

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 339**

51 Int. Cl.:

A61L 27/34 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)
A61L 31/10 (2006.01)
A61L 31/14 (2006.01)
A61F 2/02 (2006.01)
A61F 2/04 (2013.01)
D01D 10/00 (2006.01)
D01D 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2012** **PCT/IB2012/053888**
87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013** **WO13018021**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2012** **E 12759252 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018** **EP 2736544**

54 Título: **Armazón tisular**

30 Prioridad:

29.07.2011 GB 201113060

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.06.2018

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF ULSTER (100.0%)
Cromore Road Coleraine
County Londonderry BT52 1SA, GB

72 Inventor/es:

O'HARE, PETER;
BURKE, GEORGE;
MEENAN, BRIAN;
PORTER, PATRICK y
REA, CHRIS

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 671 339 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

Armazón tisular

- 5 La presente invención se refiere a un método para formar un armazón tisular. La presente invención se puede aplicar a la formación de armazones tisulares para cualquier uso adecuado. Por ejemplo, los armazones tisulares formados se pueden usar para formar válvula cardíaca para sustitución, injertos vasculares, parches de miocardio, injertos de vías respiratorias y traqueales, injertos de piel o de hecho cualquier tipo de injerto de tejido. Del mismo modo la invención se podría usar para modificar mediante ingeniería y para producir armazones para la síntesis de cualquier
- 10 órgano, parcial o completo. Los armazones tisulares formados de acuerdo con cualquier aspecto de la presente invención se pueden usar para cualquier aplicación de ingeniería/aumento de tejido tal como injertos vasculares, injertos intestinales, injertos traqueales, injertos de esófago, etc., y en ciertas aplicaciones se pueden combinar con una endoprótesis vascular, como se describe a continuación.
- 15 La presente invención, en algunas realizaciones preferentes, se refiere a la formación de un armazón tisular para la formación de válvulas cardíacas para sustitución. Los tratamientos actuales para Sustitución de Válvula Cardíaca (HVR) son válvulas mecánicas (metal o polímero) o válvulas bioprotésicas de corazón de donante/animal fallecido. En el último tipo, las células y los restos celulares se eliminan de la válvula, dejando solo el "armazón" del tejido de la válvula. Sin embargo, a pesar de los riesgos quirúrgicos, todavía hay muchos problemas asociados con este tipo
- 20 de HVR. En el caso de las válvulas mecánicas, tienen el potencial de sufrir fallos mecánicos reales, ya que tienen un periodo de duración útil limitado (8-10 años) y son propensas a la calcificación/coagulación. Además, producen un sonido de clic audible en uso del que algunos pacientes son muy conscientes. Aunque las válvulas bioprotésicas están hechas a partir de una fuente biológica descelularizada, y de ese modo se dirigen a algunos de los problemas asociados con las válvulas mecánicas, todavía existe un gran riesgo de transmisión de enfermedades y, lo que es
- 25 más importante, rechazo inmunológico del implante por el paciente. Ambos tipos de implantes son implantes permanentes ya que no son reabsorbidos por el cuerpo. Como resultado, la nueva formación y regeneración del tejido cardíaco, si la hubiera es por lo tanto limitada.
- Aunque se han realizado intentos para diseñar mediante ingeniería las HVR mediante electrohilado de fibras para
- 30 formar armazones artificiales, no se han podido generar armazones que imiten de forma adecuada las propiedades biológicas y mecánicas de los armazones de donantes naturales de válvulas bioprotésicas.
- Aunque algunos de los beneficios de la presente invención se han ilustrado por referencia al contexto de ingeniería de las HVR, se observará que la invención no se limita a la presente solicitud, y proporciona beneficios similares en
- 35 la formación de armazones tisulares para otros fines. Por ejemplo, el método de la presente invención puede producir armazones tisulares para otras aplicaciones, tales como injertos o cualquier otra aplicación como se ha discutido anteriormente, que imiten más fielmente las propiedades biológicas y mecánicas de las estructuras de armazón de donante, por ejemplo naturales.
- 40 Prabhakaran *et al.*: "Surface modified electrospun nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering", NANOTECHNOLOGY, IOP, BRISTOL, vol 19, n.º 45 (2008), página 455102 desvela armazones de nanofibra de PCL fabricados mediante un proceso de electrohilado y con su superficie modificada a través de tratamiento de plasma aéreo en una cámara de plasma.
- 45 Lee *et al.*: "The use of thermal treatment to enhance the mechanical properties of electrospun poly (ϵ -caprolactone) scaffolds", BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, vol 29, n.º 10, (2007), páginas 1422-1430 desvela un método para formar un armazón tisular que implica la unión de las fibras por vía térmica.
- Vaz *et al.*: "Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layering electrospinning technique"
- 50 ACTA BIOMATERIALIA, vol 1, n.º 5 (2005), páginas 575-582 desvela un método para formar un armazón tubular de dos capas.
- La presente invención intenta superar o mitigar las desventajas de las técnicas conocidas proporcionando nuevos
- 55 métodos para formar un armazón tisular.
- En consecuencia, la presente invención proporciona un método para formar un armazón tisular, método que comprende: proporcionar un aparato de electrohilado que comprende una hilera y un molde de armazón tisular separado de la hilera; electrohilado de un polímero de la hilera sobre el molde para formar el armazón tisular; y exponer el polímero a un plasma entre la hilera y el molde.
- 60 El proceso de electrohilado genera fibras de polímero de nano- o microescala que se depositan en un molde de armazón para formar un armazón tisular que tiene la forma deseada. La exposición de las fibras de polímero a cualquiera de un plasma caliente o frío altera la química superficial, carga superficial y energía superficial de las fibras para aumentar la humectabilidad de las fibras (o química superficial), aumentando de ese modo la adhesión,
- 65 unión, migración y proliferación celular del armazón, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por lo tanto el armazón de polímero tratado con plasma imita de forma más cercana a las propiedades biológicas de un armazón de donante natural. De

forma ventajosa, la presente invención elimina la necesidad de "sembrar previamente" el armazón de polímero con células antes de su implantación, tal como se requiere con los armazones de polímero de la técnica anterior. Además, el tratamiento con plasma es una técnica conveniente y de bajo coste para modificar las propiedades superficiales de las fibras de polímero sin influir en las propiedades mecánicas globales del armazón.

La etapa del tratamiento con plasma se produce entre la hilera y el molde, es decir, las fibras de polímero se tratan con plasma a medida que se forman durante el proceso de electrohilado, y antes de su deposición sobre el molde del armazón. Esto elimina la necesidad de una etapa de tratamiento con plasma separada después de que se haya formado el armazón. El tratamiento con plasma se produce en cualquier parte entre la hilera y el molde.

