

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 355**

51 Int. Cl.:

A61F 2/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.01.2006 PCT/EP2006/000398**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.07.2006 WO06077085**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2006 E 06700988 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 1838240**

54 Título: **Derivado de ácido hialurónico y células madre neurales para la regeneración de SCI y PNT**

30 Prioridad:

19.01.2005 US 644587 P

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

17.05.2018

73 Titular/es:

**ANIKA THERAPEUTICS S.R.L. (100.0%)
Corso Stati Uniti 4/U
35127 Padova , IT**

72 Inventor/es:

**PAVESIO, ALESSANDRA;
VESCOVI, ANGELO;
GELAIN, FABRIZIO y
VERGA, MAURIZIO**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 668 355 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

Derivado de ácido hialurónico y células madre neurales para la regeneración de SCI y PNT

5 Objeto de la invención

La presente invención está dirigida a la regeneración de una lesión de la médula espinal y del nervio periférico después de la implantación de un armazón elaborado a partir de un derivado de ácido hialurónico de acuerdo con la reivindicación 1 en la que se siembran células madre neurales.

10

Antecedentes de la invención

El ácido hialurónico es un componente principal de la matriz extracelular que rodea las células que migran y proliferan. Es un polisacárido extremadamente largo cargado negativamente, cada molécula del cual consta de hasta 50.000 réplicas del disacárido simple compuesto por ácido glucurónico y N-acetilglucosamina. De hecho, es importante mencionar las aplicaciones exitosas in vivo de sus derivados en la cicatrización de heridas, úlceras diabéticas, tratamientos de vitiligo, prevención de adhesión laparoscópica, recubrimientos superficiales antiadherentes, regeneración de cartílago.

Una clase de derivados de HA se llama polisacáridos autoentrecruzados. En este caso, la estabilidad se logra si el polímero se obtuvo creando enlaces entrecruzados, pero no se involucraron productos químicos adicionales para unir las cadenas de hialuronano. La estabilización se logró esterificando directamente un cierto porcentaje de los grupos carboxilo del ácido glucurónico a lo largo de la cadena polimérica con grupos hidroxilo de las mismas o diferentes moléculas de hialuronano. Estos materiales son suspensiones altamente viscosas en agua destilada estéril de micropartículas autoentrecruzadas con concentraciones variables de entre 30 y 60 mg/mL.

Una forma alternativa de obtener derivados de HA implica el uso de reacciones de acoplamiento en las que grupos funcionales específicos del polisacárido (por ejemplo, grupos carboxilo, hidroxilo, N-acetilo) se modifican por reacciones químicas tales como esterificación, sulfatación, amidación, etc.

Todos estos biomateriales modificados con HA *in vivo* se degradan espontáneamente por actividad enzimática o hidrólisis, produciendo fragmentos de moléculas de HA y los grupos funcionales previamente unidos (alcohol bencílico o etílico, amidas, etc.).

La síntesis de derivados de HA normalmente implica un procedimiento de dos etapas: la preparación de una sal cuaternaria de HA y su posterior reacción con un agente químico (esterificación, amidación, etc.) en un disolvente aprótico a una temperatura controlada. Se puede usar una variedad de alcoholes para la esterificación (alifáticos, aralifáticos, cicloalifáticos y otros). El HA amidado puede prepararse de acuerdo con el documento EP 1095064. Los ésteres de ácido hialurónico se conocen, por ejemplo, a partir del documento EP 216453. Los derivados sulfatados sobre el oxígeno del HA se conocen a partir del documento EP 702699.

Los derivados percarboxilados de HA se conocen a partir del documento EP 1339753.

De acuerdo con el grupo químico sustituido durante las reacciones químicas (y también del porcentaje de sustitución), los biomateriales resultantes podrían tener propiedades mecánicas totalmente diferentes: por ejemplo, en el caso del HA esterificado, el tiempo de residencia aumenta por medio de una mayor hidrofobicidad y disminución de la carga negativa del grupo carboxilo.

Se ha demostrado que los queratinocitos, fibroblastos, condrocitos, células madre mesenquimales, células endoteliales, hepatocitos, células uroteliales y células nerviosas proliferan de manera eficiente en biomateriales modificados con HA. Sin embargo, la gran mayoría de los derivados de HA entrecruzados previamente mencionados están representados por materiales muy hidratados, que no son adhesivos celulares y, por esta razón, se consideraron inicialmente como materiales reabsorbibles para la prevención de adhesiones quirúrgicas.

Nuestro primer enfoque de ingeniería de tejidos fue probar esta importante variedad de biomateriales completamente biodegradables. Los productos basados en HA han recibido la aprobación de la Comunidad Europea para aplicaciones clínicas, y tres productos han sido aprobados por la FDA. El documento US 6.482.231 divulga un material biológico para la reparación de defectos del tejido conjuntivo que comprende células madre mesenquimales y derivados de ácido hialurónico tales como HYAFF® 11.

La SCI (lesión de la médula espinal) se puede caracterizar como resultado de procesos continuos de destrucción tisular, reparación abortiva y curación de heridas alrededor del sitio de la lesión. Un importante cuerpo de evidencia sugiere que la SCI evoluciona a través de tres fases: la fase aguda, secundaria y crónica. La lesión inicial del núcleo se expande progresivamente y la SCI evoluciona hacia su fase crónica. La sustancia blanca muestra desmielinización parcial o completa que es responsable de los déficits de conducción. Aproximadamente el 25% de los pacientes con SCI desarrollan un quiste situado en el centro que se expande progresivamente y conduce a la siringomielia.

Otras características histopatológicas incluyen la disolución de la materia gris, la deposición del tejido conectivo y la gliosis. El intervalo y la ubicación de la lesión determinan el déficit neurológico general, el desarrollo de hiperexcitabilidad y los síndromes de dolor crónico.

