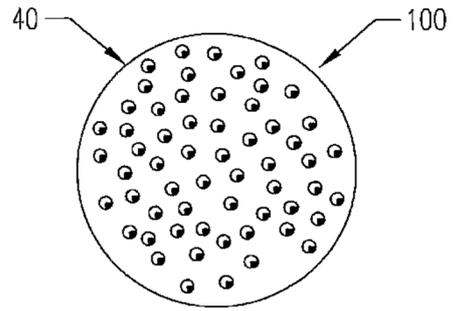
*FIG. 3B*



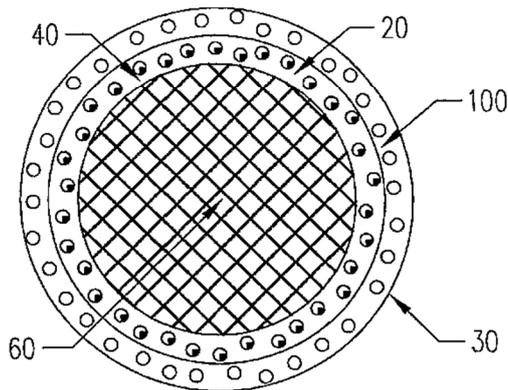
*FIG. 3D*



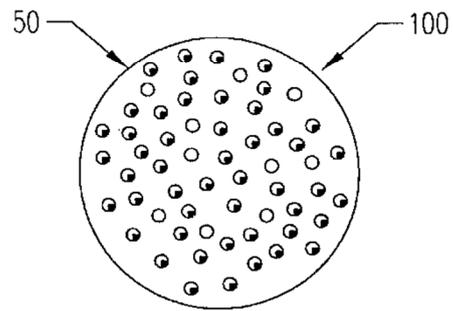
*FIG. 4A*



