(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 686 777**

(51) Int. Cl.:

***A61L 27/54*** (2006.01)
***A61L 27/34*** (2006.01)
***A61L 27/38*** (2006.01)
***A61L 27/56*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2005** **E 05257209 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018** **EP 1676591**

(54) Título: **Composiciones y métodos para crear un ambiente vascularizado para trasplante celular**

(30) Prioridad:

**24.11.2004 US 630633 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**19.10.2018**

(73) Titular/es:

**LIFESCAN, INC. (100.0%)**
**965 Chesterbrook Boulevard**
**Wayne, PA 19087, US**

(72) Inventor/es:

**REZANIA, ALIREZA;**
**XU, JEAN y**
**GHABRIAL, RAGAE**

(74) Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 686 777 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

Composiciones y métodos para crear un ambiente vascularizado para trasplante celular

### Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente a dispositivos biocompatibles para soportar e implantar células en un mamífero donde el dispositivo se ha incorporado en al menos un agente farmacéutico. En particular, el agente farmacéutico es capaz de aumentar la cantidad de proteína alfa del factor 1 inducible por hipoxia en células en el sitio del implante.

### Antecedentes de la invención

Existe la necesidad de desarrollar dispositivos para trasplantar células, organoides, órganos o tejido para crear órganos artificiales cuando la función del propio órgano del paciente se pierde o altera debido a enfermedad o lesión. Tales dispositivos son capaces de enviar las células trasplantadas a un sitio específico dentro del receptor. Las aplicaciones terapéuticas para las células trasplantadas puede incluir, por ejemplo, hepatocitos para el tratamiento de insuficiencia hepática, células cromafines para dolor crónico, células que producen factores de coagulación para hemofilia, islotes o células que producen insulina para el tratamiento de diabetes, células que producen factores de crecimiento nervioso para enfermedad neurodegenerativa como enfermedad de Parkinson o Alzheimer y células cardiovasculares para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

Muchos han intentado superar las limitaciones de trasplante celular creando una matriz o soporte tridimensional, al que las células pueden unirse *in vitro*. Sin embargo, las propiedades físicas del soporte limitan la difusión de oxígeno y nutrientes a las células, debido a la falta de suficiente vasculatura para transportar tales nutrientes y para retirar residuos, dando como resultado un ambiente isquémico para las células trasplantadas. Como consecuencia, las células mueren rápidamente o dejan de funcionar una vez que se implantan en el receptor.

Los intentos previos se han centrado en la incorporación de factores del crecimiento en el soporte. Estos factores promueven una respuesta angiogénica para mejorar la supervivencia del implante. Esta técnica ha demostrado una efectividad marginal solamente cuando combinaciones de factores del crecimiento, como factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP-BB) más factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV) o factor de crecimiento fibroblástico básico (FCFb) se envían a una construcción tridimensional.

EP 1 466 633 desvela andamiajes implantables biocompatibles que contienen una matriz polimérica porosa biocompatible, una alfombra fibrosa porosa biocompatible encapsulada por y dispuesta dentro de dicha matriz polimérica, y una pluralidad de células de mamífero sembradas en dicho andamiaje de tejido.

El principal reto en la ingeniería de tejidos es que la recapitulación de la respuesta de angiogénesis normal requerida para la formación de nuevos vasos es muy difícil de conseguir porque la naturaleza, dosis y secuencia precisas de factores de crecimiento necesarios para la formación estable están pobremente definidas.

La hipoxia es un factor crítico en la inducción de angiogénesis. Una respuesta temprana a hipoxia de tejidos es la inducción de factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1), un activador transcripcional PAS (Per/Arn/Sim) básico de hélice-giro-hélice (bHLH) que media los cambios en la expresión de genes en respuesta a los cambios en la concentración de oxígeno celular (Wang et al. (1995), PNAS 92, 5510-5514). HIF-1 es un heterodímero que contiene una subunidad alfa regulada por oxígeno (HIF-1α – numero de acceso GenBank AAP88778) y una subunidad beta expresada de manera constitutiva (HIF-1β- número de acceso GenBank AAH60838), también conocido como transportador de receptor nuclear de hidrocarburo de arilo (ARNT). Los niveles de proteína HIF-1α se elevan en la mayoría de las células en respuesta a hipoxia y HIF-1α se induce in vivo cuando los animales se someten a anemia o hipoxia. Los niveles de HIF-1α se elevan a las pocas horas después de la aparición de hipoxia y vuelven a su punto de referencia bajo condiciones hipóxicas continuadas.

