

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 004**

51 Int. Cl.:

A61L 27/18 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.01.2014 PCT/IB2014/058025**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014 WO14108814**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.01.2014 E 14703419 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2943230**

54 Título: **Andamio polimérico para regeneración cardíaca y protección contra lesión por reperfusión**

30 Prioridad:

09.01.2013 IT TO20130014

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

13.03.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO (50.0%)
Via Verdi 8
10124 Torino, IT y
UNIVERSITA DI PISA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CRISTALLINI, CATERINA;
GIACHINO, CLAUDIA;
BARBANI, NICCOLETTA;
CIBRARIO ROCCHIETTI, ELISA;
GAGLIARDI, MARIACRISTINA y
PAGLIARO, PASQUALE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 659 004 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

Andamio polimérico para regeneración cardíaca y protección contra lesión por reperfusión

5 La presente invención versa, en general, acerca de un dispositivo para ser utilizado en ingeniería de tejidos. En particular, la invención versa acerca de un andamio polimérico que, en virtud de su geometría y de su composición química particulares, se demuestra que es muy eficaz en la regeneración de tejido cardíaco. En realizaciones preferentes, el andamio de la invención también está dotado de una capacidad cardioprotectora contra daños provocados por reperfusión.

La mayor criticidad en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares es la restauración de funciones cardíacas deficientes como resultado de un ataque cardíaco.

10 La deficiencia de la actividad cardíaca está ligada a la fase aguda del evento de infarto, con el daño tisular consiguiente en el ámbito de la zona isquémica, y subsiguientemente a la capacidad regenerativa deficiente del tejido miocárdico.

15 Para reducir la lesión isquémica inicial, se adoptan técnicas de reperfusión, pero la propia reperfusión puede provocar daños a las células que sobreviven el evento isquémico inicial. De hecho, distintos estudios han mostrado que las denominadas lesiones por reperfusión pueden representar más de un 50% del tamaño de la lesión del tejido cardíaco después de un infarto. Por esta razón, el desarrollo de estrategias para proteger el miocardio postisquémico y maximizar los beneficios de la reperfusión representa una de las dianas más importantes de la investigación en el campo cardiovascular.

20 La ingeniería de tejidos está surgiendo como un nuevo planteamiento terapéutico para la regeneración de miocardio dañado. Se han intentado distintas estrategias para conseguir este resultado. Por ejemplo, varios grupos de investigación han propuesto el cultivo *ex vivo* de células cardíacas sobre materiales poliméricos biodegradables, implantables *in vivo* subsiguientemente. Sin embargo, este planteamiento plantea varios problemas y limitaciones, entre ellos la capacidad proliferativa limitada de los cardiomiocitos es especialmente evidente.

25 Hace unos años, se caracterizó una población de células madre multipotentes que residían en el corazón adulto, lo que parecía muy prometedor para su uso en la medicina cardíaca regenerativa. Por lo tanto, una perspectiva interesante para la regeneración de tejido cardíaco sería la ingeniería de estructuras de soporte (denominadas, de aquí en adelante, "andamios") fabricadas de material polimérico biocompatible, capaces de controlar la diferenciación de las células madre hacia un fenotipo cardiovascular, modulando el entorno espacial de las células con señales bioquímicas y físicas para evitar una disfunción miocárdica.

30 Como estrategia alternativa al cultivo *ex vivo* de células cardíacas, se propuso, por lo tanto, el uso de andamios de material polimérico biocompatible y biodegradable para la implantación en las regiones infartadas y, en particular, en la pared miocárdica a través de una sutura externa. Estos andamios desempeñarían un doble papel; por una parte, actuarían como un soporte mecánico para el tejido cardíaco dañado y por otra parte, favorecerían la adhesión y la proliferación de células cardíacas y sus precursores. La monografía "Nanoscale cues regulate the structure and function of macroscopic cardiac tissue constructs", Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 107, nº 2, 35 12 de enero de 2010 (12-01-2010), páginas 565-570, da a conocer un estudio que muestra la posibilidad de reconstruir tejido cardíaco cultivando miocitos sobre un sustrato con patrón nanométrico de PEG. El sustrato presenta surcos y aristas para imitar la ECM miocárdica natural y, por lo tanto, permite la orientación de las células. Los rebajes tienen una profundidad entre 0,2 y 0,5 μm , las aristas y los surcos tienen una anchura entre 0,15 y 0,8 40 μm . En general, los biomateriales adecuados para su uso en una ingeniería de tejidos deberían cumplir los siguientes requisitos: ser biocompatibles y bioactivos para facilitar la adhesión y la diferenciación celulares y, en general, la integración total del implante sin desencadenar una respuesta inmunitaria o inflamatoria del organismo; ser biodegradables y biorresorbibles, con una degradación controlada y un grado de reabsorción, de forma que se permita el crecimiento de células/tejidos *in vitro* y/o *in vivo*; poseer propiedades físico-químicas apropiadas; poseer 45 propiedades mecánicas tan similares como sea posible a las del tejido que se encuentra en el sitio de la implantación; ser mecánicamente estables durante un tiempo apropiado, para mantener la estructura tridimensional hasta la formación de nuevo tejido biológico.

50 En particular, el tejido cardíaco diseñado debería presentar las mismas propiedades funcionales del tejido muscular cardíaco natural y también debería permanecer visible incluso después del implante. La integración mecánica, eléctrica y funcional en la arquitectura del órgano también debería mejorar las funciones sistólica y diastólica del miocardio infartado. Por lo tanto, los andamios deberían ser contráctiles, electrofisiológicamente estables, mecánicamente robustos pero flexibles, adecuados para una vascularización y no inmunogénicos.

55 En los últimos años, se han estudiado varios tipos de polímeros, tanto naturales como sintéticos, para su uso en la ingeniería de tejido cardíaco. Los polímeros naturales descritos para este fin en la técnica anterior incluyen colágeno, gelatina y alginato. Entre los polímeros sintéticos, se han llevado a cabo varios estudios sobre poliésteres tales como ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL) y poliuretanos. Sin embargo, se

ha observado que, tras un esfuerzo reiterado debido a los ciclos cardíacos, los poliésteres pueden experimentar una deformación plástica.

Además de las propiedades mencionadas anteriormente, un andamio adecuado para la regeneración cardíaca también debe cumplir los siguientes requisitos: poseer una porosidad elevada con una red de poros interconectados, para permitir tanto el crecimiento de células como el transporte de nutrientes y la eliminación de catabolitos; ser fácilmente reproducible en distintos tamaños y formas, para permitir la industrialización del procedimiento de producción; ser fácilmente esterilizable con procedimientos que no modifican la estructura ni la composición química. También se ha observado que la geometría de la microestructura y el tamaño de los poros de los andamios deberían ser estudiados específicamente y seleccionados según la línea celular en la que se requiere una proliferación. Por ejemplo, se descubrió que la adhesión celular de los cardiomiocitos es favorecida por estructuras con una morfología alveolar con poros que tienen una anchura comparable con el tamaño de estas células.

Los mismos inventores de la presente solicitud de patente han estudiado andamios poliméricos de una microestructura rectangular según una geometría predefinida diseñada para imitar las características anatómicas del miocardio. Sin embargo, tales andamios no demostraron ser eficaces facilitando la proliferación y la diferenciación de células madre cardíacas hacia el linaje cardíaco, confirmando que la microestructuración por sí sola no es suficiente para garantizar la cardioinductividad.

A pesar de numerosos estudios e intensos esfuerzos de investigación llevados a cabo en el campo de la ingeniería de tejidos y, en particular, de tejido cardíaco, los dispositivos producidos hasta ahora tienen varias limitaciones funcionales y no poseen todas las cualidades requeridas para un uso clínico como sustitutos de miocardio.

Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar nuevos andamios poliméricos para la regeneración de tejido cardíaco que superen los problemas de la técnica anterior.

Según la presente invención, se consiguen estos y otros objetos por medio de un andamio polimérico para una regeneración cardíaca que comprende una estructura de soporte que comprende al menos una capa de soporte, caracterizándose la capa de soporte porque está fabricada de un material polimérico seleccionado del grupo que consiste en ácido poli(láctico-co-glicólico), ácido poli(3-hidroxibutírico-co-3-hidroxivalérico) y poli(dioxanona), posiblemente en asociación con un polímero biológico, caracterizándose la capa de soporte, además, porque tiene una superficie sobre la que se forma una pluralidad de cavidades, dispuestas en una celosía regular, estando definidas dichas cavidades por un conjunto de proyecciones lineales longitudinales y por un conjunto de proyecciones lineales transversales, que se intersectan entre sí, respectivamente.

Gracias a esta combinación de características geométricas y de composición química, el andamio polimérico de la invención ha demostrado ser eficaz en la regeneración de tejido cardíaco, según se demuestra mediante los experimentos llevados a cabo por los inventores, que se ilustran en la parte experimental de la presente descripción y, específicamente, en la sección relativa a la evidencia biológica.

Se explican con más detalle características y ventajas adicionales de la invención en la siguiente descripción detallada, proporcionada simplemente a modo de ejemplo no limitante y con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- la Figura 1a es una vista desde arriba de una realización del andamio polimérico de la invención;
- la Figura 1b es una sección transversal del andamio polimérico de la Figura 1a;
- la Figura 1c es una sección longitudinal del andamio polimérico de la Figura 1a;
- la Figura 2 es una vista en sección transversal de una realización adicional del andamio polimérico de la invención.

En la Figura 1a, el número 10 de referencia indica un andamio polimérico para una regeneración cardíaca según la invención, que comprende una estructura de soporte indicada con el número 20 de referencia. La estructura 20 de soporte comprende, a su vez, al menos una capa 30 de soporte fabricada de material polimérico, que presenta características geométricas particulares y una composición química que hace el andamio 10 sorprendentemente eficaz en la regeneración de tejido cardíaco. En cuanto a la composición química, la capa 30 de soporte se caracteriza por una selección precisa de los polímeros constituyentes, que se seleccionan entre ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poli(3-hidroxibutírico-co-3-hidroxivalérico) (PHBHV) y poli(dioxanona) (PDS), posiblemente en combinación con un polímero biológico que se selecciona, preferentemente, del grupo que consiste en gelatina, ácido hialurónico, colágeno y goma gelana. En cuanto a las características geométricas, la capa 30 de soporte se caracteriza por la presencia de una pluralidad de cavidades 41 formadas en una de sus superficies o caras, estando dispuestas las cavidades 41 en una celosía regular y están definidas por un conjunto de proyecciones lineales longitudinales 40a, 40b y por un conjunto de proyecciones lineales transversales 40c, que se intersectan entre sí, respectivamente.

Según una realización representada específicamente en las Figuras 1a-1c, las cavidades 41 tienen una dimensión longitudinal y una dimensión transversal que, en la Figura 1a, se identifican con L y W_1 , respectivamente. Preferentemente, las cavidades 41 tienen una dimensión longitudinal L en el intervalo de 350-600 μm y una

dimensión transversal W_1 en el intervalo de 30-150 μm , pero estos valores no deberían ser interpretados en un sentido limitante en modo alguno. La Figura 1b (que representa la sección transversal a lo largo del plano B-B de la realización del andamio polimérico 10 de la Figura 1a) también muestra que las cavidades 41 se caracterizan por una profundidad d , que se encuentra, preferentemente, sin limitación, en el intervalo de 20-100 μm . Se prefieren estas dimensiones dado que permiten fácilmente el alojamiento de las células madre cardíacas (indicadas por C en la Figura 2).

Según la realización ilustrada específicamente en las Figuras 1a-1c, las cavidades 41 tienen esencialmente una forma rectangular. Sin embargo, en el contexto de la invención, se aplican realizaciones alternativas, que no se ilustran específicamente en las figuras, en las que las cavidades 41 tienen distintas formas geométricas, que pueden ser esencialmente regulares o incluso irregulares.