5 Si el área principal de interés de la investigación es la respuesta fisiológica a la lesión o la fisiopatología de la lesión secundaria, entonces el investigador puede elegir un modelo de contusión, ya que es muy similar a la SCI humana. Sin embargo, la demostración inequívoca de axones en regeneración en un modelo de contusión plantea un nuevo desafío, específicamente la delineación de los axones perdidos y regenerados.

10 Los estudios conductuales y la evaluación estadística de la recuperación de la vía motora-sensorial también podría ser un paso extremadamente crítico con los modelos de contusión, en los que los grupos de control animal (lesionados, pero no tratados) recuperan espontáneamente parte de su conectividad nerviosa perdida.

15 Si se va a implementar un dispositivo, un modelo de transección parcial o completa podría ser el más adecuado para la colocación del dispositivo. Para ciertos paradigmas experimentales, se podría planificar una combinación de modelos. Por ejemplo, las primeras etapas de un plan experimental que explora la regeneración del axón podrían utilizar modelos de transección para demostrar axones regenerados inequívocamente e identificar las terapias más prometedoras, que luego pueden probarse en modelos de contusión mediante técnicas de análisis.

20 En un modelo de transección, la capacidad de diferenciar los axones perdidos de los regenerados no es un problema. Para ciertas aplicaciones, la lesión de hemisección unilateral puede ser una alternativa viable para completar la transección. Una ventaja importante de este enfoque es la integridad estructural conservada y la función de un lado de la médula espinal. La preservación unilateral de la médula espinal suele ser suficiente para mantener la función de la vejiga y el intestino, lo que da como resultado un cuidado menos intensivo de los animales después de la operación.

25 Por estas razones, la hemisección de la médula espinal en ratas se utilizó como un modelo animal experimental para probar la regeneración de la médula espinal después de la lesión y la implantación de un armazón de HA esterificado, mientras que, para probar la regeneración del nervio periférico, se ha llevado a cabo una transección completa del nervio ciático.

30 Descripción detallada de la invención

Membranas y fibras derivadas del ácido hialurónico: un armazón de múltiples componentes

35 El primer paso de la experimentación de la invención fue una comparación amplia, *in vitro*, entre diferentes versiones de ácido hialurónico, parcial y totalmente esterificado, N-sulfatado, parcialmente amidado (gel), percarboxilado y algunas versiones autoentrecruzadas (gel). Particularmente adecuados para la invención aquí descrita han demostrado ser los ésteres de HA, y especialmente el éster bencílico (HYAFF®11).

40 Se proporcionaron HA con diferentes porcentajes de esterificación (> 70%, preferiblemente de 75 a 100%, incluso más preferiblemente 100% de grado de esterificación) en estructuras sólidas y parcialmente flexibles: que van desde mallas no tejidas y fibras paralelas no tejidas hasta estructuras tubulares tejidas y láminas ya disponibles de otros estudios y aplicaciones de ingeniería de tejidos tales como piel, tejido vascular, regeneración de cartílago. Todos los experimentos de cribado *in vitro* se realizaron siguiendo los protocolos establecidos para cosechar y expandir NSC (células madre

45 neurales).

El protocolo experimental se describe a continuación:

- solo se compararon armazones tridimensionales similares (es decir, fibras con fibras, láminas con láminas);
- 50 - disociación mecánica de las células madre neuronales dos días antes de la siembra para mantener el porcentaje de células madre sobre la población de células mixtas lo más alta posible;
- en algunos casos, los armazones de HA se sumergieron en diferentes soluciones de recubrimiento: laminina de ratón (5 µg/cm²), fibronectina humana (10 µg/cm²), laminina y fibronectina mezcladas;
- 200.000-300.000 el número total de células sembradas por condición, concentradas en 20 µl de medio;
- 55 - cada armazón se remojó durante 30 minutos con solo esta solución celular altamente concentrada;
- adición de un medio que contiene bFGF a una concentración final de 20 ng/mL;
- después de 3 días, el medio se cambió a un medio compuesto por CNTF y BDNF (20 ng/mL en ambos casos);
- reemplazo mediano cada 2 días;
- viabilidad celular probada 7 y 14 días después de la siembra en placa mediante ensayo con MTT;
- 60 - en casos de supervivencia celular, se realizó una imagen de la tinción mediante microscopios confocal y e invertido de fluorescencia;
- se usaron células madre neurales humanas y de ratón.

65 En la figura 1, es claramente visible el color azul de un atado de fibras no tejidas y una lámina hecha de HA totalmente esterificado dada por las células vivas teñidas con MTT.

El color azul se debe a la producción de mitocondrias vivas de productos de formazanos azules insolubles con el reactivo MTT. Las fibras están completamente cubiertas con células vivas. La barra de escala es de 500 μm .

De las soluciones de recubrimiento ensayadas, la fibronectina y la laminina mezcladas juntas mostraron la mayor tasa de supervivencia celular: esta comparación se realizó para todos los biomateriales mencionados anteriormente manteniendo el mismo medio de cultivo celular. En consecuencia, esta solución de recubrimiento se adoptó a partir de este momento como parte de nuestro protocolo estándar para todos los sucesivos experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Como paso siguiente, se probaron diferentes combinaciones de factores de crecimiento y neurotróficos diluidos en el medio de cultivo para favorecer la proliferación de NSC, la diferenciación hacia el fenotipo neuronal y para elegir proteínas que se ha demostrado que potencian la regeneración del sistema nervioso en experimentos *in vivo*.

Por lo tanto, se probaron el efecto sobre la proliferación celular de:

- βFGF (factor básico de crecimiento de fibroblastos)
- $\beta\text{FGF} + \text{CNTF}$ (factor neurotrófico ciliar)
- $\beta\text{FGF} + \text{CNTF} + \text{BDNF}$ (factor neurotrófico derivado del cerebro)
- $\beta\text{FGF} + \text{CNTF} + \text{BDNF} + \text{GDNF}$ (factor neurotrófico derivado del glial)

Todos estos últimos factores de crecimiento mencionados se analizaron en una concentración de 20 ng/mL.