El aparato puede comprender adicionalmente un ánodo y un cátodo separado del ánodo, siendo el ánodo y el cátodo colocados entre la hilera y el molde. Esto se puede producir en cualquier disposición o conformación que no inhiba la deposición del polímero sobre el molde. Mediante la aplicación de un voltaje suficiente a cada uno del ánodo y el cátodo, se puede generar una región de plasma en el espacio entre los mismos. A continuación el polímero se somete a electrohilado a través de la región del plasma y sobre el molde. Se puede usar un intervalo de diferentes voltajes, dependiendo de la aplicación en particular. El voltaje puede ser constante, o el voltaje (y por lo tanto el plasma) se pueden aplicar de forma intermitente o 'pulsar' con el fin de ayudar a controlar los efectos del plasma en el material de polímero. En realizaciones preferentes el tratamiento con plasma se puede llevar a cabo usando gases atmosféricos. Sin embargo, se prevé que se pueden usar gases de procesamiento, tales como nitrógeno o amoníaco. Por ejemplo con el tratamiento se puede llevar a cabo en condiciones ambientales.

En algunas realizaciones, el método puede comprender adicionalmente las etapas de: electrohilado de una primera capa de polímero sobre el molde; y electrohilado de una segunda capa de polímero sobre el molde; en el que el molde gira durante el electrohilado de una de la primera y segunda capas, y en el que el molde no gira durante el electrohilado de la otra de la primera y segunda capas. Un método de este tipo produce una capa de fibras alineadas y una capa de fibras orientadas de forma aleatoria. De forma específica, el giro del molde durante el proceso de deposición genera una capa de fibras alineadas, mientras que un molde estacionario da como resultado una capa de fibras orientadas de forma aleatoria. Cada capa (aleatoria o alineada) podría tener densidades o grosores de la fibra, iguales o diferentes, controlados por el tiempo de reposición, con el fin de producir la función material/mecánica/biológica deseada.

Mediante la producción de un armazón tisular que tenga una capa de fibras alineadas y una capa de fibras orientadas de forma aleatoria, es posible generar un armazón que tiene propiedades mecánicas que se emparejan de forma más estrecha con las de un armazón de donante natural, por ejemplo, rigidez y resistencia. La tasa de degradación y las interacciones biológicas deseadas de un armazón implantado también se pueden controlar usando este método.

En realizaciones que combinan la etapa de tratamiento con plasma con la formación de un armazón de capas de tejido, el tratamiento con plasma se puede aplicar solamente a capas seleccionadas, o a todas las capas.

De acuerdo con la invención en cualquiera de sus aspectos o realizaciones que incluyen la formación de un armazón de capas de tejido, el polímero usado para cada una de la primera y segunda capas puede ser el mismo o puede ser diferente. Si fuera necesario se pueden añadir capas alternativas adicionales de fibras alineadas y de fibras orientadas de forma aleatoria para controlar las propiedades mecánicas y biológicas del armazón tisular.

En realizaciones de la invención, el método puede comprender adicionalmente una etapa de tratamiento térmico del armazón tisular electrohilado a una temperatura entre 20 °C y 200 °C para alterar al menos uno de la densidad del armazón, el tamaño de poro del armazón y la interconectividad del poro, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la etapa de tratamiento térmico se puede usar para hacer que el armazón tisular se contraiga sobre el molde, produciendo de ese modo una forma más precisa. Además, la etapa del tratamiento térmico se puede usar para alterar el tamaño del poro y la interconectividad del poro de modo que las propiedades biológicas del armazón se emparejan de forma más cercana a las del armazón de donante natural. Se observará que el tratamiento térmico calienta el armazón por encima de la temperatura ambiente, y por lo tanto la temperatura usada en el tratamiento térmico se debería seleccionar con el fin de proporcionar un efecto de calentamiento con respecto a la temperatura ambiente.

Preferentemente, el tratamiento térmico se lleva a cabo antes de retirar el armazón del molde.

En realizaciones de la invención de acuerdo con cualquiera de sus aspectos con el polímero usado para formar el armazón puede comprender al menos uno de ácido poliláctico, ácido poliláctico-co-glicólico, policaprolactona, y mezclas de los mismos. El polímero puede ser un biopolímero que tenga las propiedades biológicas apropiadas para la aplicación en particular. Se puede usar cualquier polímero adecuado que presente propiedades de biocompatibilidad apropiadas. En la técnica se conocen numerosos polímeros de este tipo. Por ejemplo, se puede usar un polímero aprobado para uso médico por un regulador.

En algunas realizaciones, el almacén tisular formado por la presente invención es un almacén de válvula cardíaca. Sin embargo, la persona con experiencia observará que la presente invención también se aplica a la formación de almacenes tisulares para otros usos, tales como injertos vasculares, parches de miocardio, injertos de vías respiratorias y traqueales, injertos de piel o de hecho cualquier tipo de injerto de tejido. Del mismo modo, la invención se podría usar para modificar por ingeniería y producir almacenes para la síntesis de cualquier órgano, parcial o completo. Los almacenes tisulares formados de acuerdo con cualquier aspecto de la presente invención se pueden usar para cualquier aplicación de ingeniería/aumento tisular tales como injertos vasculares, injertos intestinales, injertos traqueales, injertos de esófago, etc., en particular cuando se combinan con una endoprótesis vascular, como se describe a continuación. La presente invención se extiende a los usos de este tipo. Como los ejemplos ilustran a continuación, la presente invención se puede usar para obtener almacenes tisulares que posteriormente se van a poblar con una amplia gama de células, que varían por ejemplo de células de arteria coronaria a células dérmicas, o células madre. La presente invención se extiende a un almacén tisular electrohilado obtenido de acuerdo con los métodos de la invención en cualquiera de sus aspectos o realizaciones. El método se extiende adicionalmente a la etapa de cultivo de células en un almacén tisular electrohilado obtenido de acuerdo con la invención de cualquiera de sus aspectos organizacionales, y a un almacén tisular electrohilado obtenido de acuerdo con la invención en cualquiera de sus aspectos o realizaciones que tiene células unidas al mismo. Las células pueden ser de cualquier tipo, por ejemplo, de cualquiera de los tipos que se usan a modo de ejemplo en el presente documento.

En algunas realizaciones de la invención de acuerdo con cualquiera de sus aspectos, el método puede comprender adicionalmente una etapa de incorporación de un endoprótesis vascular en el almacén tisular. La endoprótesis vascular se podría montar sobre el molde antes de que el proceso de deposición comience a permitir que la endoprótesis vascular se incorpore en la estructura del almacén durante el proceso de deposición gráfica de polímero. La endoprótesis vascular también se podría unir mediante medios físicos, químicos, mecánicos o cualquier otro tipo de medio, dentro o fuera de la estructura del almacén con el fin de ayudar a que ésta funcione o para ayudar en la función estructural mecánica o estructural adicional después de que se haya formado el almacén o en cualquier etapa durante el proceso de deposición. La endoprótesis vascular se podría aplicar al almacén después de que se haya completado el proceso de deposición. En realizaciones en las que el almacén tisular es un almacén de válvula cardíaca, la endoprótesis vascular puede ayudar en la utilización del almacén de válvula cardíaca a través de un procedimiento quirúrgico transcáteter mínimamente invasivo.