Como se muestra claramente en la Figura 1a, las cavidades 41 están definidas por un conjunto de proyecciones lineales longitudinales 40a, 40b y por un conjunto de proyecciones lineales transversales 40c, que se intersectan entre sí, respectivamente. Las proyecciones lineales longitudinales 40a, 40b también se muestran en la Figura 1b. Las proyecciones lineales transversales 40c también se indican en la Figura 1c, que representa la sección transversal a lo largo del plano A-A de la realización del andamio polimérico 10 de la Figura 1a.

Según la realización ilustrada en la Figura 1a, existen dos tipos distintos de proyecciones longitudinales: proyecciones anchas 40b y proyecciones estrechas 40a, que se disponen en una secuencia alternante. Las proyecciones anchas 40b se caracterizan por una dimensión transversal W_2 que se encuentra, preferentemente (pero sin limitación), en el intervalo de 50-160 μm ; las proyecciones estrechas 40a se caracterizan por una dimensión transversal W_3 que se encuentra, preferentemente (pero sin limitación), en el intervalo de 20-120 μm , con la condición de que W_2 sea mayor que W_3 . En la realización de la Figura 1a, esta secuencia alternante de proyecciones anchas 40b y de proyecciones estrechas 40a contempla una proyección ancha 40b por cada dos proyecciones estrechas 40a, pero en el contexto de la invención se incluyen realizaciones adicionales, no ilustradas específicamente en las figuras, en las que las proyecciones anchas 40b y las proyecciones estrechas 40a se alternan según distintas secuencias, o en las que solo hay un tipo de proyección longitudinal, o en las que hay más de dos tipos de proyecciones longitudinales que difieren entre sí en los valores de las dimensiones transversales respectivas.

Las Figuras 1a, 1b y 1c hacen referencia al andamio polimérico 10 con una estructura 20 de soporte que comprende una única capa 30 de soporte. Por lo tanto, se denomina a esta realización "capa única". En una realización preferentemente, pero no limitante, el grosor total de la única capa del soporte 30 se encuentra en el intervalo de 40-250 μm .

En la siguiente parte experimental, se describe en detalle la preparación de dos realizaciones específicas del andamio polimérico 10 de una única capa, que difieren entre sí en sus dimensiones d , L y W_1 de las cavidades 41 y que, en ambos casos, han resultado ser eficaces en las aplicaciones pertinentes de ingeniería de tejidos.

En la Figura 2 se ilustra una realización alternativa, designada "forma intercalar", en la que la estructura 20 de soporte del andamio polimérico 10 comprende una primera capa 30 de soporte y una segunda entre las que se intercala una capa intermedia 33, también fabricada de material polimérico. Según esta realización en "forma intercalar", las capas primera y segunda 30 de soporte tienen cavidades 41, que se enfrentan, respectivamente, hacia lados opuestos de la estructura 20 de soporte. El material polimérico, del que está compuesta la capa intermedia 33 es preferentemente un polímero biológico biodegradable, tal como gelatina. También se ha demostrado que esta realización particular es eficaz en las aplicaciones pertinentes de ingeniería de tejidos.

La Figura 2 también muestra células C, preferentemente células madre cardíacas, alojadas en el interior de las cavidades 41 del andamio polimérico 10 de la invención que, por consiguiente, tras la implantación, podrá ejercer sus efectos cardioregenerativos gracias a la presencia de estas células que se multiplicarán y diferenciarán, dando lugar a nuevo tejido cardíaco funcional. Por supuesto, todas las realizaciones del andamio polimérico 10 que se encuentran dentro del alcance de la presente invención están configuradas para alojar células madre cardíacas u otros tipos de célula eficaces en la regeneración de tejido cardíaco.

Una realización adicional particularmente preferente del andamio polimérico 10 de la invención, que no se ilustra específicamente en las figuras, contempla la inclusión en la capa 30 de soporte (véanse las Figuras 1a-1c) o en las capas 30 de soporte y/o la capa intermedia (véase la Figura 2) de un ingrediente farmacéutico activo cardioprotector, tal como adenosina o ciclosporina A, adecuado para proteger el tejido cardíaco contra daños por la reperfusión. En este caso, el andamio polimérico 10 se comportará como un "reservorio de fármacos", configurado para liberar el ingrediente farmacéutico *in situ* según el momento y las cantidades requeridos, y poder ejercer, por lo tanto, los efectos cardioprotector al mismo tiempo que los efectos cardioregenerativos. La presente realización es particularmente innovadora debido a que, hasta donde saben los inventores, no se han descrito anteriormente andamios poliméricos para su uso en aplicaciones de ingeniería de tejidos, específicamente tejido cardíaco, dotados de propiedades cardioprotectoras contra daños por la reperfusión, junto con propiedades cardioregenerativas.

En la presente realización, es preferible que, entre sus materiales constituyentes, la o las capas 30 de soporte y/o la capa intermedia 33 incluyan un polímero biológico con capacidad para disolverse con el paso del tiempo cuando sea implantado *in loco*, por ejemplo gelatina. La gelatina es una sustancia muy conocida y utilizada en la industria farmacéutica, pudiendo seleccionar los expertos en la técnica la opción correcta y la dosis correcta, y permitir la regulación del momento y de la tasa de liberación del ingrediente activo.

En una realización aún más preferente del andamio polimérico 101 de la invención, que se describe en detalle en la siguiente sección experimental, el ingrediente farmacéutico activo no se incluye directamente en la matriz polimérica del andamio, sino que se encapsula en nanopartículas, preferentemente del tipo núcleo-envoltura, que, a su vez, se incluyen en la capa 30 de soporte o en las capas 30 de soporte y/o en la capa intermedia 33. La presente realización permite la obtención de una liberación prolongada del ingrediente farmacéutico activo con el tiempo.

Con el objeto de obtener dispositivos completamente biodegradables que respondan a los principales requisitos necesarios incluyendo una porosidad controlada, una homogeneidad desde un punto de vista químico y propiedades mecánicas satisfactorias, se prepararon los andamios poliméricos objeto de la presente invención mediante dos técnicas distintas de preparación: inversión de fase mediante inmersión en un no disolvente, e inversión de fase mediante la evaporación controlada de mezclas de disolventes. Ambas técnicas de preparación han sido optimizadas evaluando el efecto de un gran repertorio de parámetros (incluyendo la composición, las concentraciones de las soluciones poliméricas, la naturaleza y la cantidad de disolvente y no disolvente, la temperatura y la duración de las fases individuales) sobre las características de los productos finales. En la siguiente parte experimental, se proporcionan varios ejemplos de preparación de andamios poliméricos que se encuentran dentro del alcance de la presente invención, utilizando las dos técnicas de preparación mencionadas anteriormente. Por supuesto, la divulgación técnica proporcionada en estos ejemplos específicos de preparación son aplicables, en general, a la preparación de cualquier andamio polimérico que se encuentre dentro del alcance de la invención.

La siguiente parte experimental ilustra adicionalmente la preparación de diversas realizaciones específicas del andamio polimérico de la invención, incluyendo realizaciones de una única capa, de forma intercalar y de reservorio de fármacos, al igual que la preparación y el uso de nanopartículas de núcleo-envoltura adecuadas para encapsular el ingrediente farmacéutico activo cardioprotector utilizado en el alcance de la invención. También se describen los resultados del estudio de la caracterización mecánica, físico-química y morfológica, efectuada en diversas realizaciones del andamio polimérico de la invención, al igual que los resultados de ensayos biológicos llevados a cabo con el fin de comprobar la biocompatibilidad, las capacidades cardioregenerativas y las capacidades cardioprotectoras, referentes, en particular, a los daños por la reperfusión. Esta parte experimental se proporciona meramente con fines ilustrativos y no debería ser interpretada en modo alguno en un sentido limitante del alcance de la invención, según se define por las reivindicaciones adjuntas.

Parte experimental

Los ejemplos 1-6 describen la preparación de matrices poliméricas que tienen distintas composiciones y utilizan distintas técnicas de preparación. Las matrices poliméricas preparadas según se describe en los ejemplos 1-6 fueron utilizadas subsiguientemente para la producción de andamios poliméricos, según se describe en el ejemplo 7.

Ejemplo 1: preparación de matrices de PLGA/gelatina

Se llevaron a cabo experimentos para la optimización del procedimiento de mezclar disoluciones de PLGA en un disolvente adecuado, en particular diclorometano o cloroformo, y disoluciones acuosas de gelatina. Los parámetros considerados fueron: la concentración de las disoluciones de partida, la relación de peso entre los componentes, la selección de los disolventes, y el procedimiento de secado (evaporación de disolventes o liofilización).

Preparación por inversión de fase mediante inmersión en un no disolvente

Se prepararon disoluciones de PLGA en sulfóxido de dimetilo (DMSO) en concentraciones desde 1 hasta 5% p/v. Las disoluciones fueron esparcidas sobre un soporte plano de vidrio o un sustrato microfabricado utilizando una hoja con un movimiento horizontal controlado, y sumergidas subsiguientemente en un baño de inversión que consiste en una disolución de agua/DMSO (1/1 v/v) que contiene gelatina en concentraciones variables (1%, 2%, 5% y 10% p/v) durante 20 horas. Mediante este procedimiento, se introduce el polímero biológico en la estructura porosa de la membrana durante la fase de inversión. Al final del procedimiento de inversión, se secaron las membranas obtenidas en un horno ventilado a 37°C +/- 1°C durante 24 horas.

Preparación por inversión de fase mediante una evaporación controlada de mezclas de disolventes

Se prepararon mezclas que contenían dos solutos (PLGA y gelatina) y tres disolventes según las relaciones volumétricas establecidas dependiendo del diagrama de fases de las mezclas ternarias.

Se prepararon disoluciones poliméricas de PLGA, en concentraciones iguales a 1% y 5% p/v en diclorometano o cloroformo, y acetona o acetonitrilo. Se añadieron disoluciones acuosas de gelatina a estas, bien neutrales o aciduladas con ácido acético al 0,5% v/v, en concentraciones iguales a 1% y 5% p/v. Se varió el volumen de la

disolución de gelatina añadiendo una cantidad suficiente de soluto para obtener distintos porcentajes de relación de peso del sistema de PLGA/gelatina (95/5, 85/15, 75/25, 70/30).

Ejemplo 2: preparación de matrices de PHBHV/gelatina

5 También se optimizaron los procedimientos de preparación de estas matrices, con el objeto de obtener andamios poliméricos que tienen una porosidad elevada e interconectada, homogéneos desde un punto de vista químico y caracterizados por una estructura estable con propiedades mecánicas apropiadas. Se prepararon las matrices a base de PHBHV/gelatina mediante un número de técnicas de preparación basadas en la inversión de fases mediante evaporación controlada de mezclas de disolventes y procedimientos subsiguientes de evaporación de disolventes o de liofilización. Se prepararon matrices de PHBHV/gelatina en distintas composiciones porcentuales: 10 95/5, 90/10, 85/15, 80, 20 y 75/25 (p/p).