En la tabla 1, se ve claramente el valor más alto de absorbancia (NSC vivas) obtenido para la combinación más completa de factores neurotróficos, tanto para fibras no tejidas como para armazones de lámina.

Tabla 1. Ensayo con MTT para NSC de ratón sembradas sobre fibras y sobre un armazón elaborado con HA 100% esterificado, 7 días después de la siembra.

HA 100% esterificado	βFGF	$\beta\text{FGF} + \text{CNTF}$	$\beta\text{FGF} + \text{CNTF} + \text{BDNF}$	$\beta\text{FGF} + \text{CNTF} + \text{BDNF} + \text{GDNF}$
lámina	$0,09 \pm 0,01$	$0,123 \pm 0,013$	$0,2 \pm 0,032$	$0,252 \pm 0,044$
fibras	$1,32 \pm 0,101$	$1,88 \pm 0,162$	$2,053 \pm 0,169$	$2,4683 \pm 0,369$

El factor trófico incluido en el medio influyó fuertemente en el tamaño final de la población de células vivas ($n = 8$). Los valores se expresan en unidades de absorbancia. Todas estas tendencias en los ensayos con MTT se reprodujeron utilizando también NSC humanas.

La morfología celular y la distribución topográfica en los armazones de lámina y de fibra se evaluaron mediante microscopios ópticos verticales e invertidos para todos los experimentos descritos previamente, tanto para células de ratón como humanas.

La figura 2 muestra la tinción de células madre neurales humanas sembradas en microfibras (a, b) y una lámina (c, d) de HA esterificado al 100% 5 días después de la siembra. Los núcleos celulares (b, d) se tiñeron de azul con DAPI. En la columna de la izquierda, las neuronas y los astrocitos se tiñen de verde con el anticuerpo $\beta\text{Tubulina}$ (a, c) y de rojo con el anticuerpo GFAP (c solamente). En el caso de las fibras, es posible observar cómo las NSC que se diferencian alargan sus cuerpos y extienden sus ramas siguiendo los ejes longitudinales de cada fibra. Las barras de escala son de 50 μm .

La marcación fluorescente también resultó esencial para probar la morfología celular en armazones tridimensionales: en este caso, la formación de imágenes se realizó mediante fluorescencia y microscopía de fluorescencia confocal.

Se alcanzó una distribución de células suficientemente uniforme para fibras no tejidas y armazones de lámina: las mallas no tejidas y los tubos tejidos resultaron difíciles de sembrar uniformemente en condiciones estáticas (es decir, con células y armazones no expuestos a ningún flujo de medio artificial).

Al final de la experimentación *in vitro*, ha sido posible cubrir casi por completo las fibras de HA con NSC adherentes. Para hacerlo, se usaron los factores de crecimiento para estimular la proliferación celular y la migración espontánea entre las fibras.

La microscopía confocal demostró ser una técnica esencial para la formación de imágenes tridimensionales de armazones celulares y el recuento celular a causa de su exploración de alta resolución.

También se probaron bioarmazones de gel hechos de HA autoentrecruzado (proyectado para aplicaciones antiadherentes), HA amidado y HA con 65% y 50% de esterificación: todos estos estaban en forma de polvo y se probaron a diferentes diluciones en agua destilada agua.

Las condiciones preferidas implican mezclar el polvo seco del HA autoentrecruzado con el medio (que contiene βFGF ,

CNTF, BDNF, GDNF) y una solución de recubrimiento (que comprende preferiblemente fibronectina y laminina) como se divulgó anteriormente; se han obtenido notables adhesiones celulares y ramificación (véase la figura 3) y el comienzo de la formación de la red celular *in vitro* usando estas condiciones.

- 5 En particular, la figura 3 muestra imágenes ópticas de contraste de fase de NSC sembradas en geles de HA autoentrecruzados 4 días después de la siembra. En la figura (a), se diluyó el HA en agua destilada, en (b) se diluyó HA en nuestro medio de diferenciación anteriormente mencionado y en una solución de recubrimiento hecha de laminina y fibronectina. Las células con forma redonda que se muestran en (a) indican ausencia total de adhesión celular, ramificación y diferenciación, esto generalmente conducirá a la apoptosis o senescencia de las células; por otro lado, las
- 10 células ramificadas que se muestran en (b) proporcionan una pista de un entorno más favorable para la diferenciación y supervivencia de las NSC. Las barras de escala son de 50 μm .

Modelos animales y diseño de armazones

- 15 Por las razones descritas anteriormente, se usó una hemisección de la médula espinal en ratas como modelo animal experimental para probar la regeneración de la médula espinal después de la lesión y la implantación de un armazón hecho de HYAFF®11.

- 20 Para garantizar la confiabilidad de los resultados en experimentos de lesión de nervios periféricos, se llevó a cabo una transección completa del nervio ciático en ratas. Tanto para SCI como para PNT (transección del nervio periférico) se crearon tres grupos diferentes de animales: ratas con lesiones solamente (grupo de control), ratas con lesiones y trasplantadas con NSC humanas (y a veces de ratón) diferenciadas en matrices biopoliméricas y ratas que recibieron solamente armazones.