En algunas realizaciones, la endoprótesis vascular es una endoprótesis vascular de metal. El metal puede ser acero inoxidable, titanio, aleación de cobalto y cromo, aleación de platino y cromo, nitinol, combinaciones de los mismos, o cualquier otro material de endoprótesis vascular usado de manera habitual o de manera no habitual. A continuación se describirán realizaciones de la invención a modo de ejemplo solamente y con referencia a las figuras en las que:

la Figura 1 muestra una disposición de electrohilado a modo de ejemplo de acuerdo con la presente invención; y la Figura 2 muestra moldes de válvula cardíaca a modo de ejemplo para formar almacenes de tejido para válvula cardíaca.

La Figura 3 es una imagen de un almacén electrohilado de policaprolactona (PCL);

las Figuras 4 y 5 ilustran el crecimiento de células de fibroblastos dérmicos primarios humanos (hDF) en un almacén electrohilado de PCL;

las Figuras 6 y 7 ilustran el crecimiento de células madre mesenquimales primarias humanas en un almacén electrohilado de PCL;

la Figura 8 ilustra el crecimiento de células de queratinocitos térmicos humanos (hDK) en un almacén electrohilado de PCL;

la Figura 9 muestra el crecimiento de células endoteliales de la vena umbilical primarias humanas (hUVE) en un almacén electrohilado de PCL;

la Figura 10 muestra el efecto del tratamiento con plasma en el crecimiento de células hDF.

la Figura 11 muestra el efecto del tratamiento con plasma en el crecimiento de células primarias del músculo liso de la arteria coronaria humana (hCASM).

La Figura 1 muestra un aparato de electrohilado que comprende una hilera 2 y un molde de almacén 4. En la realización que se muestra en la Figura 1, el molde es un molde de válvula tricúspide cardíaca, aunque se puede usar cualquier otra forma de válvula u otros moldes de almacén tisular dependiendo de la forma requerida. En la Figura 2 se muestran con más detalle moldes de válvula tricúspide cardíaca a modo de ejemplo.

La hilera 2 comprende una jeringa 6 que contiene una solución de polímero líquido, y una aguja 8 a través de la cual la solución de polímeros es descargar durante el proceso de electrohilado. Una fuente de alimentación 10 proporciona un sesgo eléctrico a la aguja 8 con el fin de cargar la solución de polímero a medida que se descarga a través de la aguja 8. De una manera conocida, las fuerzas electrostáticas dentro de la solución de polímero cargada superan la tensión superficial del líquido, haciendo que la solución se extienda en un flujo de fibras 12. Las fibras, en dimensión de nanofibra o microfibra, se depositan sobre un colector a tierra o sesgado en sentido opuesto. En la realización que se ilustra, el molde de almacén 4 también funciona como el colector.

El polímero se puede elegir según se desee y como se conoce en la técnica para producir un armazón tisular para una aplicación dada. Los polímeros de este tipo presentan propiedades de biocompatibilidad adecuadas. En la práctica, los polímeros que los reguladores han aprobado para uso médico pueden ser apropiados para la obtención del armazón tisular. Se ha encontrado que los procesos de electrohilado no tienen un impacto significativo en las propiedades generales del polímero. Se cree que la etapa de tratamiento con plasma adicional que se lleva a cabo de acuerdo con la invención no le restará valor, y puede aumentar las propiedades de biocompatibilidad de los polímeros.

El polímero usado puede ser sintético o puede ser un biopolímero, o puede incluir combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el polímero puede ser o puede comprender al menos uno de ácido poliláctico, ácido poliláctico-co-glicólico, policaprolactona, y mezclas de los mismos. La invención se ilustrará a continuación en relación a algunos ejemplos en los que el polímero es o comprende policaprolactona (PCL). Sin embargo, se observará que esto es simplemente un ejemplo preferente de un polímero que se puede usar.

El aparato puede comprender adicionalmente un motor 14 para girar el molde 4 durante el proceso de deposición. El giro del molde 4 alinea a las fibras depositadas, proporcionando de ese modo una capa más uniforme. En realizaciones sobre la invención, el armazón tisular se construye en capas, en las que el molde 4 se gira durante la deposición de algunas capas y no de otras, con el fin de proporcionar algunas capas que comprenden fibras alineadas y algunas capas que comprenden fibras orientadas de forma aleatoria. Para proporcionar un control óptimo con respecto a las propiedades mecánicas y biológicas del armazón, el armazón en capas se construye preferentemente usando capas alternativas de fibras alineadas y fibras orientadas de forma aleatoria. Las capas pueden tener los mismos o diferentes grosores y densidades.

Como se conoce en la técnica, el aparato de electrohilado se aloja en una cámara sellada adecuada, que está en comunicación con un ventilador de extracción para proporcionar un caudal del ventilador de extracción apropiado durante el proceso para, por ejemplo, eliminar los humos que emanan de un disolvente del polímero. El caudal del ventilador de extracción se puede seleccionar de forma apropiada teniendo en cuenta la morfología deseada del armazón como se sabe en la técnica. La carcasa permite el control sobre la temperatura, humedad y extracción a mantener durante el proceso de electrohilado.

En la realización que se ilustra, el aparato también incluye un ánodo 16 y un cátodo 18 que están separados de cada lado del flujo de fibras 12. Esta disposición de ánodo y cátodo se puede configurar de muchas formas diferentes en cualquier parte en el área entre el motor 14 y la jeringa 6, o en cualquier parte entre el molde 4 y la jeringa 6. El ánodo 16 y el cátodo 18 están sesgados por la fuente de alimentación 10 con el fin de formar una diferencia de potencial entre los mismos. Como alternativa, el ánodo y el cátodo se pueden sesgar usando una fuente de alimentación diferente.

Con un voltaje lo suficientemente elevado, el gas entre el ánodo y el cátodo se llega a ionizar, formando de ese modo una región de plasma 20 a través de la cual pasa el flujo de fibras 12. La potencia del plasma y el número de ciclos se pueden seleccionar de forma apropiada para cada armazón, y la persona con experiencia entenderá cómo optimizar estos parámetros para un armazón dado. Las potencias de funcionamiento habituales pueden estar entre 500-1000 W. El plasma altera la carga superficial de las fibras de polímero, aumentando de ese modo su humectabilidad y aumentando la adhesión, unión, migración y proliferación celulares en el armazón acabado. Como tal, un armazón formado a partir de fibras de polímero tratadas con plasma de acuerdo con la invención no requiere una "siembra previa" células antes del implante en el paciente. El tratamiento con plasma se puede llevar a cabo usando gases atmosféricos en condiciones ambientales, aunque se prevé que se podrían usar otros gases de procesamiento, por ejemplo nitrógeno o amoníaco.

En algunas realizaciones, el armazón obtenido de acuerdo con la invención en cualquiera de sus realizaciones se puede someter a un tratamiento térmico después de la deposición de las fibras sobre el molde 4. Por ejemplo, el armazón se puede calentar a una temperatura entre 20 °C y 200 °C. El tratamiento térmico puede ayudar a la contracción del armazón sobre el molde 4, asegurando de ese modo que el armazón asuma la forma correcta, según sea necesario. El tratamiento térmico también se puede usar para controlar las propiedades mecánicas y biológicas del armazón con el fin de un emparejamiento más próximo a las de un armazón de donante natural. Por ejemplo, el cargamento térmico se puede usar para alterar la densidad del armazón, así como el tamaño del poro y la interconectividad del poro.