HIF-1 se ha implicado en numerosos procesos celulares y de desarrollo, incluyendo proliferación celular, angiogénesis y arresto de ciclo celular. En células oxigenadas (normóxicas), las subunidades HIF-1α se degradan rápidamente por un mecanismo que incluye la ubiquitinación por el complejo de ligasa E3 supresor de tumor Von Hippel-Lindau (pVHL). Bajo condiciones hipóxicas, HIF-1α no se degrada, y un complejo activo HIF-1α/β se acumula en el núcleo y activa la expresión de varios genes que incluyen enzimas glicolíticas, transportador de glucosa (GLUT)-1, eritropoyetina (EPO) y factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV). HIF-1α también se asociado con isquemia miocárdica aguda y infarto precoz, hipertensión pulmonar e inflamación. Aunque HIF-1α se ha asociado con crecimiento tumoral y metástasis, hay pocas indicaciones de que HIF-1 esté directamente involucrado en tumorogénesis. El pre-acondicionamiento hipóxico, donde un órgano diana se somete a breves periodos de hipoxia, ha demostrado proteger tanto el miocardio como el cerebro contra lesión hipóxica-isquémica. La estabilización de HIF-1α está muy asociada con isquemia y se induce por el pre-acondicionamiento. Los resultados del trabajo aquí

descrito indican que el aumento de niveles de HIF-1α en células en el sitio del trasplante es efectivo en el aumento de vascularización del sitio trasplantado y en el aumento de la supervivencia de las células trasplantadas.

La construcción de la presente invención proporciona preferentemente un soporte biodegradable cargado con agentes deseables, diseñados para aumentar la vasculatura que rodea la construcción que lleva a la función mejorada de la construcción.

**Resumen de la invención**

La invención actual evita los problemas con los que se encontraban los investigadores en el pasado al usar un dispositivo para crear un sitio de trasplante vascularizado dentro de un mamífero que mejora la supervivencia de células terapéuticas. La invención actual proporciona un implante de acuerdo con la reivindicación 1, para el trasplante de células, tejidos, organoides y órganos para el tratamiento efectivo de una enfermedad o lesión. El implante comprende un soporte poroso, que contiene un agente o agentes farmacéuticos que están diseñados para crear una base vascularizada alrededor y dentro del implante. La base vascularizada puede aumentar de manera significativa la supervivencia de células, tejidos, organoides u órganos trasplantados que están contenidos dentro del implante. Los agentes farmacéuticos incluyen factores que estabilizan la subunidad alfa de HIF (factor α inducible por hipoxia). La expresión “estabilizar la subunidad alfa de HIF” incluye aumentar la expresión de la proteína HIF-1α así como prevenir la degradación de ARN que codifica HIF-1α o la degradación de la propia HIF-1α. Una clase de agentes que pueden estabilizar HIF-1α es los inhibidores de prolil-hidroxilasas, la enzima implicada en la degradación de HIF-1α.

En una realización alternativa, el implante de la presente invención puede además incorporar compuestos farmacéuticos que reducen la inflamación, reducen la fibrosis y/o mejoran la angiogénesis.

La invención actual toma en consideración el único medio que necesita establecerse para preservar la viabilidad funcional ectópica de células o tejidos trasplantados que se incorporan opcionalmente en el implante estableciendo un medio altamente vascularizado en un sitio que es fácilmente accesible, preferentemente mediante técnicas mínimamente invasivas. Además, permite que la vasculatura se ponga en cercana proximidad a las células o tejido trasplantado al proporcionar un acceso óptimo para oxígeno y nutrientes requeridos para mantener la viabilidad funcional durante periodos prolongados de tiempo.