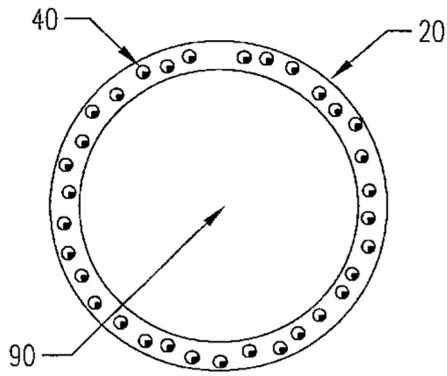
*FIG. 4C*



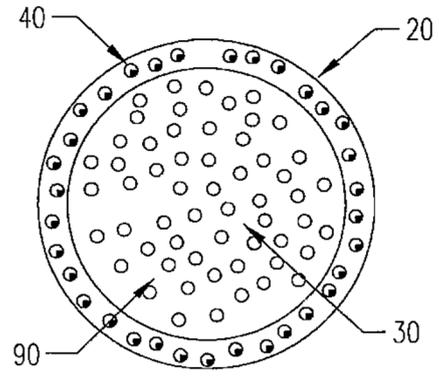
*FIG. 4B*



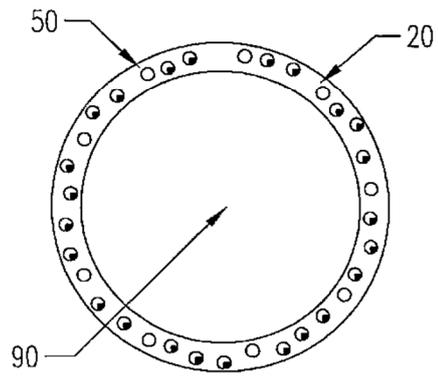
*FIG. 4D*



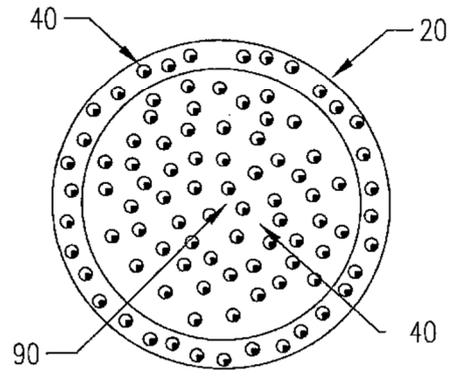