Preparación mediante evaporación controlada de la mezcla de disolventes

Ejemplo A

Se prepararon disoluciones de PHBHV en cloroformo, en concentraciones iguales a 1% o 5% p/v. Se añadieron disoluciones acuosas de gelatina a estas disoluciones, en concentraciones iguales a 1% o 5%. La cantidad de disolución de gelatina introducida depende de la relación de la composición del sistema bioartificial que se requiera y, en particular, se prepararon sistemas utilizando esta técnica con las siguientes composiciones porcentuales de PHBHV/gelatina (p/p): 95/5, 90/10, 85/15, 80/20 y 75/25. Después de la mezcla, se agitaron enérgicamente las disoluciones para permitir la dispersión del componente biológico, y subsiguientemente fueron colocadas en placas de Petri de vidrio o placas microfabricadas y colocadas en un horno ventilado ($T = 25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, o $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) 15 durante dos horas, o liofilizadas. 20

Ejemplo B

En función de los datos del diagrama de fases de dos mezclas ternarias de disolventes, se prepararon mezclas que contenían los dos solutos y tres disolventes (primer disolvente: diclorometano o cloroformo, segundo disolvente: acetona o acetonitrilo, tercer disolvente: agua). Se prepararon las disoluciones de PHBHV en diclorometano o cloroformo con concentraciones iguales a 1%, 2%, 3%, 4% y 5%. A estas disoluciones, se añadieron el segundo disolvente y, finalmente, la disolución acuosa de gelatina, cuya concentración depende de la cantidad de soluto que se requiere en el sistema bioartificial final. 25

Ejemplo 3: preparación de los matrices de PDS/gelatina

Se obtuvieron materiales bioartificiales a base de PDS y de gelatina a partir de disoluciones de PDS al 10% p/v, introduciendo una cantidad de gelatina igual a 5% p/p de PDS. Se colocaron volúmenes de 4 ml de las disoluciones obtenidas de esta manera en placas de Petri de vidrio ($\Phi = 5,5$, volumen 4 ml) o placas microfabricadas, la disolución fue espesada durante media hora sobre la placa calentada hasta 80°C , entonces se sumergió la muestra en un primer baño de inversión, que consistía en una mezcla de $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (50/50 v/v) durante una hora, y luego en un segundo baño de inversión, que consistía en H_2O durante una hora. Finalmente, se eliminó el no disolvente 30 mediante evaporación de disolventes en un horno ventilado a 40°C . 35

Ejemplo 4: preparación de matrices de PDS/goma gelana

Se prepararon matrices a base de PDS/goma gelana mediante una inversión de fase mediante una evaporación controlada de disolventes o una inversión de fase mediante inmersión en un no disolvente seguido de evaporación de disolventes o liofilización.

40 Preparación mediante evaporación controlada de una mezcla de disolventes

Se prepararon (a 60°C) disoluciones calentadas de PDS en DMSO. Después de la solubilización completa del polímero, se añadió goma gelana en una cantidad suficiente para obtener un sistema bioartificial de PDS/goma gelana con una composición porcentual de 90/10 (p/p). Finalmente, se añadió cloroformo en una cantidad suficiente para alcanzar la relación porcentual de DMSO/cloroformo en un volumen igual a 1/2. Se colocó la disolución obtenida de esta manera en una placa de Petri de vidrio o placa de PDMS y se mantuvo a una temperatura de 55°C hasta una evaporación completa de los disolventes. 45

Preparación por inversión de fase mediante inmersión en un no disolvente

Ejemplo A

Se prepararon disoluciones de PDS (a 6% y 10% p/v) en DMSO, junto con disoluciones de goma gelana en DMSO, y se mezclaron entre sí en una relación de peso de 90/10. La mezcla obtenida fue dispensada en placas de Petri o placas que habían sido colocadas sobre una placa calentadora a 50°C durante media hora para aumentar su 50

viscosidad. Entonces, se introdujo la mezcla, en algunos ensayos tras una congelación a -20°C , en un baño de agua de inversión durante 2 horas.

Ejemplo B

5 Un segundo procedimiento contemplado el uso de un baño de inversión que consistía en una mezcla de 50/50 agua/DMSO durante una hora, seguido de un segundo baño que consistía en únicamente agua durante una hora. Al final, la preparación tenía un aspecto blanquecino homogéneo y era bastante resistente.

10 El uso de una hoja con un movimiento horizontal controlado permite la deposición homogénea de la mezcla inicial 90/10 de PDS/goma gelana con un grosor controlado. Los ensayos llevados a cabo variando el grosor de la mezcla depositada han facilitado la aplicación de una correspondencia entre este valor y el grosor final de la membrana tras la liofilización. Por ejemplo, si la capa depositada antes de la fase de inversión es de $500\ \mu\text{m}$, el grosor final de la membrana es de aproximadamente $200\ \mu\text{m}$.

Ejemplo 5: preparación de matrices de PDS/colágeno

15 Se produjeron matrices a base de PDS/colágeno mediante técnicas de inversión de fase según dos metodologías distintas: evaporación controlada de los disolventes e inmersión en no disolvente. Se prepararon las matrices de PDS/colágeno en composiciones porcentuales iguales a 95/5, 90/10, 80/20 p/p.

Preparación mediante evaporación controlada de los disolventes

20 Se prepararon disoluciones de PDS en mezclas de 2/1 v/v de cloroformo/DMSO a concentraciones de 1%, 2%, 5% p/v, con agitación constante a 70°C . Entonces, se depositaron las disoluciones sobre cápsulas o placas de Petri y fueron colocadas sobre una placa calentadora a 40°C . Se modificaron químicamente las membranas obtenidas por medio de un agente reticulante (carbodiimida y/o succinimida) y fueron sumergidas subsiguientemente en distintas disoluciones con concentraciones variables de colágeno (0,1%-1% p/v) a un pH fisiológico durante 12 horas para obtener las composiciones mencionadas anteriormente.

Preparación mediante inmersión en no disolvente

25 Se prepararon disoluciones de PDS en DMSO a concentraciones de 3% y 10% p/v, con agitación constante a 70°C . Entonces, se depositaron las disoluciones sobre placas de Petri de vidrio colocadas sobre una placa calentadora a 70°C para aumentar su viscosidad. Entonces, se colocaron las placas en un baño de coagulación que consistía en dos fases, la primera consistía en una mezcla 50/50 de agua/DMSO durante una hora a temperatura ambiente, y la segunda consistía en agua bidestilada durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, las matrices obtenidas de esta manera fueron sometidas a la eliminación del no disolvente mediante evaporación de disolventes a 40°C .

30 Subsiguientemente, se modificaron químicamente las membranas por medio de un agente reticulante y fueron sumergidas en disoluciones variables de colágeno (0,1% hasta 1% p/v) a un pH fisiológico durante 12 horas para obtener las composiciones mencionadas anteriormente.

Ejemplo 6: preparación de matrices de PDS/ácido hialurónico

35 Se prepararon matrices a base de PDS/ácido hialurónico (HA) mediante técnicas de inversión de fase y procedimientos subsiguientes de evaporación de disolventes. Los sistemas de PDS/HA fueron preparados con composiciones variables en el intervalo de composiciones porcentuales de 80/20 - 40/60 (p/p).

40 Se prepararon disoluciones del éster activado de PDS mediante derivatización química (hidrólisis ácida y adición subsiguiente de un agente reticulante a base de carbodiimida) en DMSO, de concentraciones iguales a 10% p/v. Las disoluciones depositadas sobre las cápsulas o las placas fueron sometidas a una primera fase de espesamiento sobre una placa calentadora de 70°C , para aumentar la viscosidad del sistema. Entonces, se colocaron los sistemas en un baño de coagulación que consistía en dos fases (50/50 de mezcla de agua/DMSO durante una hora y únicamente agua durante la segunda hora, a temperatura ambiente) y fueron sometidos a la eliminación del no disolvente mediante evaporación de disolventes a 40°C .

45 Se añadieron disoluciones acuosas de HA a las membranas a base de PDS poroso, funcionalizadas químicamente para obtener sistemas bioartificiales de interacción iónica de PDS/HA que tenían composiciones de peso variable.

El procedimiento de preparación fue llevado a cabo con agitación constante a temperatura ambiente durante 6 horas.

Ejemplo 7: producción de los andamios poliméricos

50 Se utilizaron las matrices poliméricas, preparadas según se ha descrito en los ejemplos 1-6, para la producción de andamios poliméricos según la presente invención. Con este fin, se depositaron las disoluciones poliméricas en moldes de silicio derivados de un molde matriz de silicio obtenido mediante litografía blanda. Los moldes tienen

elementos geométricos en su superficie según la presente invención, diseñadas para imitar las características anatómicas del miocardio.

5 Se realizó una serie de dibujos de producción obtenidos mediante sistemas CAD (por ejemplo, AutoCAD Mathematical) según los conjuntos de cavidades y proyecciones mencionadas anteriormente, en una amplia gama de tamaños desde 1×1 cm hasta 6×3 cm, adecuados para ensayos celulares y una implantación *in vivo*.

10 Se aplicaron los modelos CAD a la técnica de litografía blanda para la producción del molde matriz de silicio. Se preparó una serie de moldes en polidimetilsiloxano (PDMS) utilizando un producto de *kit* Sylgard 184 de elastómero de silicona (Dow Corning Corporation). Inicialmente, se preparó una mezcla de monómero y agente reticulante, en una relación de peso de 10:1, mediante la mezcla cuidadosa de los dos componentes durante 10 minutos. Se llevaron a cabo las etapas de mezclado y de polimerización en un cuarto oscuro para evitar la inhibición de la actividad catalítica. Se depositó la mezcla en el molde matriz de silicio y se colocó en un horno durante 24 horas. Los moldes de PDMS estaban dotados de bordes externos verticales, de forma que se contuviese en el interior del molde el volumen de la disolución que había de ser depositada. Con esta técnica, se fabricaron andamios de PLGA/gel, de PHBHV/gel y de PDS, de los cuales se demostró la capacidad cardiorregenerativa. Los andamios se caracterizaron por una superficie dotada de cavidades rectangulares y un grosor total en el intervalo de 40-250 μm. La profundidad *d* de los agujeros se encontraba en el intervalo de 20-200 μm. Las cavidades tenían una dimensión longitudinal *L* en el intervalo de 350-600 μm y una dimensión transversal *W*₁ en el intervalo de 30-150 μm. Había dos proyecciones lineales longitudinales ancha y estrecha que tenían, respectivamente, una dimensión transversal *W*₂ en el intervalo de 50-160 μm y una dimensión transversal *W*₃ en el intervalo de 20-120 μm. La siguiente tabla muestra las dimensiones expresadas en micrómetros (μm) medidas con referencia a tres realizaciones específicas del andamio polimérico de la invención obtenido mediante el procedimiento descrito anteriormente.

	Cavidad		Proyecciones lineales		Grosor total	
	<i>L</i>	<i>W</i> ₁	<i>d</i>	<i>W</i> ₂	<i>W</i> ₃	
PHBHV/gel tipo 1	400	30	20	160	120	70
PHBHV/gel tipo 2	485	85	40	60	25	100
PLGA/gel	350	60	15-20	60	30	40

25 Las células madre que fueron sembradas en los andamios de una única capa producidos según se ha descrito anteriormente (véanse los ensayos biológicos descritos a continuación) facilitaron la demostración de que la combinación de la composición química particular y la geometría particular de los andamios poliméricos de la invención favorece la colonización y la diferenciación hacia el linaje cardíaco. De hecho, ni el material por sí solo ni las microestructuras por sí solas (según han investigado los inventores para microestructuras similares basadas en otros materiales poliméricos) pueden producir un efecto cardioinductivo similar.

30 De relevancia particular fueron los resultados de caracterización mecánica. Después de haber calculado la sección geométrica real, se midieron los valores de los módulos de elasticidad de los andamios poliméricos tanto en la dirección longitudinal como en la transversal, dada la naturaleza anisotrópica de la estructura microfabricada. En particular, el valor del módulo de elasticidad medido en la dirección longitudinal era significativamente mayor que el valor medido en la dirección transversal, de acuerdo con la anisotropía de la estructura biomaterial diseñada para duplicar las características del tejido cardíaco. Además, los valores de módulo de elasticidad registrados en un entorno acuoso fueron menores que los valores registrados en los ensayos en seco, y más cercanos, en términos de valor absoluto, al valor correspondiente del miocardio nativo.