- 25 En un intento de inducir un crecimiento y diferenciación celular orientada tridimensional, se diseñaron y probaron armazones similares tanto para SCI como para PNT:

- se seleccionó 100% de éster bencílico de HA como el principal componente de los armazones debido a los prometedores resultados obtenidos en experimentos *in vitro* (véase el capítulo anterior) y el tiempo de biodegradación estimado (2-3 meses) que era más cercano al objetivo deseado.
- 30

- simplificando la citoarquitectura de la mayor parte del tracto de la médula espinal y los nervios periféricos a las fibras nerviosas orientadas longitudinalmente, se adoptaron fibras (20 μm - 50 μm) orientadas espacialmente como soportes tridimensionales capaces de influir en la orientación celular (demostrado en el capítulo anterior) y corregir la regeneración de neuritas endógenas espaciales.
- 35

- Debido a su estructura porosa intrínsecamente abierta y a su escasa rigidez mecánica, en el caso de PNT estas matrices hechas de fibra se insertaron en tubos (hechos del mismo biomaterial) de 2 mm de ancho que tienen ya sea paredes continuas o porosas. Dichos tubos pueden someterse a punción con láser para permitir la penetración de la glía dentro del tubo, liberando los factores de crecimiento haciendo que la regeneración del nervio sea más fácil. Ya se conocen pequeños tubos que consisten en fibras de HYAFF® 11 y se han usado, por ejemplo, para la regeneración de la uretra (Italiano G. et al., Urol Res, 1997, 26: 281-284). El documento EP 571415 divulga un cilindro de HYAFF® 11 soportado por un hilo helicoidal que siempre consiste en HA y enriquecido con factores de crecimiento. El documento EP 652778 describe una red de varios hilos tejidos que soportan el tubo de HA, dichos hilos consisten en los mismos
- 40 materiales y se insertan en el cuerpo del tubo, para hacerlos más compactos; también en este caso, un factor de crecimiento está presente. Estos armazones conocidos, aunque desarrollados para la generación de fibras nerviosas, tienen importantes inconvenientes en cuanto a la elasticidad en el seguimiento del complejo proceso regenerativo del nervio periférico, en vista de la falta de flexibilidad y adaptables a la ruta del nervio.
- 45

- 50 Para el modelo de SCI, el armazón de fibra se colocó primero en el sitio de la lesión, luego se usó una lámina cuadrada como parche para aislar el sitio de regeneración de la invasión nociva de las células conectivas y musculares de los tejidos que rodean la lesión. En el caso de PNT, los tubos se suturaron a los muñones nerviosos, para SCI los parches se sellaron con cola de fibrina (una pasta biológica comúnmente utilizada en cirugía clínica).

- 55 Una representación esquemática de la cirugía para SCI se muestra en la figura 4. Las principales diferencias con el modelo de PNT son el sitio de la lesión (nervio ciático), la longitud del espacio nervioso (1 mm), el componente externo del armazón (un tubo en lugar de una lámina) y el uso de sutura en lugar de cola de fibrina para pegar el trasplante al tejido del huésped.

- 60 Se sembraron NSC en un armazón de HA y se cultivaron durante 2 días *in vitro*. Inmediatamente después de la lesión de la médula espinal realizada mediante incisión, se colocaron células y fibras a lo largo del eje longitudinal del tracto espinal. Luego se usó pegamento de fibrina para sellar la membrana con HA.

El protocolo detallado hace uso de la primera experimentación *in vitro* sobre medio de cultivo y recubrimiento:

- las neuroesferas (o agrupaciones de NSC) se disociaron mecánicamente 2 días antes de la siembra;
- 65

- el día antes de la siembra celular, cada componente del armazón se sumergió en una solución de recubrimiento hecha de laminina (25 µg/mL) y fibronectina (50 µg/mL) y se dejó durante la noche;
 - Se resuspendieron 5×10^5 - $7,5 \times 10^5$ NSC en 20 µL de medio de cultivo. La suspensión celular se vertió sobre los armazones y se dejó durante 30' a 37°C+ como una etapa de adhesión previa;
 - las células sembradas se cultivaron luego durante dos días *in vitro* con medio que contenía βFGF, CNTF, GDNF, BDNF.
- Se insertaron biopolímero + células en la lesión aguda en la médula espinal (hemisección y eliminación de tejido de la porción media de 3 mm del tracto espinal T9) de ratas hembra Sprague-Dawley adultas (250 g) y se sellaron con cola de fibrina.
- Los animales de control recibieron el armazón sin células o solo experimentaron la lesión. Después de la cirugía, los animales recibieron dosis diarias de ciclosporina como inmunosupresor.
- Los animales se controlaron dos veces a la semana para evaluar la entidad del daño funcional y se escarificaron 1-2 o 6 meses después del trasplante.
- Después de la perfusión intracardíaca de PFA al 4%, se extrajo la médula y se procesó para el análisis histoquímico.
- En los modelos PNT, se ejecutó una transección completa del nervio ciático, se retiró una tira de tejido nervioso de 1 mm de longitud y se suturó un puente hecho de células y el armazón (fibras y tubo) a ambos muñones. También en este caso, se usaron grupos de animales de control (armazón sin células, cirugía sin ningún tratamiento).
- Aplicación *in vivo* de armazones basados en HYAFF®11: resultados
- Para el modelo de SCI, se usaron más de 40 animales: en cada día de cirugía, se operó al menos un animal de cada grupo. Los animales se sacrificaron y el tejido de la médula espinal se incluyó en PFA al 4% y se crioseccionó en secciones coronales y longitudinales. Luego se realizaron análisis morfológicos e inmunohistoquímicos.
- Para evitar una respuesta inmune no deseada a las células trasplantadas, los animales recibieron dosis diarias de ciclosporina hasta el día de su sacrificio.
- Se usaron diferentes líneas celulares para trasplantes: células madre neurales humanas, NSC de ratón, NSC de ratón transgénico (modificadas para expresar un marcador dentro de sus núcleos, β-galactosidasa, para permitir su localización en criosecciones del tejido del huésped).
- En las primeras semanas después del trasplante, se encontró una invasión ordinaria (para un seguimiento fisiológico de SCI) de monocitos, células T y otras células relacionadas con la respuesta inmune. La figura 5 muestra la tinción con azul de toluidina para componentes ácidos (principalmente manchas grandes de fibras de HA y puntos pequeños de núcleos celulares) incluidos en esta sección coronal de células y armazón 3 semanas después del tratamiento. La invasión de células huésped llenó los espacios entre las fibras. Los tonos grises de reabsorción alrededor de algunas fibras, atestiguan la etapa final de la reacción inmune del huésped al armazón. La barra de escala es de 50 µm.
- Sin embargo, esta reacción terminó en el tiempo (> 2 meses). No se encontraron diferencias significativas en la biocompatibilidad de estas matrices entre los animales trasplantados con armazones solamente y aquellos con armazones sembrados con células.
- Por otra parte, las NSC trasplantadas no parecieron verse dramáticamente afectadas por esta respuesta.
- La figura 6 muestra la tinción nuclear de las NSC transgénicas trasplantadas. Sección coronal del sitio de trasplante: 20 días después de la cirugía, las células con núcleo marcado en azul se adhieren y se ramifican entre las fibras de HA modificado (círculo negro vacío). La barra de escala es de 50µm.
- En esta figura 6 es posible observar una sección coronal del sitio de la lesión (aproximadamente en el medio del armazón) 20 días después de la cirugía: las células transgénicas trasplantadas están marcadas en azul por medio de la reacción con X-gal, que marca la enzima β-galactosidasa producida espontáneamente por las NSC transgénicas trasplantadas.
- Seis meses después del trauma, las NSC también estaban presentes en secciones cosechadas caudalmente y rostralmente a la lesión, mostrando así una capacidad intrínseca para migrar del armazón al tejido del huésped.
- Lo más importante, el nuevo crecimiento del tejido nervioso dentro de las lesiones se probó por medio de una técnica rutinariamente utilizada para teñir químicamente los neurofilamentos (tinción con plata de Bielshowsky para los axones).