Se entenderá que lo mencionado anteriormente es una descripción de algunas realizaciones preferentes y que son posibles muchas variaciones dentro del alcance de la invención, tal como se termina con las reivindicaciones. En particular, los métodos de la presente invención no se limitan a la producción de armazones tisulares en forma de armazones de válvula cardíaca. Los siguientes ejemplos se proporcionan solamente con fines ilustrativos y del mismo modo no se deberían considerar como limitantes del alcance de la invención, como se establece en las reivindicaciones.

Ejemplos

Formación de almacén de válvula cardíaca

5 En un ejemplo, se encontró que las siguientes condiciones eran particularmente adecuadas para la formación de un almacén tisular que se encuentra en forma de un almacén de válvula cardíaca de una dimensión dada, es decir, grosor.

10 El polímero usado fue un polímero de PCL (policaprolactona) obtenido en PURAC®. El polímero fue el copolímero de L-lactida/caprolactona PLC 7015 70/30 de PURASORB®, punto medio IV de 1,5 dl/g. La composición fue la que sigue a continuación;

Proporción de comonomero, L-lactida al 68 % en moles

Proporción de comonomero, Caprolactona al 32 % en moles

Contenido de agua máx de un 0,5 %

15 Contenido de estaño máx de 100 ppm

Disolvente residual máx de un 0,1 %

Monómero residual máx de un 0,5 %

20 Se entiende que la cantidad de metales pesados presentes podría cumplir con los requisitos de los métodos de ensayo de USP para la presencia de metales pesados si se sometieran a ensayo.

25 El polímero de PCL estaba presente a un 10 % en peso en volumen en un disolvente que comprendía un 90 % de cloroformo y un 10 % dimetilformamida (DMF). Se aplicó un voltaje de 10 kV a la hilera, y el caudal de polímero fue de 1 ml/hora. La temperatura ambiental dentro de la carcasa del aparato era de aproximadamente 23 grados Celsius. El calibre de la aguja era de 18 G. Un ventilador de extracción acoplado a la carcasa se ajustó a un nivel elevado para eliminar rápidamente los humos que se evaporaban de los disolventes.

Interacción del Almacén Celular

30 A modo de antecedentes, los ejemplos y se describen a continuación por referencia a las Figuras 3 a 9 se refieren a algún ensayo llevado a cabo para ilustrar las propiedades de los almacenes de tejido electrohilado y la interacción de diversas células con los mismos. Se demuestra que un almacén tisular biopolímero electrohilado es adecuado para el cultivo de diversos tipos de células, se pueden usar para una diversidad de aplicaciones de ingeniería tisular. En estos ensayos el tipo de célula relevante se cultivó en un modelo representativo de superficie de polímero electrohilado. Se estudió la interacción de la superficie con los siguientes tipos de células;

35 Células Madre Mesenquimales Primarias Humanas (MSC)

Células del Músculo Liso de Arteria Coronaria Primarias Humanas (HCASM)

Células Endoteliales de la Vena Umbilical Primarias Humanas (HUVEC)

Fibroblastos Dérmicos Primarios Humanos (HDF)

40 Línea de Células de Queratinocitos Dérmicos Humanos (HaCat).

La Figura 3 es una microfotografía de barrido electrónico que ilustra la estructura de fibras en una parte del almacén electrohilado de ensayo obtenido mediante electrohilado del polímero de policaprolactona (PCL). Como se ha discutido anteriormente, se trata de un polímero a modo de ejemplo que se puede usar de acuerdo con la invención. 45 Para mejorar el contraste, el polímero incluía 50 µg/ml de Rodamina B. En este almacén a modo de ejemplo, se encontró que el diámetro medio de la fibra era de 3,33 µm +/- 0,7 µm.

El electrohilado se llevó a cabo usando un aparato similar al de la Figura 1, el tratamiento con las manos e puso en práctica para obtener el almacén de ensayo de estos ejemplos de antecedentes. El molde no se giró durante el proceso de electrohilado. Las condiciones de electrohilado fueron las que se han usado a modo de ejemplo anteriormente en la sección con el título "Formación de Almacén de Válvula Cardíaca". Por lo tanto la composición usada estaba utilizando un 10 % en eso el volumen copolímero de L-lactida/caprolactona de PLC 7015 70/30 de PURASORB® del polímero de PCL, punto medio de IV de 1,5 dl/g, en un disolvente que comprendía un 90 % de cloroformo y un 10 % de dimetilformamida (DMF). Se aplicó un voltaje de 10 kV a la hilera, y el caudal de polímero fue de 1 ml/hora. La temperatura ambiental dentro de la carcasa del aparato era de aproximadamente 23 grados Celsius. El calibre de la aguja era de 18 G. Un ventilador de extracción acoplado a la carcasa se ajustó a un nivel elevado para eliminar rápidamente los humos que se evaporaban de los disolventes. El almacén obtenido no se sometió a tratamiento térmico antes de su población con células.

60 Las Figuras 4 a 9 ilustran los resultados de algunos ensayos en los que se hizo que diversas células crecieran en un almacén electrohilado de PCL formado obtenido y que se ilustra en la Figura 3. Estas Figuras ilustran la idoneidad de las fibras de PCL electrohiladas como un almacén tisular para diferentes tipos de células.

65 La Figura 4 muestra los resultados de un ensayo comparativo en el que las Células de Fibroblastos Dérmicos Primarios Humanos se cultivaron en el almacén electrohilado de PCL, y en una superficie de plástico de cultivo tisular (TCP) de control. Esto se consiguió usando un medio de crecimiento adecuado para cultivo celular como se

conoce en la técnica. El medio de crecimiento seleccionado para cualquiera de las células usadas a modo de ejemplo en el presente documento puede estar de acuerdo con las directrices del proveedor de las células en cuestión o en bibliografías publicadas relevantes como se conoce en la técnica. En este caso, se usó un "Medio de crecimiento normal", que era un DMEM (contenido de glucosa elevado) suplementado con un 10 % de suero bovino fetal y un 1 % de penicilina/estreptomicina.

Como se ha discutido anteriormente, el colorante Rodamina B se usó para mejorar la visibilidad del armazón electrohilado de PCL. Las microfotografías de la Figura 4 se realizaron usando una técnica de Microscopía de Barrido con Láser Confocal (CSLM). Para cada uno del armazón de control y electrohilado, las imágenes que se muestran incluyen imágenes de dos niveles de resolución tomados el día 1 del ensayo, y también el día 4 y el día 7. El día del ensayo se refiere al día con respecto al comienzo del ensayo, cuando el armazón o armazones se poblaron inicialmente con células, es decir, el comienzo del cultivo celular. El Día 1 se refiere a 24 horas desde el comienzo del ensayo, el día 4 se refiere a 96 horas, etc.

La Figura 5 incluye imágenes de las Células de Fibroblastos Dérmicos Primarios Humanos en el armazón de PCL en los días 1, 4 y 7, tomadas en su lugar cuando una técnica de Microscopía de Barrido Electrónico (SEM), y con tres niveles de aumento creciente para cada día. Esto ilustra el crecimiento celular que se produjo en el armazón de polímero electrohilado.