35 También se llevó a cabo un estudio de biodegradación de los andamios poliméricos durante un tiempo total de 6 meses. Se consideraron tres medios diferenciados de degradación, en concreto agua bidestilada, PBS (solución salina tamponada con fosfato) y un medio de cultivo (DMEM), que permite la mejor simulación de las condiciones *in vitro* e *in vivo*. En cuanto al sistema de 95/5 de PHBHV/gelatina, el análisis del pH del medio de incubación reveló valores casi constantes de pH, en un intervalo fisiológico, durante todo el periodo. Este resultado sugiere dos interpretaciones importantes: a) el andamio de PHBHV/gelatina es estable y no produce grandes cantidades de productos de degradación; por lo tanto, la estabilidad de la estructura se refleja en la estabilidad del pH, b) la cantidad de los productos de degradación, aunque baja, pero detectable por los ensayos de pérdida de peso, no altera las condiciones de pH. Este resultado indica que el andamio de PHBHV/gelatina no induce un proceso inflamatorio inducido por acidosis *in vivo*.

50 En cuanto al sistema de 70/30 de PLGA/gelatina, el análisis del pH del medio de incubación reveló valores estables de pH cuando fue medido en las disoluciones tampón, PBS y DMEM, mientras que se confirmó una reducción en el pH tras solo 15 días en agua. Este resultado es debido a la tasa de degradación más rápida del sistema a base de PLGA, como confirman los ensayos gravimétricos. Sin embargo, se observó una mayor estabilidad del pH para el sistema de PLGA/gelatina en un medio de cultivo, una condición más cercana a la fisiológica, en comparación con los otros dos medios, con porcentajes reducidos de pérdida de peso y valores de pH nunca inferiores a 6, incluso tras una degradación completa.

Desde un punto de vista morfológico, los resultados del estudio de degradación destacan que los andamios de la invención retenían las características geométricas de la superficie, sin cambios significativos en diversos momentos del proceso de biodegradación, para garantizar la estabilidad de los materiales para impulsar los procesos regenerativos durante un periodo prolongado. El aspecto que distingue los tres tipos distintos de andamios sometidos a ensayos es la tasa de biodegradación, por lo que la elección de qué biomatriz debería ser utilizada estará relacionada principalmente con los procedimientos quirúrgicos y los momentos de la implantación, y especialmente con la velocidad de recrecimiento del tejido natural en el área afectada.

Ejemplo 8: producción de andamios con reservorio de fármacos

A modo de ejemplo, el procedimiento más apropiado para producir andamios de PLGA/gelatina de múltiples capas consiste en la deposición de capas intermedias de disoluciones acuosas de gelatina a concentraciones de 2-10% p/v. En detalle, se intercala una disolución de gelatina entre dos capas microfabricadas producidas según se ha descrito anteriormente y se mantienen todas unidas mediante troquelado en los bordes. Para llevar a cabo el troquelado, se dispusieron moldes metálicos con una forma cuadrada o rectangular de estructura con dimensiones de perfil escogidas según el tamaño de la biomatriz. Se calentaron los moldes hasta una temperatura predeterminada (aproximadamente 50°C para el PLGA, y 90°C para el PHBHV) y se colocaron en los bordes de las múltiples capas. El procedimiento de troquelado permite el mantenimiento de la adhesión entre las capas incluso después del contacto con el entorno fisiológico y la consiguiente liberación de gelatina. El dispositivo de múltiples capas ofrece una serie de ventajas: mayor resistencia a las suturas, mayor sección y propiedades mecánicas mejoradas, y la posibilidad de incorporar química o físicamente moléculas bioactivas (por ejemplo, adenosina) para obtener un sistema de liberación rápida y eficaz.

Los andamios de múltiples capas fueron funcionalizados con adenosina como agente cardioprotector. Se identificaron tres estrategias de funcionalización distintas con el fármaco cardioprotector para ser llevadas a cabo por separado o combinadas entre sí, en concreto: carga directa en las capas de soporte, carga directa en la capa intermedia a base de gelatina, carga en las capas de soporte y/o intermedias tras una encapsulación anterior en nanopartículas de núcleo-envoltura. La funcionalización de los andamios poliméricos objeto de la invención con el agente cardioprotector fue llevada a cabo para conseguir dos objetivos fundamentales, en concreto cargar la máxima cantidad de adenosina u otro agente cardioprotector en la biomatriz en una forma solubilizada, y garantizar una liberación inmediata y sustancial en un periodo muy breve de tiempo (desde los minutos inicial hasta 24 horas). La encapsulación en nanopartículas permite obtener una protección adicional contra daños por la reperfusión, dado que tiene como resultado una liberación de baja magnitud del ingrediente farmacéutico activo, que se prolonga en el tiempo.

También se llevaron a cabo evaluaciones preliminares de la solubilidad de la adenosina en disoluciones acuosas que contienen gelatina aumentando la temperatura de las disoluciones. Se estimó que el límite de la solubilidad era igual a 10 mg/ml, ligeramente por encima del límite documentado en la bibliografía de adenosina en agua, que se corresponde con 8 mg/ml.

A modo de ejemplo, a continuación se describe el procedimiento de preparación de un andamio de múltiples capas que consiste en dos capas de soporte a base de 70/30 de PLGA/gelatina, y una capa intermedia obtenida de una disolución acuosa de 10% p/p de gelatina. Se cargó el andamio de múltiples capas con adenosina tanto en las capas de soporte como en la capa intermedia. La cantidad total de adenosina cargada en el andamio es de 17,6 mg para un dispositivo que tiene un área superficial de 10 cm² y un grosor total de 600±50 micrómetros.

Producción de andamios con reservorio de fármacos de PLGA/gelatina/adenosina de una única capa

Para la preparación de un andamio de una única capa de PLGA/gelatina funcionalizada con adenosina, se utilizó el procedimiento descrito anteriormente con las siguientes modificaciones. Se disolvió la adenosina en agua bidestilada hasta una concentración de 10 mg/ml a una temperatura de 50°C. Se añadieron cantidades predefinidas de gelatina a la disolución de adenosina, y luego se añadió la mezcla acuosa de gelatina/adenosina a la disolución de PLGA en diclorometano y acetona o acetonitrilo. Por ejemplo, se añadió 1 g de gelatina a 10 ml de disolución de adenosina (10 mg/ml) y se añadieron partes alícuotas de esta disolución a una disolución de PLGA en diclorometano y acetona o acetonitrilo. La deposición de la mezcla bioartificial se llevó a cabo como sigue: a) se depositó 1 ml de la disolución de PLGA/gelatina/adenosina sobre un sustrato microfabricado de PDMS (con un área superficial de 10 cm²); tras 10 minutos a temperatura ambiente, se repitió una segunda deposición con 1 ml de disolución; b) un secado lento y controlado; c) la separación de la única capa del sustrato.

También se utilizaron los andamios de PLGA/gelatina/adenosina de una única capa para preparar andamios de múltiples capas cargados con adenosina, según se describe a continuación en el ejemplo 10.

Producción de andamios con reservorio de fármacos de PLGA/gelatina/adenosina de múltiples capas

Según se ha descrito anteriormente, se añadió 1 g de gelatina a 10 ml de una disolución de adenosina con una concentración de 10 mg/ml. Se depositó la disolución de gelatina/adenosina sobre una única capa en el lado libre de cavidades y de proyecciones. Inicialmente, se distribuyó de forma homogénea un volumen de 500 µl de disolución

de gelatina/adenosina sobre toda la superficie, y luego se depositó y distribuyó una segunda parte alícuota de 500 μ l sobre la misma superficie. Se montó una segunda membrana microfabricada dejando libre el lado con la superficie en perfil. Finalmente, se adhirieron las dos capas mediante un troquelado suave llevado a cabo, como se ha descrito anteriormente, a 50°C. Se secaron y almacenaron los sistemas de reservorio de fármacos en un congelador antes de una caracterización biológica *in vitro* e *in vivo*.

5 De una forma similar a lo descrito para los andamios de PLGA/gelatina, se prepararon andamios con reservorio de fármacos de múltiples capas utilizando PHBV, PDS y gelatina u otros polímeros biológicos. El procedimiento de montaje de las capas individuales contemplaba mayores temperaturas de troquelado, de hasta 80-90°C, dada la mayor resistencia al calor de estos materiales.

10 Esterilización del andamio final cargado con adenosina

La esterilización se llevó a cabo introduciendo el andamio en una placa que contenía una disolución acuosa de etanol al 70% durante 15 minutos, seguido de cinco lavados reiterados con una disolución nueva. Subsiguientemente, se retiró la disolución, y se secó el andamio completamente bajo una campana estéril de flujo laminar. La etapa final consistió en la irradiación de las muestras con rayos UV durante 15 minutos por ambos lados.

15 Ensayo de liberación, caracterización morfológica y físico-química de los andamios finales

También se llevaron a cabo tras la esterilización ensayos de liberación en los andamios con reservorio de fármacos de 70/30 de PLGA/gelatina de múltiples capas funcionalizados con adenosina, y después de haber verificado la posible pérdida del fármaco en la disolución de etanol. Los resultados del análisis de HPLC documentaron una liberación parcial de adenosina en la disolución de etanol utilizada para la esterilización, sin embargo, la mayoría de la adenosina cargada permaneció en la biomatriz (valores superiores al 70%). Se colocaron los andamios esterilizados finales en tubos que contenían agua bidestilada a 37°C con agitación constante, y durante intervalos predeterminados (1, 2, 10, 30, 60 minutos y 24 horas). Se recogió y analizó el sobrenadante mediante un análisis de HPLC. Fue evidente una liberación apreciable para todos los lapsos analizados, desde 1 minuto hasta 1 hora. La cantidad de adenosina registrada tras 24 horas de liberación se corresponde con el 43% en comparación con la cantidad introducida inicialmente, un porcentaje elevado según los objetivos iniciales y en línea con las dosis de adenosina administradas intraluminalmente.

Se llevaron a cabo observaciones mediante microscopía electrónica con barrido (SEM) de los andamios finales con reservorio de fármacos de múltiples capas funcionalizados con adenosina. Tras 24 horas en agua bidestilada, se observó la presencia de vacíos que no estaban presentes inicialmente, originados por la disolución de la adenosina y la gelatina en el ámbito de las capas individuales de soporte y las capas intermedias, mientras que se preservaron los elementos geométricos de la superficie de los andamios (cavidades y proyecciones), casi sin cambios. Estas observaciones de SEM indican una liberación completa tanto de la gelatina como de la adenosina tras 24 horas. Los resultados obtenidos confirman la validez del procedimiento adoptado de carga, que muestran que el andamio montado como tal forma una plataforma óptima para una liberación rápida y sostenida de un agente cardioprotector.

35 Una vez se ha completado la función de liberación para reducir las lesiones por reperfusión, el andamio puede continuar llevando a cabo, entonces, la otra función de inducir los procesos regenerativos del tejido cardíaco.

También se confirmó la liberación completa de adenosina por medio de un análisis químico de formación de imágenes de FT-IR.

40 También se sometieron a ensayo los andamios por su capacidad de ser suturados y agarre al dispositivo de administración de cara al implante *in vivo*. Se completaron con éxito los ensayos.

Ejemplo 9: funcionalización de las nanopartículas con SDF-1 α y adenosina

Según se ha indicado anteriormente, también se funcionalizaron los andamios con reservorio de fármacos de múltiples capas de la presente invención con un agente cardioprotector encapsulado en nanopartículas de núcleo-envoltura, con el objeto de obtener una liberación sostenida del fármaco.