Los animales tratados presentaron una invasión de fibras neuronales del área que rodea el sitio de la lesión: este efecto se pudo observar no antes de 1 mes después del trasplante.

Las figuras 7 muestran la tinción de neurofilamentos de la sección transversal del sitio de la lesión de la médula espinal 50 días después de la misma. Las fibras nerviosas están teñidas de color marrón oscuro. Detalles de aumento bajo (a) y alto (b) de la regeneración nerviosa en un animal trasplantado con NSC humanas y armazón HYAFF®11. (a) Las formas redondas dejadas por las microfibras de HA siguen siendo claramente visibles, las fibras nerviosas invaden el armazón desde la izquierda (la mitad izquierda permanece intacta mediante cirugía), la porción derecha de la imagen todavía está llena de agujeros (= fibras). (b) Imagen de gran aumento de la regeneración de neuronas entre las microfibras de HA. En algunos haces nerviosos, las fibras individuales son visibles.

Las figuras 8 muestran (a) neurofilamentos y (b) tinciones con hematoxilina-eosina de secciones longitudinales consecutivas de la médula espinal dañada y trasplantada. El animal fue sacrificado 6 meses después de la cirugía. "R" apunta al lado rostral de la médula espinal. El sitio del trasplante está rodeado por la tinción morfológica (b) por la curva roja. La línea negra en (a) son artefactos debido al protocolo de tinción de plata utilizado. Las fibras nerviosas (líneas de color marrón oscuro) invadieron el sitio de la lesión desde el lado rostral.

Las fibras nerviosas invadieron el armazón tanto lateralmente (figura 7ab) como rostralmente (figura 8a) en el sitio de la lesión.

Particularmente, fue posible observar procesos de regeneración de la fibra nerviosa que se extienden significativamente a lo largo del eje longitudinal de la médula espinal (figura 8a), proporcionando soporte a la idea de usar microfibras orientadas para orientar la regeneración nerviosa.

En la figura 8b, haciendo uso de una tinción inmunohistoquímica de la morfología (reacción de hematoxilina-eosina) se colorearon citoplasmas y núcleos celulares. El sitio de la lesión está bordeado artificialmente por la curva roja. Debe observarse que las cavidades paralelas del tejido son dejadas por las fibras del armazón, efecto debido al largo período de biodegradación del HA esterificado al 100% cuando se implanta en los tejidos del SNC.

Hasta la fecha, todos los armazones, ya sea sembrados o no con NSC, impedían la formación de quistes acuosos y cicatrización gliales en todos los animales sometidos a prueba: el resultado que se encontró en los animales solamente lesionados. Las figuras 9ab muestran (a) tinciones de hematoxilina-eosina y (b) neurofilamentos de secciones longitudinales consecutivas de la médula espinal lesionada (grupo de control). El animal fue sacrificado 6 meses después de la cirugía. "R" apunta al lado rostral de la médula espinal. La imagen de la izquierda muestra una gran rotura masiva de tejido, con un quiste de forma redonda completamente libre de fibras nerviosas (b). Las líneas continuas están presentes en ambas imágenes como artefactos de los protocolos utilizados.

También se llevó a cabo el protocolo de transección del nervio periférico (nervio ciático) (véase el párrafo anterior) en 9 animales, adoptando la estrategia previa de grupos de 3 animales (armazones sembrados con células, armazones solos, nervios seccionados y no tratados). Solo en los sitios de la lesión de los animales trasplantados se observó la invasión de la fibra nerviosa, la remielinización de las fibras regeneradas y revascularización (figura 10) 6 meses después de la cirugía.

En particular, la figura 10 muestra la reacción con azul de toluidina de la sección transversal del nervio ciático seccionado y trasplantado con un armazón de HA esterificado al 100% sembrado con NSC humanas. La misma sección visualizada a bajo (a) y alto (b) aumento 6 meses después de la lesión. Las fibras del armazón todavía están presentes (círculos marcados con HA) y entre ellas una gran cantidad de fibras nerviosas regeneradas (a). Las fibras nerviosas individuales son círculos pequeños de bordes oscuros en (b). Cuanto más gruesa sea la lámina de fibra, más remielinizada está. Un vaso sanguíneo también está rodeado por el óvalo rojo en (b).