Las Figuras 6 y 7 son similares a las Figuras 4 y 5, en su lugar ilustran el crecimiento de Células Madre Mesenquimales Primarias Humanas en el armazón electrohilado de PCL. La Figura 6 muestra los resultados de un ensayo comparativo en el que las Células Madre Mesenquimales Primarias Humanas se cultivaron sobre el armazón electrohilado de PCL, y sobre un TCP de control. Esto se consiguió usando el mismo Medio de Crecimiento Normal usado con las células hDF, es decir, DMEM (contenido de glucosa elevado) suplementado con un 10 % de suero bovino fetal y un 1 % de penicilina/estreptomicina. El colorante Rodamina B se usó para mejorar la visibilidad del armazón electrohilado de PCL. Las microfotografías de la Figura 6 se realizaron usando una técnica de Microscopía de Barrido con Láser Confocal (CSLM). Para cada uno del armazón de control y electrohilado, las imágenes que se muestran incluyen imágenes de dos niveles de resolución tomados el día 1 del ensayo, y también el día 4 y el día 7.

La Figura 7 incluir imágenes de las Células Madre Mesenquimales Primarias Humanas en el armazón de PCL en el día 3 del ensayo, realizadas usando en su lugar una técnica de Microscopía de Barrido Electrónico (SEM), y con tres niveles de aumento creciente para cada día. Esto ilustra el crecimiento celular que se produjo en el armazón de polímero electrohilado.

La Figura 8 es similar a la Figura 5, pero en esta ocasión ilustra el crecimiento de Células de Queratinocitos Dérmicos Humanos en el armazón electrohilado de PCL, que se cultivaron en un medio de crecimiento adecuado para este tipo de células. En este caso, el medio de crecimiento fue DMEM (contenido de glucosa elevado) suplementado con L-glutamina 2 mM, un 10 % de suero bovino fetal y un 1 % de Penicilina/Estreptomicina. La Figura 8 incluye imágenes del armazón a tres niveles de aumento en cada uno de los días 1, 4 y 7 del ensayo, que ilustran el crecimiento de las células. Estas imágenes se realizaron usando una técnica de SEM. En este caso no se presentan imágenes de control.

La Figura 9 es similar a la Figura 7, pero en esta ocasión ilustra el crecimiento de Células Endoteliales de la Vena Umbilical Primarias Humanas en el armazón electrohilado de PCL cuando se cultivan usando un medio de crecimiento adecuado. En este caso, el medio de crecimiento fue DMEM (contenido de glucosa elevado) suplementado con un 10 % de suero bovino fetal, un 1 % de penicilina/estreptomicina y suplemento de crecimiento de células endoteliales (disponible en el mercado en Sigma-Aldrich, Reino Unido).

La Figura 9 incluye imágenes del armazón a tres niveles de aumento en el día 1 (después de 24 horas) que ilustran el crecimiento de las células. Estas imágenes se realizaron usando una técnica de SEM. En este caso no se presentan imágenes de control.

Este ensayo proporcionó evidencias de que los armazones electrohilados soportaban el cultivo de los tipos celulares usados en el estudio que tienen grandes aplicaciones en el área de ingeniería tisular cardiovascular y dérmica.

Efecto del Tratamiento con Plasma

Se realizaron algunos ejemplos adicionales para investigar el papel del plasma en la producción de armazones tisulares electrohilados.

En cada uno de estos ejemplos, se produjo un armazón de ensayo de control usando PCL electrohilado en las condiciones que se han descrito anteriormente en relación a la Figura 3. por lo tanto la composición usada tenía un 10 % en que es un volumen de copolímero de L-lactida/caprolactona de PLC 7015 70/30 de PURASORB®, punto medio IV de 1,5 dl/g en un disolvente que comprendía un 90 % de cloroformo y un 10 % de dimetilformamida (DMF). Se aplicó un voltaje de 10 kV a la hilera, y el caudal de polímero fue de 1 ml/hora. La temperatura ambiental dentro de la carcasa del aparato era de aproximadamente 23 grados Celsius. El caudal de la aguja era de 18 G. Un

ventilador de extracción acoplado a la carcasa se ajustó a un nivel elevado para eliminar rápidamente los humos de evaporación de los disolventes. Este armazón no se trató con plasma, y se hace referencia a él como el "armazón sin tratar".

5 Otro armazón se produjo de acuerdo con la invención en las mismas condiciones de hilado que se resaltan en relación con la obtención del armazón electrohilado de PCL de la Figura 3 mencionado anteriormente, pero en esta ocasión usando el aparato de tratamiento con plasma para tratar el copolímero de L-lactida/caprolactona de PLC 7015 70/30 electrohilado de PURASORB®, punto medio IV de 1,5 dl/g de fibras, en la región entre la hilera y el molde de armazón de ensayo. Por lo tanto una vez más la composición usada tenía un 10 % en que es un volumen del PLC 7015 de PURASORB® en un disolvente que comprendía un 90 % de cloroformo y un 10 % de dimetilformamida (DMF). Se aplicó un voltaje de 10 kV a la hilera, y el caudal de polímero fue de 1 ml/hora. La temperatura ambiental dentro de la carcasa del aparato era de aproximadamente 23 grados Celsius. El caudal de la aguja era de 18 G. Un ventilador de extracción acoplado a la carcasa se ajustó a un nivel elevado para eliminar rápidamente los humos de evaporación de los disolventes. El plasma utilizado en este caso era un plasma de gas atmosférico de descarga de barrera dieléctrica (DBD). El tratamiento con plasma se llevó a cabo a una potencia de 750 W durante 5 ciclos y en las condiciones atmosféricas ambientales. A este armazón se le denomina armazón "tratado con plasma".

20 Ni el armazón tratado con plasma ni el armazón sin tratar se sometieron a tratamiento térmico después de su formación en este ensayo y antes de ser poblados con células. Los armazones sin tratar y tratados se produjeron en condiciones idénticas distintas a las de un armazón que se trató con plasma, y el otro que no lo fue. El molde no se giró durante el proceso de electrohilado para cualquiera de los armazones de control o tratado con plasma

25 La Figura 10 ilustra los resultados cuando cada uno de los armazones electrohilados de PCL sin tratar (las barras de color más claro en la parte izquierda para cada día) y tratados con plasma (las barras de color más oscuro en la parte derecha para cada día) se poblaron con células de Fibroblastos Dérmicos Humanos Primarios (hDF) en un "Medio de crecimiento normal", siendo el DMEM (contenido de glucosa elevado) suplementado con un 10 % de suero bovino fetal y un 1 % de penicilina/estreptomicina.

30 La Figura 10 registra el número de células de las que se hizo recuento sobre cada uno de los armazones el día 1 y el día 3 medido a partir del inicio del proceso de cultivo celular. Se puede observar que el número de células de las que se encontró presencia en el armazón tratado era más elevado que el que se encontró en el armazón sin tratar. Se encontró que la diferencia era estadísticamente significativa, de modo que el valor de p era $< 0,05$ en el día 3.