45 Producción de nanopartículas de P(BMA-co-(PEG)MEMA) para la liberación de adenosina y SDF-1 α

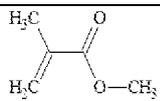
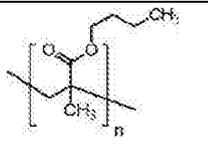
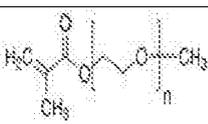
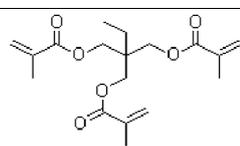
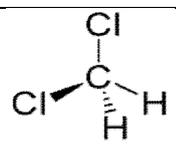
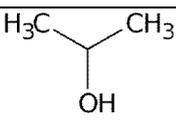
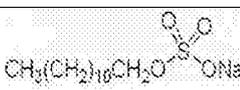
Se produjeron nanopartículas con una reserva interna de P(BMA-co-(PEG)MEMA) para la carga de ingredientes activos que habían de incorporarse en los andamios de la invención. Estos son nanosistemas con capacidad para combinar las características dimensionales nanométricas con la estructura de la reserva interna, es decir, dotados de una cavidad interna que permite la maximización de la eficacia de encapsulación. Se utilizaron tales nanopartículas para la incorporación tanto de adenosina como del factor SDF-1 α .

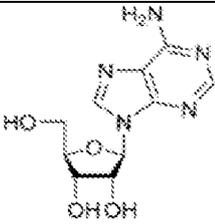
La preparación de nanopartículas poliméricas de núcleo-envoltura contempla el uso de un núcleo polimérico "sacrificatorio", que consiste en nanopartículas sintéticas, que se utilizan subsiguientemente como plantilla para la síntesis de una capa superficial reticulada que forma la envoltura. Subsiguientemente, se retiró el núcleo utilizando

disolventes adecuados, obteniendo, de esta manera, nanopartículas con una reserva, también denominadas nanocápsulas.

5 Según el presente ejemplo, el núcleo utilizado está fabricado de polimetilmetacrilato (PMMA), mientras que se obtuvo la envoltura externa mediante la copolimerización de metacrilato de butilo (BMA) y metiléter metacrilato de polietilenglicol con un peso molecular medio de 300 g/mol ((PEG)MEMA)300 en presencia de un reticulante, trimetacrilato de trimetilolpropano (TRIM). Se recuperó el producto de reacción, fue ultracentrifugado (a 14000 rpm) y sometido a la eliminación del núcleo. Entonces, se cargaron las nanocápsulas obtenidas mediante adsorción con adenosina o SDF-1 α .

10 La siguiente tabla documenta los materiales utilizados para la síntesis de las nanocápsulas de P(BMA-co-(PEG)MEMA) especificando la razón de su uso.

Nombre	Fórmula química	Características	Uso
MONÓMEROS:			
Metilmetacrilato (MMA)		Sigma Aldrich®, densidad 0,936 g/ml (25°C)	Monómero para la síntesis del núcleo
Metacrilato de butilo (BMA)		Sigma Aldrich®, peso molecular 142,20 g/mol, densidad 0,894 g/ml (25°C).	Comonómeros para la síntesis de la envoltura
Metiléter metacrilato de polietilenglicol ((PEG)MEMA)		Sigma Aldrich®, peso molecular medio 300 g/mol y una densidad de 1,05 g/ml (25°C)	
Trimetacrilato de trimetilolpropano (TRIM)		Sigma Aldrich®, peso molecular 338,40 g/mol, densidad 1,060 g/cm ³ (25°C)	Agente reticulante
PAR REDOX:			
Persulfato de amonio	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Carlo Erba®, pureza 98%	Iniciadores, par redox
Metabisulfito de sodio	Na ₂ O ₅ S ₂	Carlo Erba®, pureza 97%	
DISOLVENTES:			
Diclorometano		Carlo Erba®, pureza 99,5%	Utilizado como disolvente para el núcleo sacrificial (extracción).
2-propanol		Sigma Aldrich®, pureza 99%	Utilizado para la purificación de las nanocápsulas, eliminando una posible fracción de homopolímero de PBMA presente en el producto de reacción.
OTROS MATERIALES:			
Dodecilsulfato sódico (SDS)		Sigma Aldrich®	Tensioactivo utilizado para la polimerización de la emulsión.

Nombre	Fórmula química	Características	Uso
Tampón fosfato (PBS)		Sigma Aldrich®	Utilizado para evaluar la liberación del fármaco y la cinética de absorción.
Adenosina		Sigma Aldrich®, peso molecular 267,24 g/mol, pureza 99%	Molécula de señalización
SDF-1α		Santa Cruz Biotechnology, Inc., peso molecular 35 kDa, 68 aminoácidos de origen humano.	Molécula de señalización

A continuación, se describen las tres etapas de preparación de las nanopartículas de la reserva:

- síntesis del núcleo (polímero: PMMA)
- síntesis de la envoltura (polímero: P(BMA-co-(PEG)MEMA))
- extracción del núcleo

5

Síntesis del núcleo (PMMA)

Las partículas que habían de ser utilizadas como el núcleo fueron sintetizadas directamente en forma de nanopartículas utilizando MMA como el monómero de partida. El medio de reacción estaba compuesto de una mezcla 60/40 (v/v) de agua y etanol, que contenía dodecilsulfato sódico como tensioactivo. Para el iniciador de la reacción de radicales, se utilizó un par redox a base de metabisulfito de sodio y persulfato de amonio.

10

El aparato de reacción consiste en un matraz de tres cuellos con una capacidad de 1000 ml sumergido en un baño de aceite mantenido a una temperatura de 37°C durante toda la duración de la reacción (3 h) mediante un termopar; la reacción se llevó a cabo con agitación constante mediante el uso de un agitador de palas (Heidolf RZR 2020 de 50W), regulado a 1600 rpm.

15

La siguiente tabla documenta los componentes utilizados para llevar a cabo la síntesis del núcleo de PMMA:

Reactivos	Cantidad
MMA	0,25 mol
SDS	2 g
Persulfato de amonio	0,003 mol
Metabisulfito de sodio	0,003 mol
H ₂ O	350 ml
Etanol	150 ml

Se llevó a cabo la síntesis añadiendo agua y SDS en el matraz de 250 ml. Una vez se obtuvo una emulsión homogénea, se añadieron 150 ml de etanol y el monómero de MMA. Se había solubilizado anteriormente el par redox en 100 ml de H₂O a 37°C; entonces se añadió la disolución a la fase de reacción; esta fue desgasificada con nitrógeno seco durante unos minutos, para eliminar cualquier oxígeno que pudiera inhibir el inicio de la reacción. La síntesis se llevó a cabo centrifugando a una velocidad de 1600 rpm a 37°C durante 2 horas. Al final, se colocó el producto de reacción en un horno ventilado a 37°C para eliminar el agua y el etanol. Las nanopartículas obtenidas fueron sometidas a un lavado con agua bidestilada a una temperatura de 80°C para eliminar residuos de monómero no reaccionados y el tensioactivo, y luego secadas de nuevo. Finalmente, se trituró el material particulado con un mortero para eliminar cualquier agregado y fue analizado utilizando un microscopio electrónico de exploración.

20

25

Síntesis de la envoltura (P(BMA-co-(PEG)MEMA))

5 Se llevó a cabo la copolimerización de dos monómeros (PEG)MEMA y BMA en una relación molar de 20/80. Se añadió el reticulante TRIM a la mezcla de reacción, en cantidades iguales a 20% con respecto a los moles del monómero, para conservar la estructura copolimérica formada en torno al núcleo incluso tras su extracción. Se utilizaron las mismas condiciones de temperatura y de velocidad de centrifugación que las descritas para la síntesis del núcleo, al igual que el mismo aparato de reacción. En la siguiente tabla se muestra la composición de la mezcla de reacción.

BMA	0,1 mol
(PEG)MEMA	0,025 mol
TRIM	0,025 mol
SDS	2 g
Persulfato de amonio	0,0012 mol
Metabisulfito de sodio	0,0012 mol
Agua bidestilada	350 ml
Etanol	150 ml

10 Inicialmente, se introdujeron 250 ml de agua y SDS en el reactor, seguido por la adición de etanol y 5 g de partículas secas y trituradas de PMMA, previamente purificadas.

Entonces, se añadieron los monómeros y el par redox, disueltos anteriormente en 100 ml de agua a 37°C. Finalmente, se degasificó la mezcla de reacción con nitrógeno durante 10 minutos y se mantuvo durante dos horas a temperatura ambiente (37°C) y con agitación constante (600 rpm). Al final de la reacción, se recuperó y colocó el producto obtenido en un horno ventilado a 37°C para eliminar los disolventes, el agua y el etanol.

15 Extracción del núcleo

La tercera etapa consistió en la eliminación del núcleo de PMMA para obtener una partícula “hueca” formada únicamente del copolímero reticulado P(BMA-co(PEG)MEMA).

20 Se seleccionó diclorometano como disolvente de extracción debido a que es capaz de disolver el PMMA sin disolver el copolímero de la envoltura. Se sumergieron las nanopartículas en un volumen de 20 ml de disolvente y fueron agitadas a temperatura ambiente durante 15 minutos. La eliminación de la disolución de diclorometano-PMMA se llevó a cabo mediante filtración, tras lo cual se colocaron las nanopartículas recuperadas en un segundo disolvente, 2-propanol, durante 15 minutos para eliminar cualquier homopolímero residual de PBMA. Después de la filtración, se colocaron las partículas en un horno ventilado a 37°C para eliminar el disolvente residual, y una vez secadas, fueron sometidas a un lavado en agua bidestilada a 80°C, y finalmente secadas de nuevo en un horno ventilado. Al final del procedimiento, la producción de partículas extraídas con respecto a las partículas no extraídas utilizadas inicialmente se corresponde con aproximadamente un 44%.

Procedimiento de carga de adenosina en las nanopartículas

30 Antes de la carga, se preacondicionaron las nanopartículas en PBS durante 18 horas, colocando los materiales en contacto con una disolución de PBS a temperatura ambiente. Para la carga de adenosina, se prepararon tres disoluciones de adenosina en PBS con distinta concentración: 2 mg/ml (disolución A), 1 mg/ml (disolución B), 0,5 mg/ml (disolución C). Se prepararon al menos tres muestras de nanopartículas para cada disolución de carga. El procedimiento de adsorción de adenosina en las nanopartículas se llevó a cabo a temperatura ambiente durante un tiempo total de 4 horas. A intervalos de una hora, 0,5 ml de cada disolución en contacto con las partículas fue tomada y analizada, tras cada recogida, rellenando 0,5 ml de las disoluciones respectivas de adenosina. Tras cada recogida, las muestras fueron agitadas enérgicamente utilizando un mezclador vorticial durante 15 minutos, tras lo cual, fueron centrifugadas durante 15 minutos a 14000 rpm. Al final del procedimiento de carga, se separaron las muestras poliméricas de la disolución residual de adsorción mediante centrifugado durante 30 minutos a 14000 rpm y eliminando el sobrenadante restante. Finalmente, se colocaron las muestras cargadas como tales en un horno ventilado a 37°C durante 12 horas.

40

Procedimiento de carga de SDF-1 α

Al final del procedimiento de acondicionamiento, llevado a cabo según se ha descrito anteriormente, se pusieron en contacto las partículas con 1 ml de disolución de SDF-1 α en PBS a una concentración de 1 μ g/ml. A intervalos regulares de tiempo durante un periodo total de dos horas, se tomaron partes alícuotas de 100 μ l del medio absorbente, en cada recogida, se rellenó el medio con 100 μ l de disolución nueva que contenía el ingrediente activo. Las muestras fueron agitadas enérgicamente utilizando un mezclador vorticial durante 15 minutos, seguido de centrifugación durante 15 minutos a 14000 rpm. Al final de la centrifugación, se sometieron a las muestras a un análisis cuantitativo mediante HPLC para evaluar la cinética de absorción del factor estromal. Al final del procedimiento de carga, se separaron las muestras poliméricas de la disolución residual de absorción mediante centrifugación durante 30 minutos a 14000 rpm y se eliminó el sobrenadante restante. Finalmente, se colocaron las muestras nanoparticuladas que contenían SDF-1 α en un horno ventilado a 37°C durante 12 horas.