Se puede suponer que todas las fibras nerviosas que se encuentran entre las fibras del armazón son fibras regeneradas debido al modelo de sección completa que se utilizó para la sección transversal del nervio ciático.

Por lo tanto, los resultados son los siguientes:

- el biomaterial elegido fue bien tolerado por los sistemas nerviosos central y periférico: ausencia de respuesta inmune crónica persistente o apoptosis celular;
- la regeneración nerviosa se produjo entre las fibras de HA en los modelos de SCI y PNT;
- el armazón proyectado influyó espacialmente en la regeneración espontánea de las fibras nerviosas;
- en el modelo de PNT, las fibras nerviosas estaban parcialmente mielinizadas;
- las NSC sobrevivieron 6 meses después del trasplante y migraron fuera del sitio de la lesión.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un biomaterial para el tratamiento de la médula espinal o de una lesión del nervio periférico, que puede obtenerse mediante:
- 10 a) tratamiento de un derivado de ácido hialurónico seleccionado entre ésteres, amidas, derivados entrecruzados, percarboxilados y sulfatados de ácido hialurónico con una solución de recubrimiento que comprende fibronectina y laminina que promueven la adhesión, ramificación y diferenciación de células madre neuronales;
- 15 b) poner en contacto células madre neuronales aisladas con el derivado de ácido hialurónico obtenido de la etapa a) y cultivar y expandir las células absorbidas en presencia de factores de crecimiento o neurotróficos seleccionados de β FGF (factor de crecimiento de fibroblastos básicos), CNTF (factor neurotrófico ciliar), BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) y GDNF (factor neurotrófico derivado de glial) o mezclas de los mismos.
- 20 2. Un biomaterial de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el derivado de ácido hialurónico es un éster que tiene un grado de esterificación que varía de 75 a 100%.
- 25 3. Un biomaterial de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el derivado de ácido hialurónico es un éster de ácido hialurónico al 100%.
4. Un biomaterial de acuerdo con la reivindicación 1, en forma de fibras, geles, telas no tejidas y tejidas, láminas y tubos que tienen paredes continuas o porosas.
5. Un biomaterial de acuerdo con las reivindicaciones 1-4 para uso en el tratamiento de una lesión de la médula espinal o lesión del nervio periférico mediante implante en el sitio de la lesión.