35 La Figura 11 ilustra los resultados cuando cada uno de los armazones electrohilados de PCL sin tratar (las barras de color más claro en la parte izquierda para cada día) y tratados con plasma (las barras de color más oscuro en la parte derecha para cada día) se poblaron con células de Músculo Liso de la Arteria Coronaria Primarias Humanas (hCASM) en un medio de crecimiento adecuado. En este caso, el medio de crecimiento fue el mismo "Medio de crecimiento normal" que el usado para las células hDF que se describen en relación a la Figura 10. La Figura 11 registra el número de células de las que se hizo recuento sobre cada uno de los armazones el día 1 y el día 3 medido a partir del inicio del proceso de cultivo celular. Se puede observar que el número de células de las que se encontró presencia en el armazón tratado era más elevado que el que se encontró en el armazón sin tratar. Se encontró que la diferencia era estadísticamente significativa, de modo que el valor de p era $< 0,05$ en el día 3.

45 Los recuentos celulares que se informan en las Figuras 10 y 11 se obtuvieron usando una aplicación de recuento celular nuclear de modo que se supone que en cada célula está presente un núcleo. Las células se marcaron con 7AAD que se une al ácido nucleico presente en las células. Las imágenes de las células se realizaron a continuación usando un microscopio de fluorescencia y se calculó el número de células por campo de visión. Se tomaron entre 20 y 30 campos de visión por muestra. Estas imágenes se analizaron usando el software de análisis de imágenes Volocity® de Perkin-Elmer®. Por lo tanto se encontró que el tratamiento de los armazones con plasma producía números de células preferentes después de 3 días en cultivo tal como se ilustra mediante los recuentos celulares realizados para las células HDF y HCASM sometidas a ensayo.

REIVINDICACIONES

1. Un método para formar un armazón tisular, método que comprende:

- 5 proporcionar un aparato de electrohilado que comprende una hilera (2) y un molde de armazón tisular (4) separado de la hilera (2);
electrohilado de un polímero de la hilera (2) sobre el molde (4) para formar el armazón tisular;
y
10 exponer el polímero a un plasma;

caracterizado por que:

el polímero se expone al plasma entre la hilera (2) y el molde (4).

15 2. El método de la reivindicación 1, en el que el aparato comprende adicionalmente un ánodo (16) y un cátodo (18) separado del ánodo (16), el ánodo (16) y el cátodo (18) colocados entre la hilera (2) y el molde (4), método que comprende adicionalmente:

- 20 aplicar un voltaje a cada uno del ánodo (16) y del cátodo (18) para generar una región de plasma (20) entre los mismos; y
electrohilado del polímero a través de dicha región de plasma y sobre el molde (4).

3. El método de cualquier reivindicación precedente, que comprende adicionalmente las etapas de:

- 25 electrohilado de una primera capa de polímero sobre el molde (4); y
electrohilado de una segunda capa de polímero sobre el molde (4);
en el que el molde (4) gira durante el electrohilado de una de la primera y segunda capas,
y en el que el molde (4) no gira durante el electrohilado de la otra de la primera y segunda capas.

30 4. El método de la reivindicación 3, en el que solamente uno del primer y segundo polímeros se expone a dicho plasma.

5. El método de la reivindicación 3, en el que tanto el primer como el segundo polímeros se exponen a dicho plasma.

35 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que la primera y segunda capas de polímero comprenden el mismo polímero.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que la primera y segunda capas de polímero comprenden diferentes polímeros.

40 8. El método de cualquier reivindicación precedente, que comprende adicionalmente:

tratamiento térmico del armazón de tejido electrohilado a una temperatura entre 20 °C y 200 °C para alterar al menos uno de la densidad del armazón, el tamaño de poro del armazón y la interconectividad del poro.

45 9. El método de la reivindicación 8, que comprende adicionalmente la realización de la etapa de tratamiento térmico antes de retirar el armazón del molde (4).

50 10. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que el polímero comprende al menos uno de ácido poliláctico, ácido poliláctico-co-glicólico, policaprolactona, y mezclas de los mismos.

11. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que el armazón tisular es un armazón de válvula cardíaca.

55 12. El método de cualquier reivindicación precedente, que comprende adicionalmente una etapa de incorporación de una endoprótesis vascular en el armazón tisular, opcionalmente en el que la endoprótesis vascular es una endoprótesis vascular de metal.

60 13. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la etapa de exposición del polímero al plasma se lleva a cabo en condiciones ambientales.

14. El método de cualquier reivindicación precedente que comprende adicionalmente una etapa de cultivo de células en el armazón tisular.

65

15. El uso de un armazón tisular formado de acuerdo con el método de cualquier reivindicación precedente para cultivar células.