*FIG. 5A*



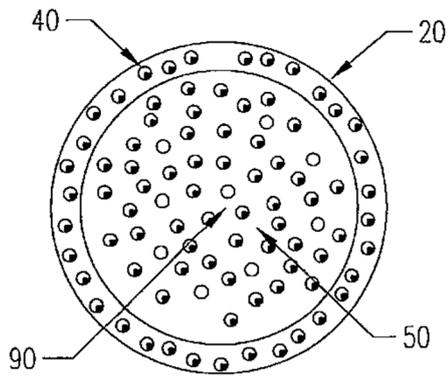
*FIG. 5C*



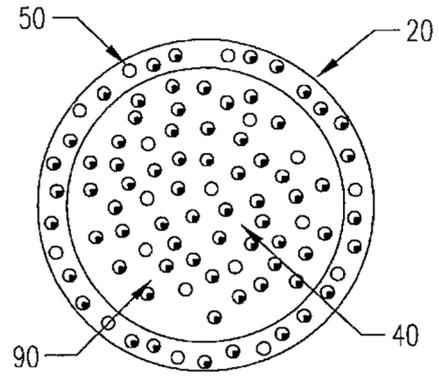
*FIG. 5B*



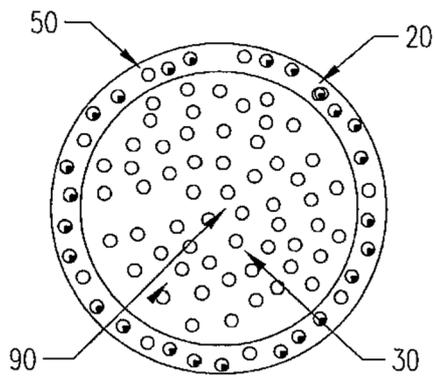
*FIG. 5D*