Figura 1

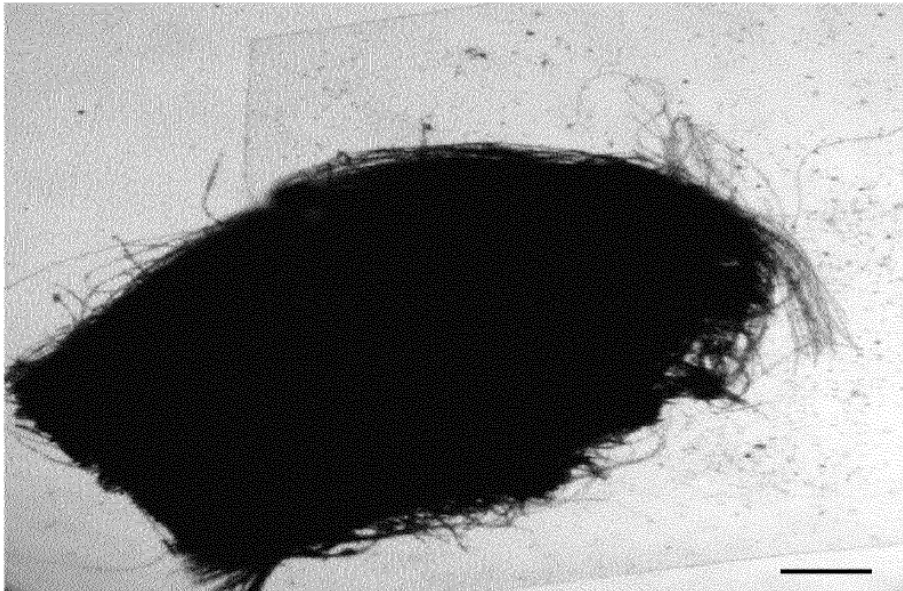


Figura 2

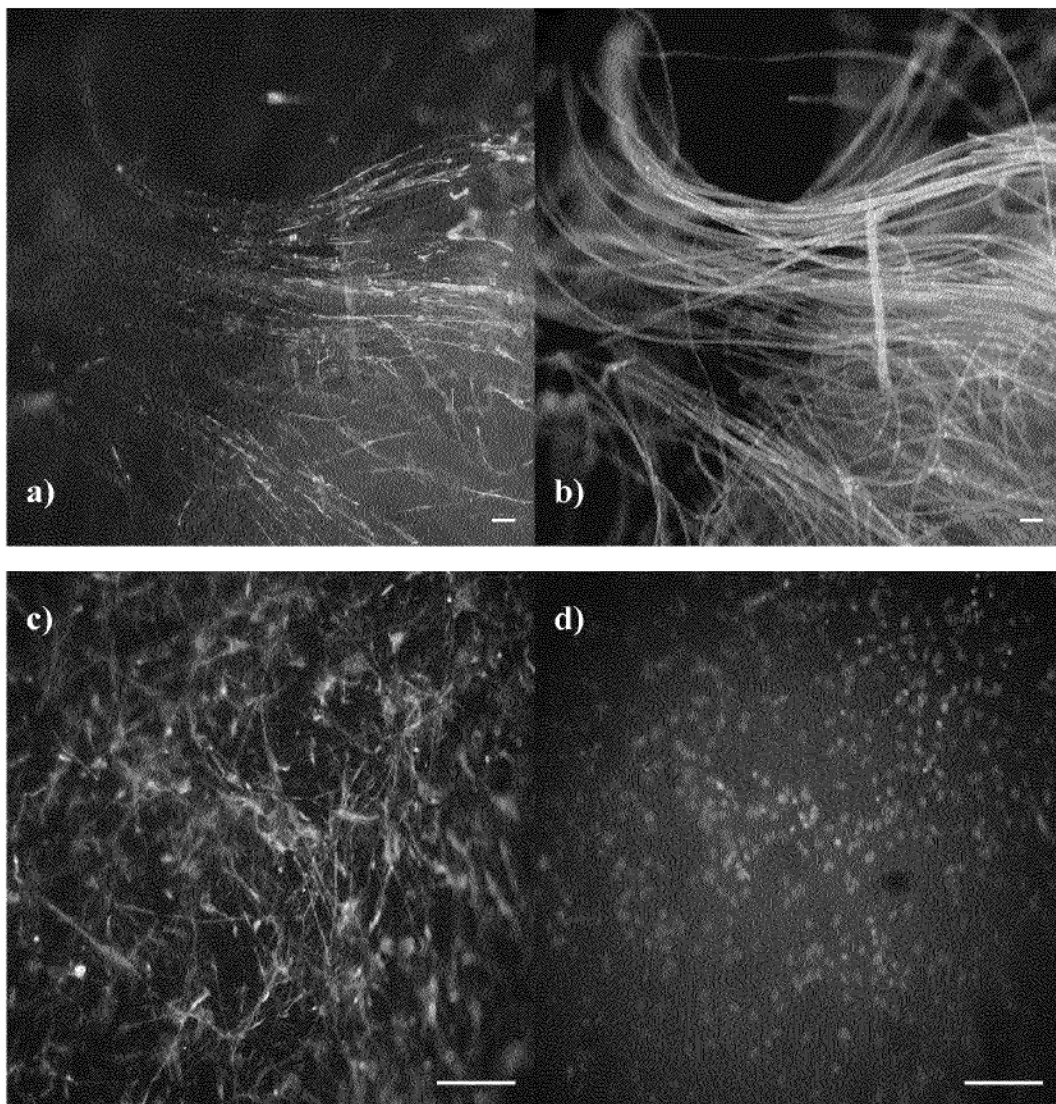


Figura 3

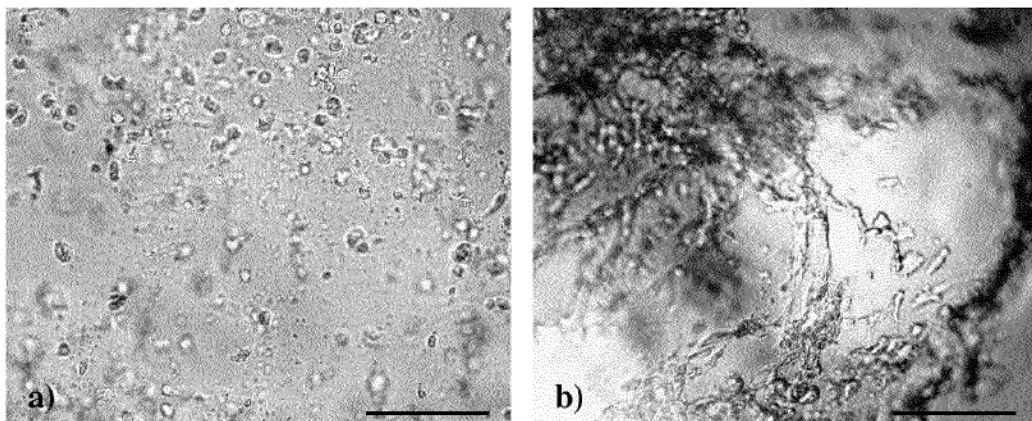


Figura 4

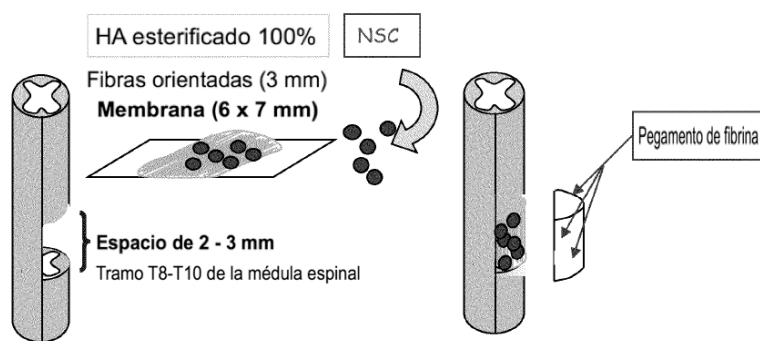


Figura 5

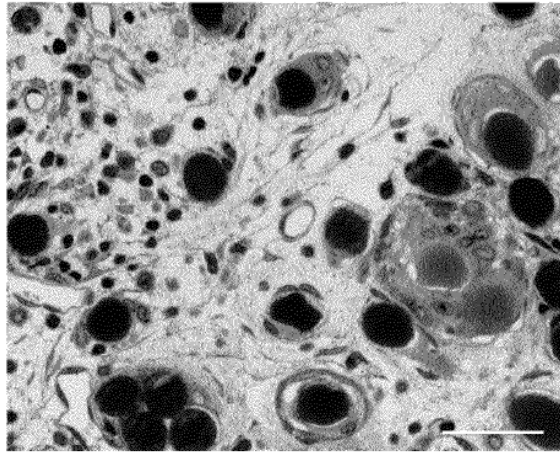