Ensayos biológicos

El estudio de las interacciones que se producen entre el andamio y el componente celular representa un campo de gran interés científico y tecnológico. Los ensayos llevados a cabo *in vitro* utilizando un cultivo celular permiten que se obtenga información, relacionada con la compatibilidad biológica de los materiales estudiados, haciendo que estos ensayos sean indispensables, tanto en la comprensión de los mecanismos de interacciones célula-material, como en la mejora de la respuesta biológica obtenida, antes de pasar a los ensayos *in vivo*.

Las técnicas *in vitro*, sumamente sensibles y específicas, permiten la evaluación de parámetros tales como, por ejemplo, la morfología superficial, la porosidad, la composición química de los materiales en cuestión y la evaluación directa de cómo afectan estos materiales a los aspectos clave de la actividad celular: adhesión, proliferación, actividad metabólica, vitalidad. Los estudios fueron seguidos por el análisis de rasgos fenotípicos adquiridos de las células madre después del cultivo en las biomatrices, debido a que es fundamental la capacidad de las biomatrices para dirigir a las células hacia el fenotipo cardíaco.

La reperfusión, aunque sea necesaria para reducir el daño causado por la ausencia de oxígeno y de nutrientes, provoca daños adicionales en su área perimetral afectada por necrosis, daños que, sin embargo, pueden limitarse. Por esta razón, se decidió funcionalizar los andamios con un factor cardioprotector, para actuar en los primerísimos momentos posteriores a un infarto, limitando los daños por reperfusión tanto como sea posible, centrándose luego en la protección del tejido aún sano.

Ejemplo 10: evaluación de biocompatibilidad

Células consideradas relevantes para la siembra en los andamios de MSC: células madre mesenquimatosas

Las células madre mesenquimatosas (MSC) adultas son una población de células multipotentes que residen principalmente en la médula ósea, aunque también se pueden aislar estas células a partir de tejidos tales como la placenta, el cordón umbilical, los pulmones, el hígado, el músculo esquelético, la grasa y la pulpa dental. Las MSC se caracterizan por poder diferenciarse fácilmente, *in vitro*, entre hueso, cartílago y tejido adiposo. Recientemente, se ha observado un papel paracrino importante en el ámbito del miocardio, que sugiere una transdiferenciación posible en el sentido de los cardiomiocitos, haciendo que estas células sean sumamente interesantes en el campo de la regeneración cardíaca. Estos efectos paracrinos incluyen la secreción de factores que pueden atenuar la apoptosis de cardiomiocitos endógenos y células endoteliales, pueden promover la angiogénesis, y pueden activar células madre cardíacas residentes.

Finalmente, un mecanismo adicional por el que las células madre de la médula ósea pueden contribuir a una reparación miocárdica es mediante el mantenimiento del acervo de células madre específicamente cardíacas tras una lesión. Las células madre de la médula ósea que se localizan en el miocardio tras una lesión experimentan cambios fenotípicos para adaptarse al fenotipo celular cardíaco residente. Estas células podrían contribuir a una capacidad a largo plazo de reparación endógena del corazón.

CSC: células madre cardíacas residentes

En los últimos años, ha aflorado evidencia que demuestra una cierta capacidad regenerativa del tejido miocárdico. Estudios recientes han demostrado que el corazón tiene una reserva de células pequeñas que expresan marcadores de célula madre (c-kit⁺, OCT 3/4 CD90) y están equipadas actividad de telomerasa, típica de células con capacidad de duplicación. Las células madre cardíacas residentes (CSC) son dirigidas hacia un sistema de diferenciación que da lugar a la formación de cardioblastos y subsiguientemente a cardiomiocitos. Las células madre cardíacas se caracterizan por una baja tasa de duplicación, dan lugar a progenitores “restringidos al linaje” muy proliferantes que se convierten en precursores “dedicados” hacia una diferenciación cardíaca, y finalmente alcanzan una detención en el crecimiento y una diferenciación terminal. La identificación de estas células explica la observación de eventos mitóticos intercalados en el miocardio adulto, cuya frecuencia aumenta muchísimo en respuesta al esfuerzo (por ejemplo, deficiencia cardíaca, sobrecarga de presión). Al estudiar estas poblaciones, se desea que se pueda

materializar la perspectiva de una terapia celular autóloga, llevada a cabo con células madre cardíacas, con todos los posibles beneficios que puede proporcionar este planteamiento terapéutico.

Procedimientos

Siembra celular en las biomatrices

- 5 La siembra se lleva a cabo en biomatrices colocadas en pocillos separados de una placa de 24 pocillos. Para mejorar la capacidad de adhesión es necesario sembrar las células en una gota de aproximadamente 50 μl de medio de cultivo; esto significa que las células se adhieren a la matriz, en vez de a la parte inferior del pocillo a la que se adherirían si la gota no estuviese localizada únicamente en la superficie de la matriz. La capacidad de la matriz de retener la caída influye, por lo tanto, en la capacidad de adhesión de las células a la propia matriz.
- 10 Subsiguientemente, se colocó la placa que contenía las matrices, con movimientos suaves de forma que no se moviera la gota del sustrato, en una incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y una atmósfera saturada con vapor de agua, para permitir la adhesión celular. Tras aproximadamente 3 horas (tiempo de adhesión), se añadieron 450 μl adicionales de caldo de cultivo completo para cada biomatriz para cubrirla; de nuevo se colocó la placa en la incubadora.
- 15 La concentración de células que han de ser sembradas, para la adhesión celular, siempre se calcula como el número de células por cm² y, por lo tanto, tiene en cuenta el tamaño de las áreas utilizadas para la siembra que, en el caso de los sustratos utilizados por los inventores, es de 1 cm². Para evaluar la concentración óptima de células, se llevó a cabo la siembra con concentraciones crecientes de células, desde 5000 hasta 30000 para cada matriz. En función de los resultados obtenidos de esta forma, fue posible evaluar mejor la concentración de células que habían de ser sembradas según los distintos objetivos de cada experimento.
- 20

Adhesión, proliferación y viabilidad de las células en las biomatrices

- La presencia de un entorno extracelular particular contribuye a determinar si la célula se divide, y cuándo lo hace. Los estímulos inadecuados procedentes del entorno externo también pueden dar lugar a la muerte celular. Esta puede producirse por necrosis o apoptosis. El control de la proliferación celular y de su supervivencia sobre biomateriales es crucial para la regeneración de los tejidos. Para evaluar la proliferación en biomatrices, es necesario un primer paso de células, es decir, la evaluación de la capacidad de adhesión de las células, y esto se lleva a cabo de una forma estándar tras 24 horas desde la siembra. Para conseguir una regeneración eficaz es fundamental que las células se adhieran a la matriz: varios experimentos parecen confirmar que las células se adhieren mejor a los sustratos microestructurados en comparación con superficies lisas. De hecho, los sustratos microestructurados logran atrapar las células que han penetrado en su interior, que presentan un mayor número de adhesiones focales.
- 25
- 30

Ensayos indirectos de reactivo CellTiter-Blue™

- Este ensayo utiliza un indicador fluorimétrico/colorimétrico de crecimiento para detectar una actividad metabólica celular. Consiste en una disolución tamponada que contiene una molécula sumamente purificada, resazurina, que tiene color azul oscuro y tiene poca fluorescencia intrínseca. Las células metabólicamente activas poseen enzimas que pueden reducir la resazurina a otra molécula, resorufina, que es rosa y muy fluorescente, con una excitación máxima de 579 nm y una emisión máxima de 584 nm. Se libera la resorufina en el medio de cultivo y, gracias a su fluorescencia, puede ser detectada con el uso de un lector de microplacas. La medición de la fluorescencia es sencilla de obtener debido al hecho de que la molécula utilizada es capaz de salir espontáneamente de las células, sin dañarlas, y luego puede repetirse en las mismas muestras en distintos días desde la siembra.
- 35
- 40

- La cuantificación del número de células se basa en la extrapolación de los datos de una curva de calibración. Además, las células siguen siendo viables y, por lo tanto, se puede repetir el tratamiento varias veces en la misma biomatriz en distintos momentos, permitiendo, de esta manera, que se obtenga información a largo plazo. Precisamente esta importante ventaja, añadida a la relativa facilidad de realizar el ensayo, significó que se escogió este ensayo para los experimentos de adhesión y de proliferación por parte de los inventores.
- 45

- Para obtener datos relativos a la adhesión de las células a la matriz es necesario sembrar las células en paralelo tanto en las matrices que han de ser sometidas a ensayo (3D) como directamente en las placas de 24 pocillos (en 2D). Las células en 2D están sembradas con concentraciones conocidas y crecientes, esto permite la creación de una curva de calibración: cada número conocido de células sembradas (x) tendrá un valor relativo de fluorescencia (y). Introduciendo los valores obtenidos de las muestras para la calibración en un gráfico, se puede obtener una curva a partir de la cual se crea una línea de regresión lineal, que permite la extrapolación del número de células (x) efectivamente adherentes a la matriz de la que se conoce el valor de fluorescencia (y). Cada línea celular tendrá su propia curva de referencia debido a que cada tipo de célula tiene su propia actividad metabólica intrínseca.
- 50

- El ensayo para evaluar la adhesión celular se lleva a cabo el día después de la siembra (tras 24 horas) para permitir que las células se adhieran de forma apropiada al sustrato. El tiempo de incubación está definido por el cambio de
- 55

color del medio durante la incubación con el CellTiter Blue. Cuando se considera que el tiempo de incubación es suficiente para una buena sensibilidad, entonces se puede llevar a cabo una lectura con un lector de microplacas.

5 Para evaluar la proliferación es necesario utilizar el mismo tiempo de incubación con el CellTiter-Blue para todos los experimentos llevados a cabo sobre la misma muestra, de esta forma el aumento de fluorescencia detectado será únicamente debido a un aumento en el número de células. Por lo tanto, es posible tener datos indirectos sobre el número de células presentes extrapolando el número de células de la muestra, con respecto a la curva de calibración, sembradas y leídas tras 24 horas.

10 Por lo tanto, es posible normalizar todos los valores subsiguientes de fluorescencia con respecto al primer valor, que se obtuvo a las 24 horas: esto proporciona, por lo tanto, un valor indicativo del aumento en la fluorescencia y, por lo tanto, del aumento en el número de células. El primer valor de fluorescencia está puesto igual al valor 1, si hay un aumento en el número de células; los valores serán mayores, si, en cambio hay una reducción en el número de células, los valores estarán entre 0 y 1. Expresando estos valores en un gráfico, se obtiene un histograma que permite una comparación, de una forma muy intuitiva, de la proliferación que ha tenido lugar en distintas biomatrices, sin embargo este dato es independiente de la cantidad de células que se habían adherido inicialmente.

15 Ensayos con Calceína-AM

La Calceína-AM es una tinción vital para obtener información acerca de la salud de las células, extendida en el tiempo. De esta forma, se puede evaluar la viabilidad de las células, que presentan una coloración verde intenso cuando son viables, y al mismo tiempo se pueden obtener datos semicuantitativos acerca de la actividad metabólica, dado que se corta la molécula mediante esterasas citoplasmáticas presentes cuando el metabolismo está activo. 20 Además, la calceína tinte todo el citoplasma, destacando la morfología celular y permitiendo la observación de las células sobre los soportes en distintos días después de la siembra.