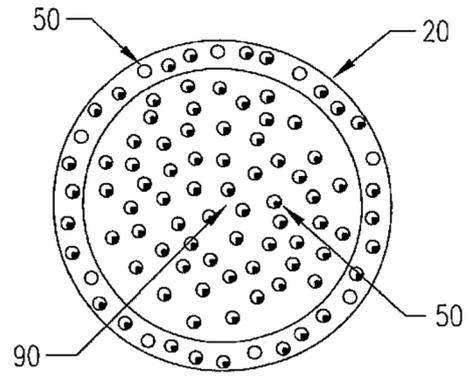
*FIG. 6A*



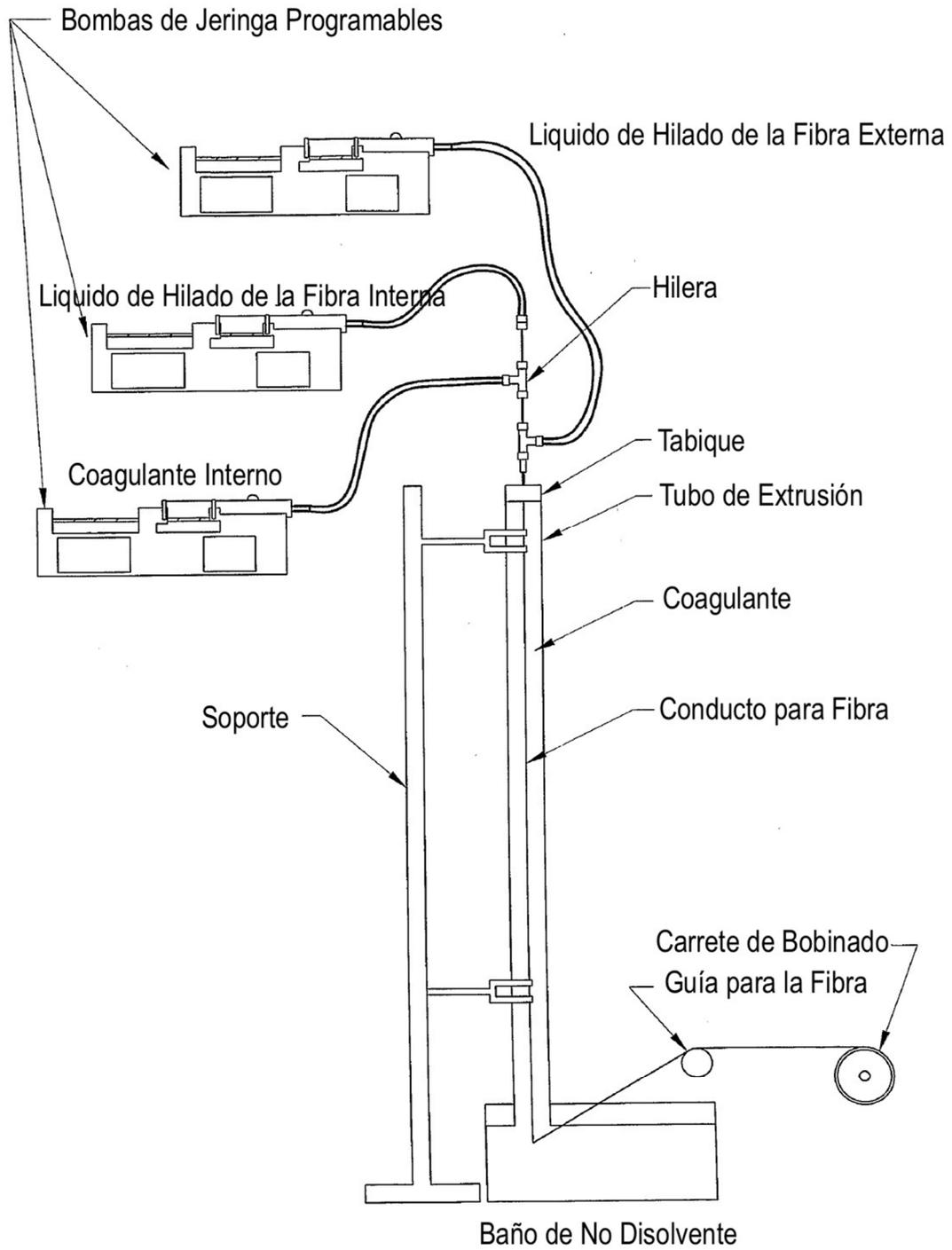
*FIG. 6C*



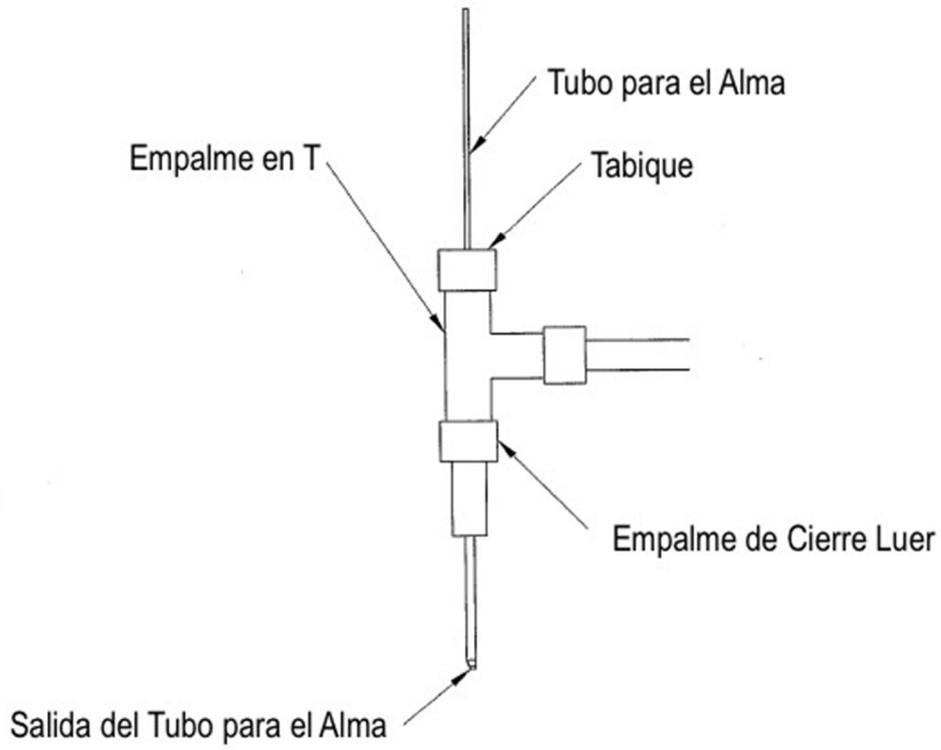
*FIG. 6B*