Figura 6

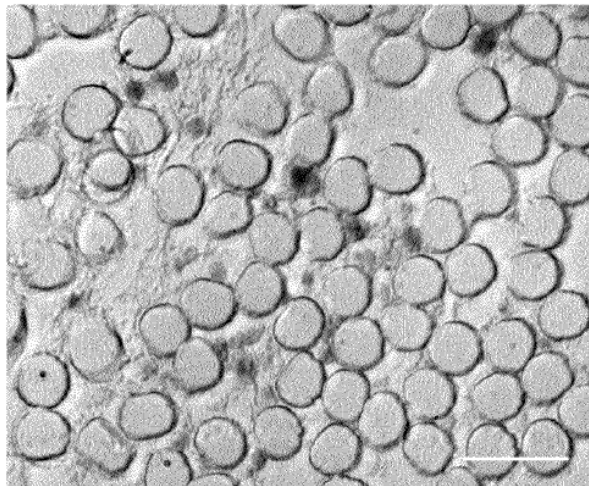


Figura 7

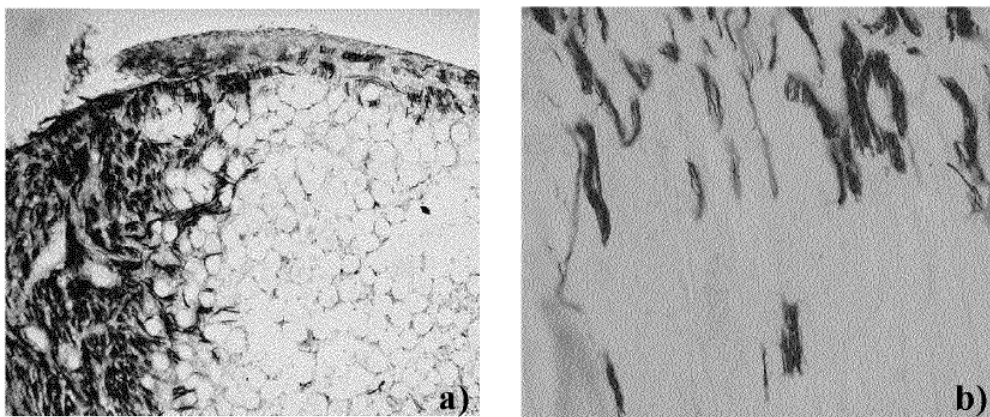


Figura 8

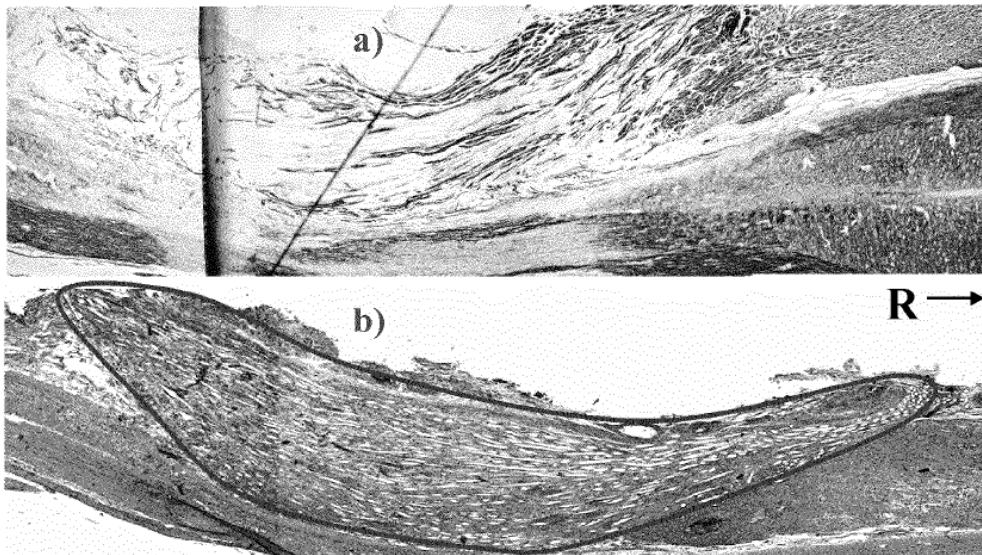


Figura 9

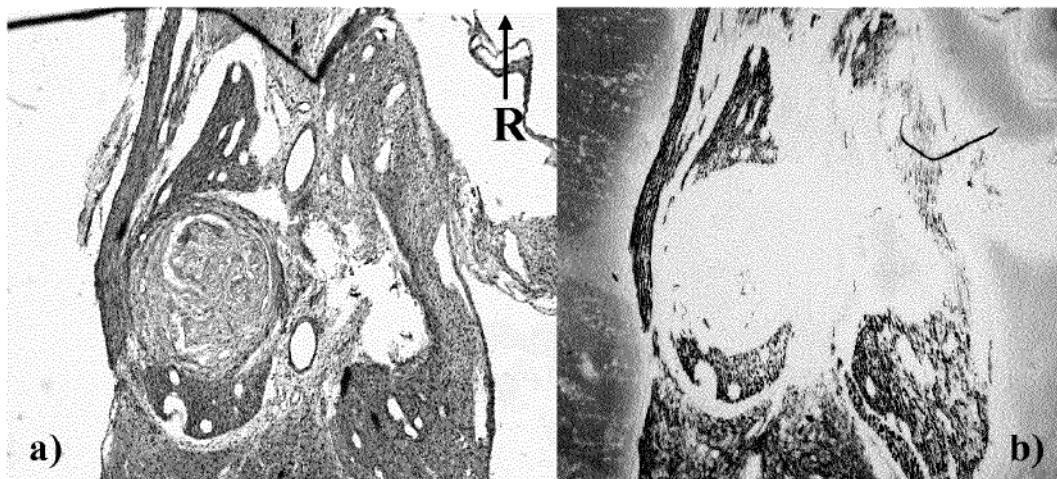


Figura 10