Resultados

25 Los datos experimentales obtenidos por los presentes inventores permiten la observación de cómo se facilita la adhesión celular si el sustrato presenta una microestructuración: la geometría de la microestructuración también puede facilitar la disposición ordenada de las células.

El porcentaje de adhesión celular sobre las matrices a base de PHBV, PLGA, PDS y polímeros biológicos que tienen una microestructuración, varía entre 40 y 70%, mientras que el ensayo llevado a cabo sobre las mismas matrices no microestructuradas ha revelado un porcentaje de adhesión únicamente detectable en algunos casos.

30 También se demostró que la adhesión sobre matrices se ve favorecida en presencia de un componente natural: los datos obtenidos revelan que el soporte de PDS sin un componente natural es capaz de adherir un menor número de células, cuando se compara con los soportes en los que hay presente un componente natural.

La proliferación es favorecida en presencia de la microestructuración; los datos destacan una mayor proliferación en matrices microestructuradas objeto de la invención, en comparación con las mismas matrices no microestructuradas.

35 Se ha demostrado que los sistemas 3D, a base de materiales poliméricos bioartificiales, objeto de la presente invención, son excelentes soportes para la adhesión y la proliferación de las células, en particular las que tienen una estructura geométrica diseñada específicamente para imitar la matriz extracelular de la pared cardíaca. Es interesante hacer notar que la presencia del componente natural puede influir positivamente en la capacidad de adhesión celular.

Ejemplo 11: evaluación de la cardioinductividad

40 El entorno en el que se cultivan las células madre es muy importante debido a que es capaz de influir en el fenotipo celular, es decir, el conjunto de características manifestadas por las células, definidas por marcadores específicos característicos de cada tipo de célula. En particular, se observó que, para la orientación inicial hacia un fenotipo diferenciado determinado, es fundamental el tipo de soporte al que se adhieren las células madre y sobre el que crecen, tanto por sus características físico-químicas como por su geometría.

45 Los experimentos de crecimiento de células llevados a cabo por los inventores en biomatrices han destacado una reducción en la proliferación celular entre el día 11 y el día 15 después de la siembra. Por lo tanto, se plantea la hipótesis de una iniciación posible de la diferenciación, que ha llevado a los inventores a investigar específicamente los posibles cambios en el fenotipo celular.

50 Después de evaluar con cuidado la célula madre y los marcadores más importantes de diferenciación, se seleccionó el c-kit como un marcador de estaminalidad y GATA 4 como un marcador de diferenciación temprana hacia los cardiomiocitos. Las técnicas escogidas para estudiar los marcadores fueron gPCR e inmunofluorescencia: la primera es una técnica muy sensible que es capaz de detectar incluso cambios muy pequeños en la expresión génica entre células 2D y sembradas en una matriz. Para confirmar que posibles variaciones en la expresión del transcrito

también se corresponden con cambios en la expresión proteínica, se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia.

5 De los resultados obtenidos del análisis de expresión génica de factores de transcripción, surge que la geometría particular, en asociación con los materiales poliméricos bioartificiales utilizados en la invención, es capaz de dirigir las células madre mesenquimatosas (MSC) hacia una diferenciación inicial temprana en cardiomiocitos, destacada por el aumento significativo del marcador GATA 4, confiriéndoles al mismo tiempo una pérdida de estaminalidad, con una reducción del marcador c-kit.

10 Las células madre cardíacas residentes (CSC) cultivadas en biomatrices, demuestran una actividad significativa de algunos marcadores de diferenciación tardía, genes cuya expresión da lugar a proteínas estructurales y funcionales importantes.

Sin embargo, los marcadores de célula madre tienen una tendencia variable: esto es probablemente una indicación de que las CSC son una población mixta ya dirigida hacia una vía de diferenciación; por lo tanto, ya han perdido algunas de las características de las células madre. El análisis llevado a cabo en los marcadores de diferenciación temprana volvió a destacar los datos variables relativos al factor de transcripción GATA 4.

15 Se obtuvieron resultados más eficaces cuando se estudiaron marcadores de la expresión de genes que codifican proteínas estructurales y funcionales, importantes para la función cardíaca, tal como conexina 43, responsable de las conexiones eléctricas entre las células, troponina C, de importancia fundamental en la fase de excitación-contracción de los músculos esqueléticos y α -SMA, con características funcionales de tipo contráctil. De hecho, las CSC aumentan significativamente la expresión de dos de estos marcadores analizados, enfatizando la capacidad de este tipo de célula madre, si se estimulan de forma apropiada, para aumentar su diferenciación ya parcial. También por esta razón, la expresión de GATA 4, un marcador muy temprano de diferenciación, no alcanza niveles significativos, mientras que el factor de transcripción MEF2C experimenta una clara regulación a la baja, no presente en hMSC cultivada en la matriz, destacando que hay un impulso hacia una diferenciación cardíaca y no simplemente hacia una diferenciación de músculo estriado.

25 Se confirmaron estos datos de expresión génica, tanto para las MSC como para las CSC, en las proteínas correspondientes mediante ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal.

30 Los resultados obtenidos en las biomatrices han demostrado su geometría precisa, que se asemeja la estructura de la pared ventricular, y en asociación con los materiales poliméricos bioartificiales utilizados en la presente invención, pueden inducir a las células madre hacia una diferenciación inicial de cardiomiocitos. El análisis de los marcadores elegidos ha destacado que las MSC, tras 15 días de cultivo, pueden reducir las características de su condición de célula madre y adquieren características fenotípicas cardíacas tempranas. Cuando se mantienen las células madre cardíacas residentes, CSC, en las mismas condiciones que las MSC, pueden expresar marcadores de una etapa aún más avanzada de diferenciación de cardiomiocitos, debido a que son células madre que ya se encuentran en una etapa más avanzada de diferenciación: por lo tanto, el estímulo físico de las matrices las empuja a una etapa adicional hacia delante en el procedimiento de diferenciación.

Ejemplo 12: evaluación de la capacidad cardioprotectora contra una lesión por reperfusión

35 Para proteger el tejido aún sano presente en las etapas tempranas posteriores a un infarto de miocardio, es importante actuar sobre la limitación de los daños provocados por la reperfusión. De hecho, la reapertura de la arteria coronaria provoca daños provocados precisamente por el nuevo suministro sanguíneo que conduce a una inflamación aguda y a un estrés oxidativo. Durante la fase de reperfusión, hay, además de una sobrecarga de calcio celular, una liberación de radicales libres (en primer lugar, el anión superóxido) por el endotelio del vaso coronario y por los granulocitos que están adheridos a las paredes del endotelio coronario. Estos eventos dan lugar a la apertura del poro de transición mitocondrial, lo que tiene como resultado la activación del proceso de muerte celular por apoptosis.

45 La fibra isquémica miocárdica produce adenosina, un factor que determina la vasodilatación coronaria en el caso de peticiones adicionales de oxígeno, por lo tanto también en condiciones de hipoxia. La adenosina tiene tanto un efecto vasodilatador como un efecto protector sobre el miocardio, y tiene como resultado una reducción del metabolismo, y una reducción consiguiente de la demanda de oxígeno. Además, la adenosina aumenta la apertura de los canales de potasio y esto da lugar a una repolarización acelerada con una reducción de la zona llana y, por consiguiente, reduce el tiempo disponible para que el calcio entre en la célula. Esto significa que se evita la sobrecarga de calcio, lo que tiene como resultado una reducción de los daños isquémicos.

50 La acción de la adenosina también es evidente en el ámbito mitocondrial: puede limitar, de hecho, los procesos apoptóticos activados por los cardiomiocitos que padecen. La molécula cardioprotectora es capaz de limitar la apertura del poro de transición mitocondrial, localizado en algunos puntos de contacto entre las dos membranas mitocondriales, evitando la liberación de protones que daría lugar a una alteración del potencial de la membrana, lo que tendría como resultado una entrada de líquidos en las mitocondrias, la rotura de la membrana externa y una liberación de factores apoptóticos (citocromo C y caspasa-9).

5 También hay una activación de la proteína antiapoptótica Bcl 2 que se expresa a través de dos sistemas independientes activados por adenosina: el primero implica la fosforilación de la proteína PKC ϵ que, a su vez, fosforila y activa ERK, mientras que el segundo sistema da lugar a la fosforilación de AKT que, a su vez, fosforila y activa GSK3 β . Entonces, el fosfo-ERK y GSK3 β pueden moverse a las mitocondrias y actuar sobre el Bcl-2 mitocondrial, inhibiendo los procesos apoptóticos activados por las células que padecen tras la reperfusión.

Por estas razones, se decidió funcionalizar las biomatrices con adenosina, para reforzar el efecto protector que el corazón ya activa endógenamente, en un grado reducido. Por lo tanto, la adenosina debe comenzar a ser liberada en los primeros momentos después de la implantación y, de esta forma, se limitarán los daños provocados por el nuevo suministro sanguíneo al área lesionada.

10 Los experimentos llevados a cabo in vitro han demostrado que las biomatrices funcionalizadas con el factor cardioprotector de adenosina pueden proteger las células madre mesenquimatosas sometidas a hipoxia durante 72 horas, seguido de 3 horas de recuperación en normoxia, una situación que imita la condición isquémica seguida por una reperfusión. Esto se confirma tanto por la capacidad de las células de mantener una buena viabilidad, como por el análisis de las proteínas implicadas en el proceso de inhibición del proceso apoptótico.

15 Se llevó a cabo el ensayo CellTiter Blue, que demostró la viabilidad de las células antes del estímulo hipóxico y durante las 3 horas de recuperación: las mediciones de fluorescencia obtenidas durante las 3 horas de recuperación fueron normalizadas según las mediciones obtenidas antes del estímulo hipóxico, para evaluar el mantenimiento de la viabilidad. Los datos obtenidos muestran que las MSC, en presencia de la biomatriz funcionalizada, sufren daños limitados en comparación con las mismas células en las mismas condiciones, pero sin la matriz. Además, la
20 viabilidad es mayor en comparación las mismas MSC que solo recibieron adenosina.

Análisis subsiguientes han permitido la evaluación de la activación de los sistemas asociados con el proceso de cardioprotección en células cultivadas con una biomatriz funcionalizada, o, más bien, la presencia de algunas de las proteínas antiapoptóticas efectoras implicadas en el proceso, tales como ERK y AKT en su forma fosforilada. Los resultados obtenidos muestran cómo estas proteínas en células cultivadas con una biomatriz funcionalizada con
25 adenosina, muestran una fosforilación de proteínas comparable con las mismas proteínas de células cultivadas en presencia de adenosina en el medio de cultivo, demostrando, por lo tanto, la eficacia de la liberación de la molécula cardioprotectora.