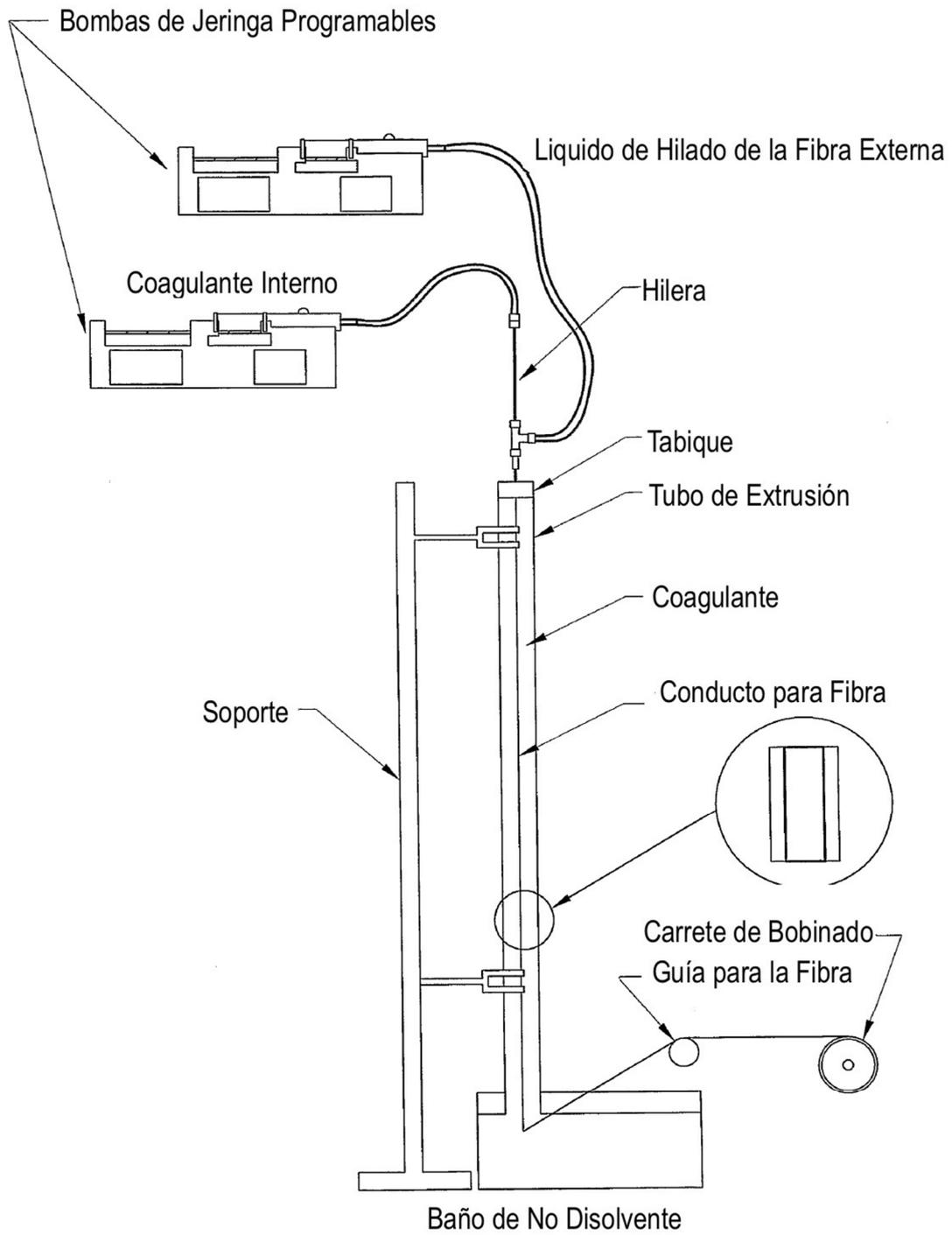
*FIG. 6D*



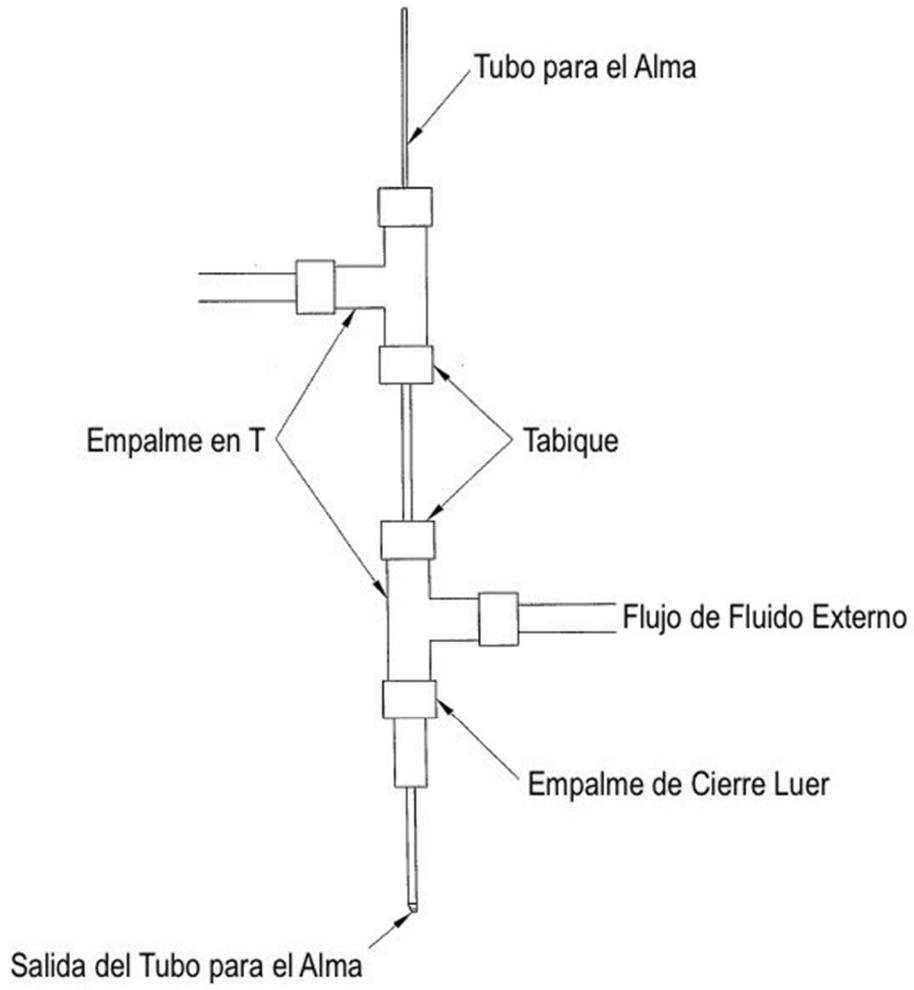
**FIG. 7**



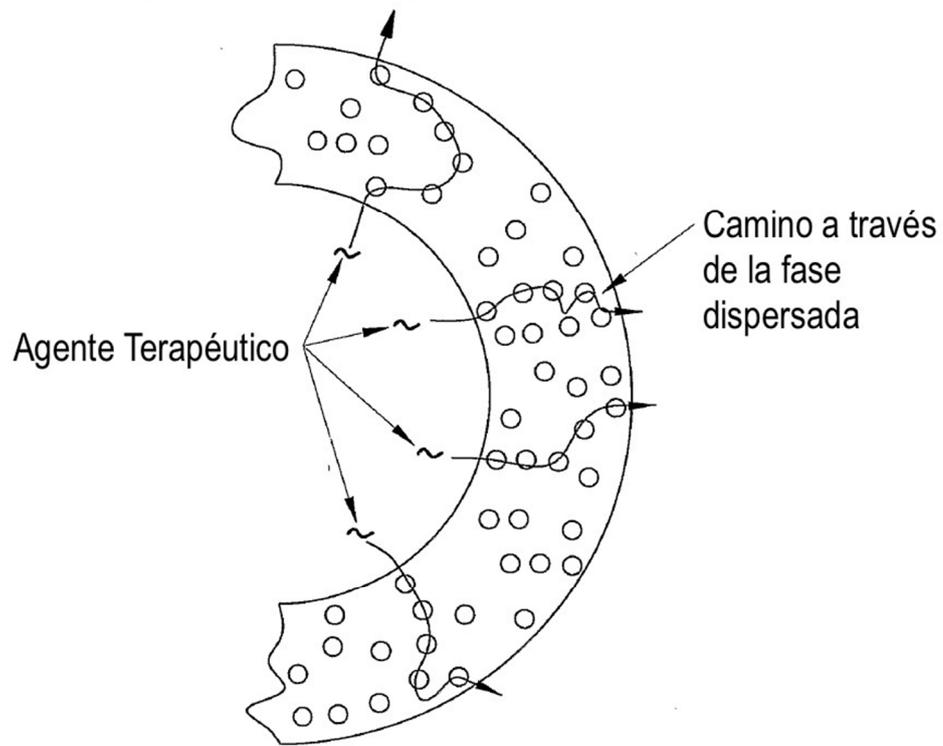
*FIG. 8*



**FIG. 9**



*FIG. 10*



**FIG. 11**