El soporte del implante de la presente invención se construye fuera de una alfombra porosa encapsulada por y dispuesta dentro de una espuma. El soporte contiene una pluralidad de espacios interconectados dentro de las paredes del soporte. Estos espacios forman un volumen donde las células terapéuticas pueden colocarse y permiten el crecimiento de la vasculatura en el soporte. El soporte es preferentemente biodegradable. Los polímeros biodegradables se parten fácilmente con el paso del tiempo *in vivo* y los segmentos biodegradables no provocan una reacción crónica de cuerpo extraño en el mamífero receptor.

El implante de la presente invención puede tener cualquier forma, siempre y cuando tenga el tamaño suficiente para promover la vascularización e incorporar el número deseado de células terapéuticas que se incorporan opcionalmente en el implante. Los soportes de los implantes de la presente invención pueden fabricarse mediante cualquier método conocidos por aquellos expertos en la técnica, como, por ejemplo, moldeo, extrusión, tejido y similares.

El soporte se siembra con células o tejido antes del trasplante.

La vascularización de un sitio dentro de un mamífero se promueve usando los implantes aquí desvelados. Al menos un agente farmacéutico que es capaz de aumentar la proteína celular HIF-1α o reducir la degradación celular HIF-1α se incorpora en el soporte usado para construir el implante. La incorporación se consigue añadiendo una cantidad efectiva de al menos un agente farmacéutico a las materias primas del soporte y posteriormente fabricando el soporte. En una realización alternativa, el soporte se fabrica y después se cubre con una cantidad efectiva de al menos un agente farmacéutico.

La invención también proporciona un implante de la presente invención o un implante producido usando el método de la presente invención para uso en la fomentación de vascularización en un paciente al implantar el soporte en un sitio dentro de un paciente.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención está dirigida al implante biocompatible de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un soporte y al menos un agente farmacéutico. El, al menos, un agente farmacéutico en el implante es capaz de aumentar los niveles de proteína celular HIF-1α, o de prevenir la degradación de niveles de proteína celular HIF-1α, en o alrededor del sitio del implante. Los implantes de la presente invención están incorporados de

células terapéuticas, y el agente farmacéutico promueve la supervivencia de células de mamíferos mediante su habilidad para estimular la vascularización en o alrededor del implante.

Se proporciona un implante biocompatible que está compuesto por un soporte poroso, cargado con una cantidad efectiva de al menos un agente farmacéutico que promueve la vascularización del implante y promueve la supervivencia de células, organoides y órganos que se incorporan en el soporte.

El término “soporte” como aquí se usa se refiere a una arquitectura tridimensional que es capaz de soportar células sobre la superficie o dentro de la arquitectura.

El término “poroso” como aquí se usa se refiere a una pluralidad de espacios interconectados dentro del soporte que permiten la distribución de nutrientes y células dentro del soporte.

El término “biocompatible” se refiere a la habilidad del soporte para residir dentro de un mamífero sin inducir efectos tóxicos o indeseables en ese mamífero.

Por “biodegradable” o “absorbible” se entiende que el dispositivos se degradará o absorberá gradualmente mediante procesos biológicos naturales después de que el dispositivo se haya administrado a un sitio de interés dentro del mamífero.

El término “implantable” como aquí se usa se refiere a un implante que es adecuado en diseño, sustancia y uso permitiendo así que se posicione de manera segura en un mamífero. El implante de la presente invención puede implantase en una variedad de localizaciones en un mamífero, particularmente cuando se desea una vascularización mejorada, aumentada o nueva.

El término “matriz” como aquí se usa se refiere al material que comprende el componente sólido del soporte.

Los términos “célula terapéutica” se refieren a cualquiera célula, organoide o tejido que se emplea como un tratamiento efectivo de enfermedad o lesión.

La expresión “agente farmacéutico que aumenta los niveles de proteína celular HIF-1α” incluye agentes químicos, factores del crecimiento, proteínas de matriz extracelular y fragmentos peptídicos biológicamente relevantes que aumentan los niveles de proteína celular HIF-1α en células dentro del implante o alrededor del implante promoviendo de esta manera la vascularización en el sitio del implante en un mamífero o en áreas adyacentes.