REIVINDICACIONES

1. Un andamio polimérico para regeneración cardíaca (10), que comprende una estructura (20) de soporte que comprende al menos una capa (30) de soporte **caracterizado porque** está formado de un material polimérico seleccionado del grupo que consiste en ácido poli(láctico-co-glicólico), ácido poli(3-hidroxibutírico-co-3-hidroxicaproylico) y poli(dioxanona), posiblemente en asociación con un polímero biológico, estando la capa (30) de soporte adicionalmente **caracterizada porque** tiene una superficie sobre la que se forma una pluralidad de cavidades (41), dispuestas en una celosía regular, estando definidas dichas cavidades (41) por un conjunto de proyecciones lineales longitudinales (40a, 40b) y por un conjunto de proyecciones lineales transversales (40c), que se intersectan entre sí, respectivamente.
2. Un andamio polimérico para regeneración cardíaca (10) según la reivindicación 1, en el que dichas cavidades (41) tienen una profundidad d en el intervalo de 20 a 100 μm .
3. Un andamio polimérico para regeneración cardíaca (10) según la reivindicación 1 o 2, en el que dichas cavidades (41) tienen una dimensión longitudinal l en el intervalo de 350 a 600 μm y una dimensión transversal w_1 en el intervalo de 30 a 150 μm .
4. Un andamio polimérico para regeneración cardíaca (10) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho conjunto de proyecciones lineales longitudinales (40a, 40b) comprende una secuencia alternante de proyecciones anchas (40b) y de proyecciones estrechas (40a), en el que la dimensión transversal w_2 de las proyecciones anchas (40b) se encuentra en el intervalo de 50 a 160 μm y la dimensión transversal w_3 de las proyecciones estrechas (40a) se encuentra en el intervalo de 20 a 120 μm , con la condición de que $w_2 > w_3$.
5. Un andamio polimérico para regeneración cardíaca (10) según la reivindicación 4, en el que dicha secuencia alternante contempla una proyección ancha (40b) por cada dos proyecciones estrechas (40a).
6. Un andamio polimérico para regeneración cardíaca (10) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dichas cavidades (41) tienen una forma esencialmente rectangular.
7. Un andamio polimérico para regeneración cardíaca (10) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se selecciona dicho polímero biológico del grupo que consiste en gelatina, ácido hialurónico, colágeno y goma gelana.
8. Un andamio polimérico para regeneración cardíaca (10) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha estructura (20) de soporte comprende una primera y una segunda de dichas capas (30) de soporte y una capa intermedia (33) de material polimérico intercalada entre dichas capas primera y segunda (30) de soporte, teniendo dichas capas primera y segunda (30) de soporte cavidades (41) que están enfrentadas, respectivamente, hacia lados opuestos de la estructura (20) de soporte.
9. Un andamio polimérico para regeneración cardíaca (10) según la reivindicación 8, en el que dicho material polimérico de la capa intermedia (33) es un polímero biológico.
10. Un andamio polimérico para regeneración cardíaca (10) según la reivindicación 9, en el que dicho material polimérico de la capa intermedia (33) es gelatina.
11. Un andamio polimérico para regeneración cardíaca (10) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que también comprende un ingrediente farmacéutico activo cardioprotector.
12. Un andamio polimérico para regeneración cardíaca (10) según la reivindicación 11, en el que dicho ingrediente farmacéutico activo cardioprotector es adenosina o ciclosporina A.
13. Un andamio polimérico para regeneración cardíaca (10) según la reivindicación 11 o 12, en el que se incluye dicho ingrediente farmacéutico activo en la capa intermedia (33) y/o en la o las capas (30) de soporte.
14. Un andamio polimérico para regeneración cardíaca (10) según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que dicho ingrediente farmacéutico activo está encapsulado en nanopartículas de núcleo-envoltura.
15. Un andamio polimérico para regeneración cardíaca (10) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que también comprende una pluralidad de células madre cardíacas (C) alojadas en dichas cavidades (41).

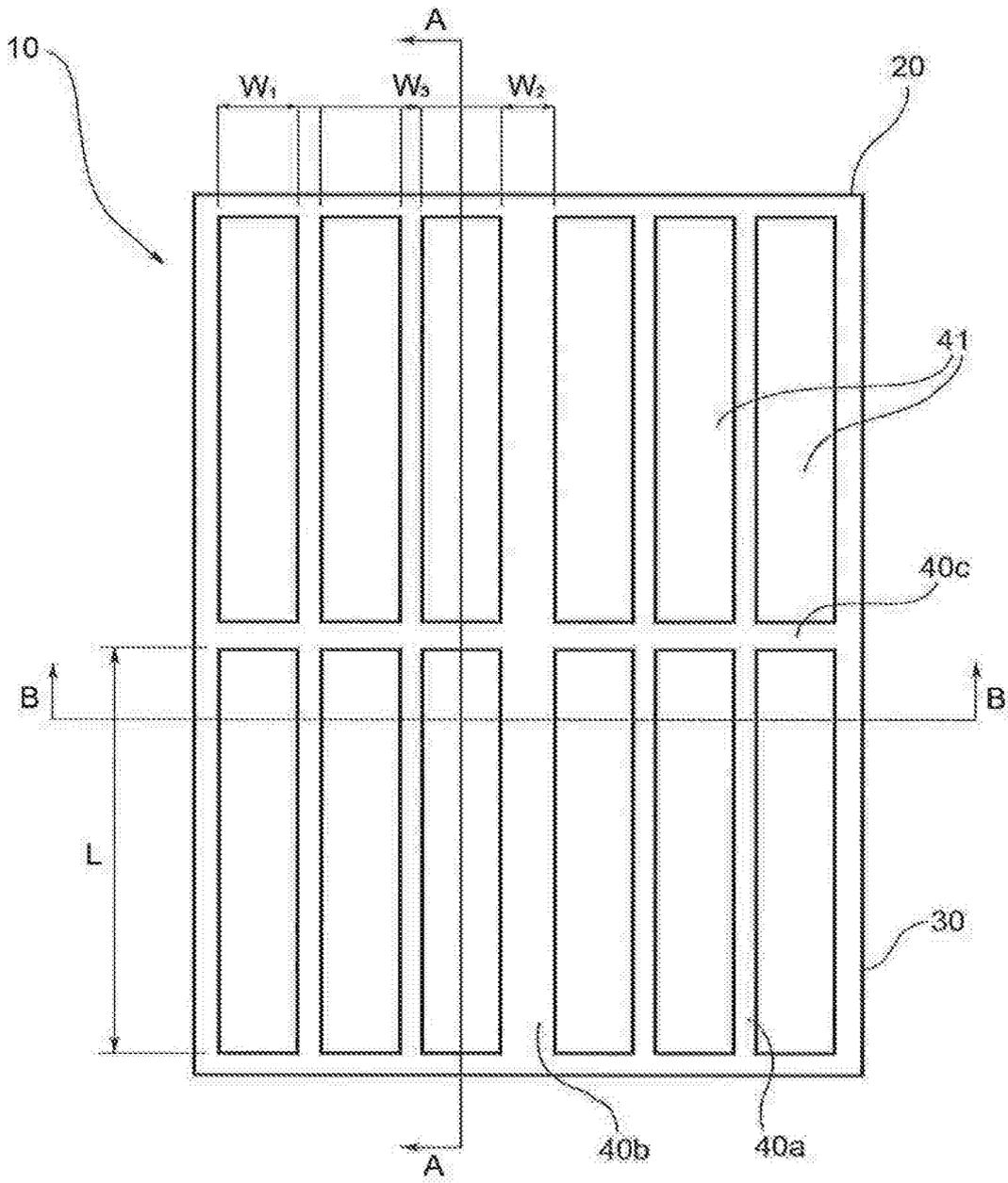


FIG. 1a

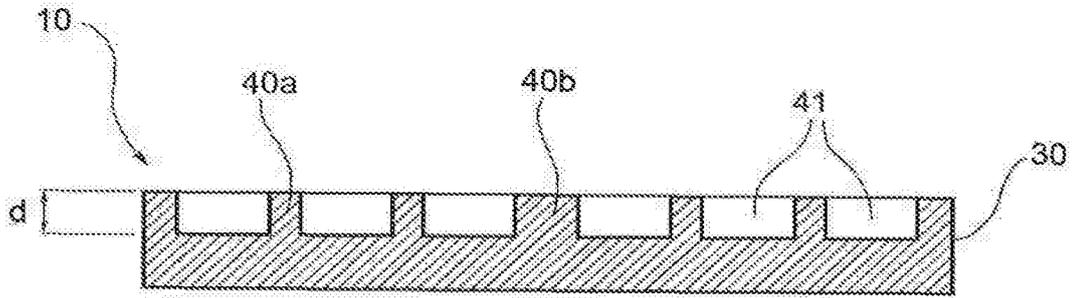


FIG. 1b

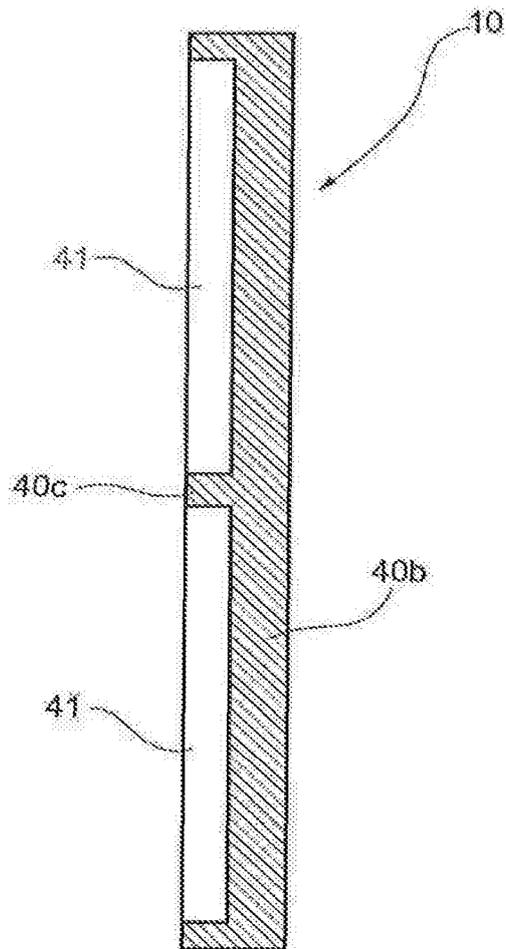


FIG. 1c

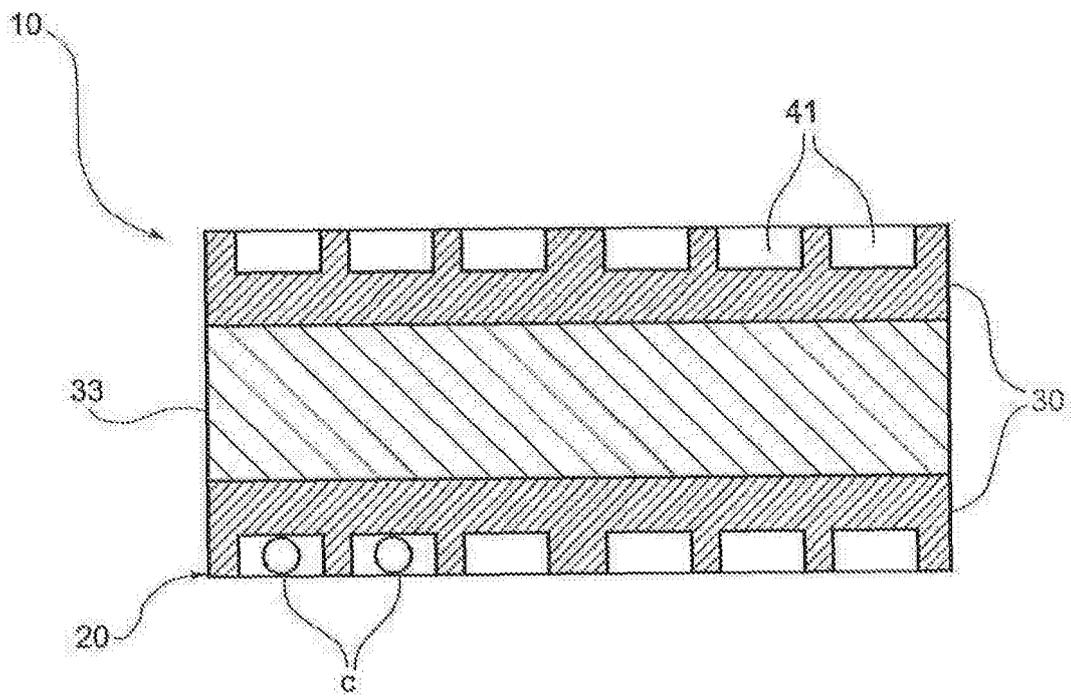


FIG. 2