16. Un armazón tisular formado de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

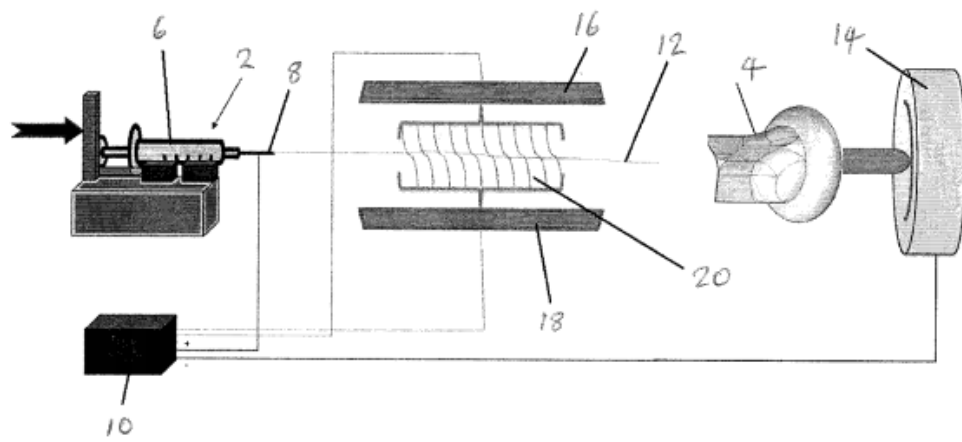


Figura 1

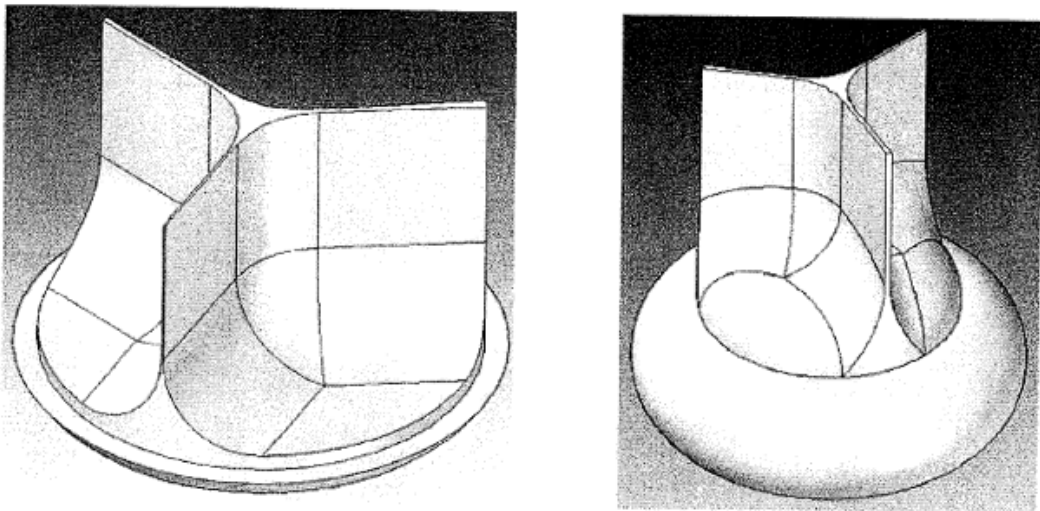


Figura 2

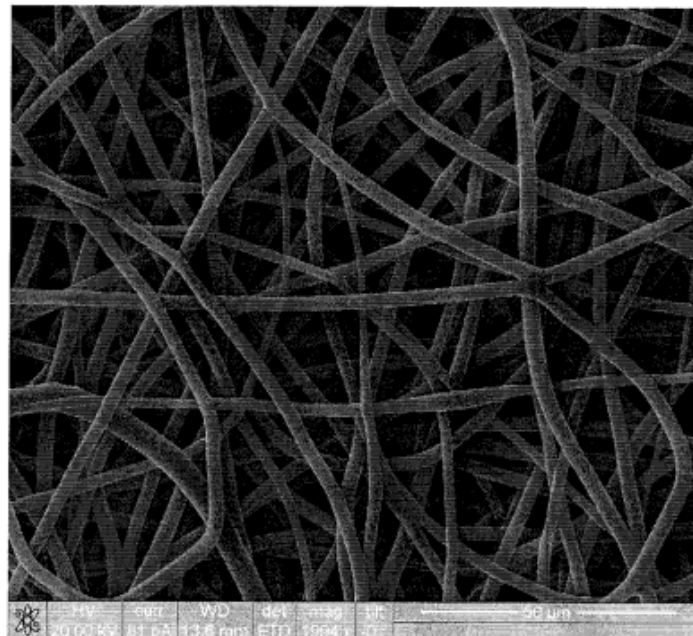


Figura 3

Células de Fibroblastos Dérmicos Humanos CSLM en PCL + Rodamina

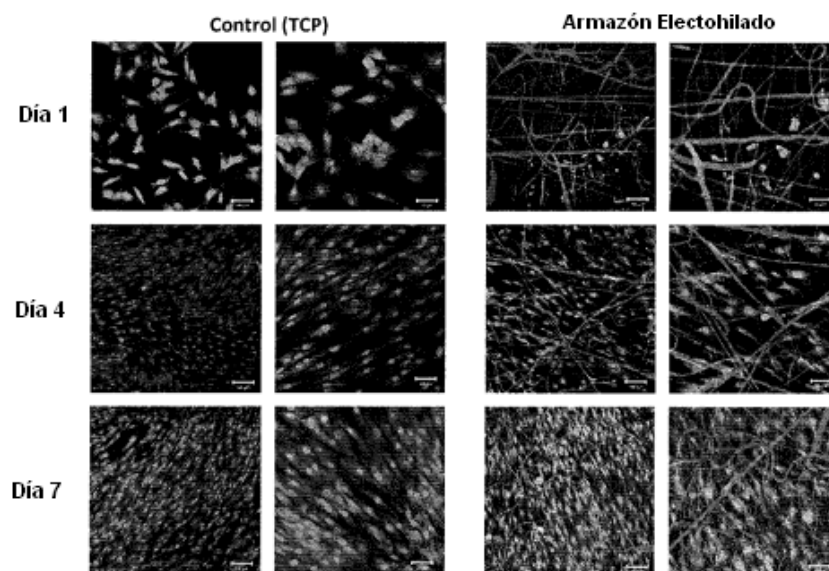


Figura 4

SEM - Células de Fibroblastos Dérmicos Humanos en PCL

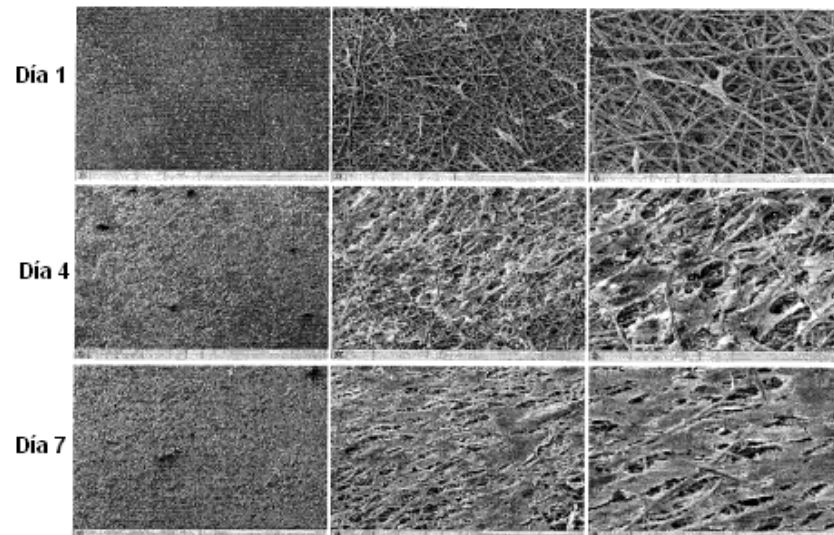


Figura 5

Células Madre Mesenquimales Humanas CSLM en PCL + Rodamina

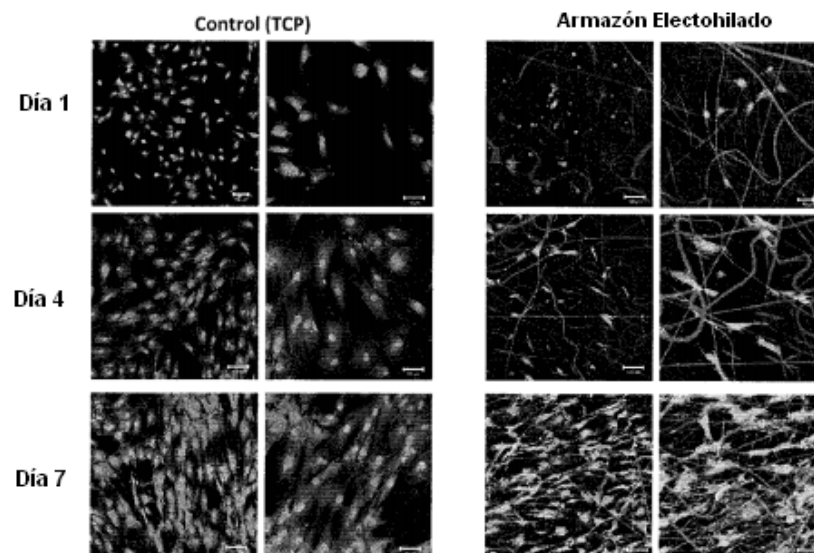


Figura 6

SEM - Células Madre Mesenquimales Humanas en PCL

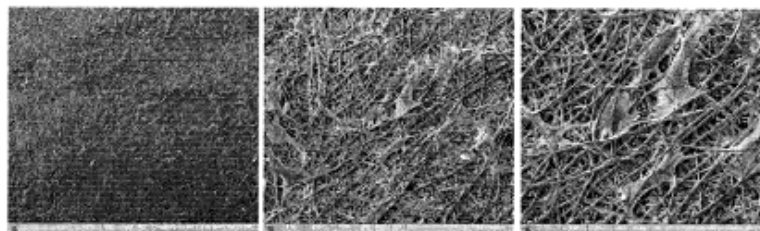


Figura 7

SEM - Células de Queratinocitos Dérmicos Humanos en PCL

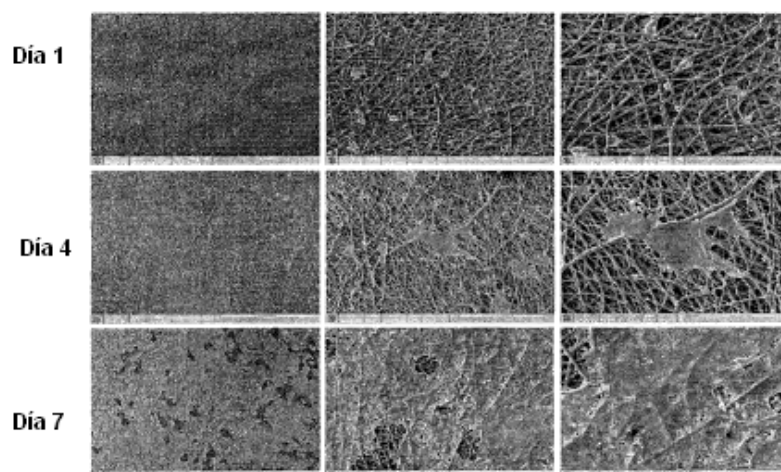


Figura 8

**SEM - Células Endoteliales de la Vena Umbilical Humanas
en PCL**

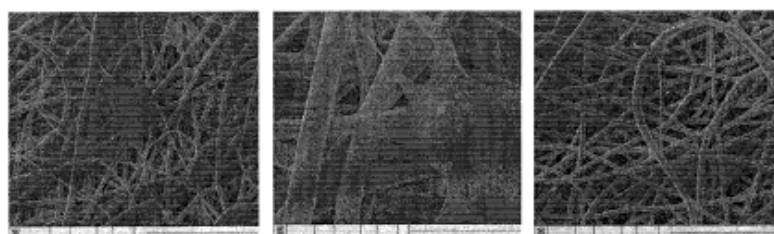


Figura 9

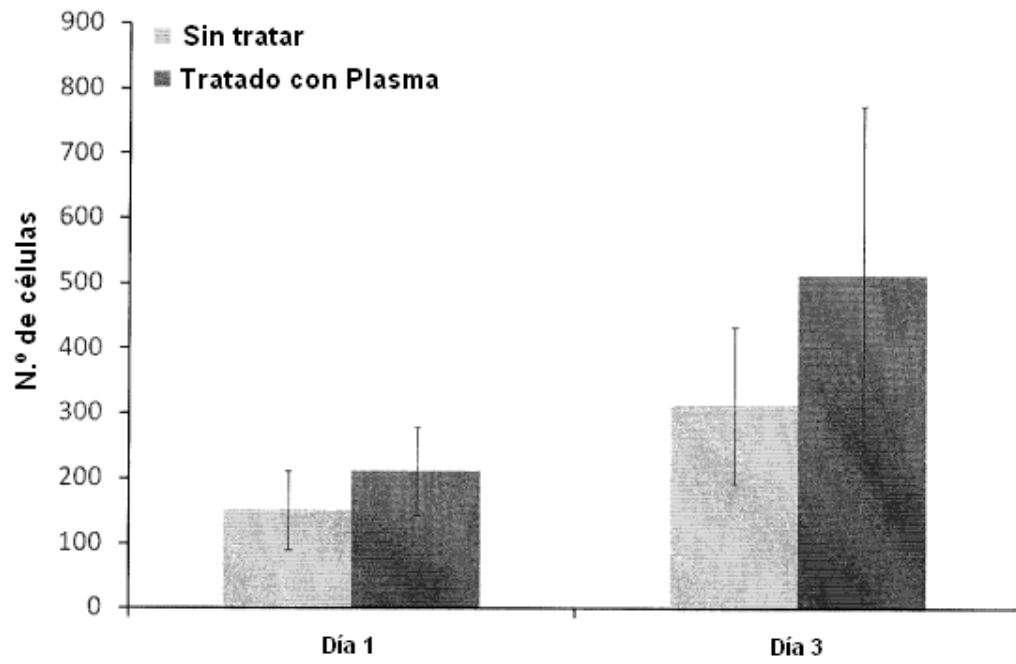


Figura 10

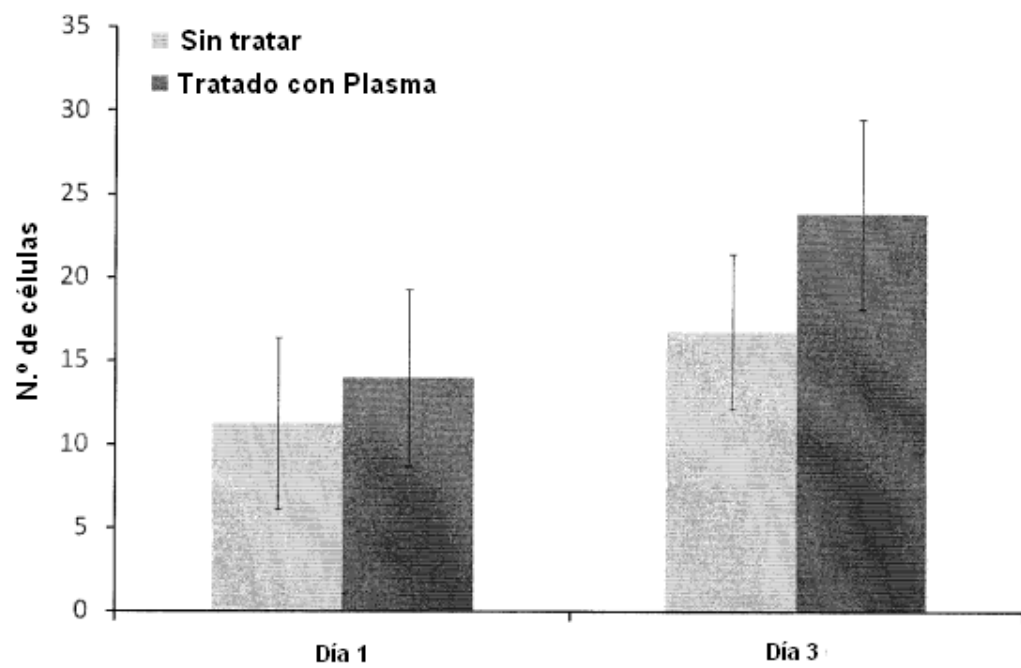


Figura 11