En una realización preferente, el, al menos, un agente farmacéutico que aumenta los niveles de proteína celular HIF-1α incluye PR-39 (un péptido derivado de macrófago de aminoácido 39) como, por ejemplo, se desvela en WO0130368, hidrazonas, como, por ejemplo, se desvela en US6660737, agentes anti-fibróticos, como se desvela en WO2003049686 que inhiben 2-oxoglutarata dioxigenasa, inhibidores de prolil-hidroxilasa, como se desvela en WO2003080566, combinaciones de los factores anteriores u otros agentes capaces de prolongar la vida media de células HIF-1α dentro de o inmediatamente alrededor del sitio del implante.

En una realización especialmente preferente, el inhibidor de prolil-hidroxilasa es etil-3, 4-hidroxibenzoato o alternativamente 2,4-dietilpiridina dicarboxilato.

**El soporte**

Un experto en la técnica apreciará que la selección de un material adecuado para formar los soportes de la presente invención depende de varios factores. Los factores más relevantes en la selección del material incluyen la cinética de bioabsorción (o biodegradación); la actuación mecánica *in vivo*; la respuesta celular al material en términos de unión, proliferación, migración y diferenciación celular; y biocompatibilidad. Otros factores relevantes, que hasta determinado punto dictan el comportamiento *in vitro* e *in vivo* del material, incluyen la composición química, la distribución espacial de los componentes, el peso molecular, el grado de cristalinidad y el contenido de monómeros en el caso de materiales poliméricos. Las propiedades de la superficie de los materiales también pueden optimizarse para conseguir la hidrofobicidad deseada. Los materiales sintéticos y naturales ejemplares que pueden emplearse en la construcción de los soportes de la presente invención se desvelan en US 5.770.417, US 6.022.743, US 5.567.612, US 5.759.830, US 6.626.950, US 6.534.084, US 6.306.424, US 6.365.149, USO 6.599.323, US 6.656.488 y US 6.333.029. Los métodos ejemplares para construir los polímeros usados en el dispositivo de la presente invención se desvelan en la solicitud de patente de Estados Unidos US20040062753 A1 y la patente de Estados Unidos Nº 4.557.264.

El soporte es poroso y contiene al menos un agente farmacéutico. El soporte está compuesto por fibras biocompatibles (el componente fibroso) encapsuladas por y dispuestas dentro de una matriz polimérica

biocompatible poroso (el componente espuma). El soporte también incluye, al menos, un agente farmacéutico. La porosidad del soporte puede variar dependiendo de la aplicación y del sitio de implantación. La porosidad puede controlarse mediante una variedad de medios tales como la densidad de las fibras en el componente no tejido o la concentración o cantidad de solución polimérica usada en la formación del componente de espuma. Las células pueden unirse tanto a las fibras como a las paredes de la matriz que encapsula las fibras. Las paredes de la matriz incorporan uno o más agentes farmacéuticos que se liberan localmente en el sito de implantación en una dosis efectiva para promover la vascularización del dispositivo implantado y para promover la supervivencia de las células incorporadas.

Los soportes de la presente invención pueden ser biodegradables o no biodegradables. En el caso de un soporte no biodegradable, ambos o uno de las fibras y la matriz que encapsula las fibras pueden estar hechos de materiales no biodegradables, por ejemplo, polímeros no biodegradables que incluyen, aunque no se limitan a, polietileno, alcohol polivinílico (PVA), polimetilmetacrilato (PMMA), silicona, óxido de polietileno (PEO), glicol de polietileno (PEG) y poliuretanos.

Preferentemente, en cambio, los soportes de la presente invención son biodegradables. Ejemplos de materiales biodegradables adecuados incluyen polímeros sintéticos biodegradables como poliésteres alifáticos, oxalatos de polialquileno, poliamidas, policarbonatos, poliortoésteres, polioxaésteres, poliamidoésteres, polianhidridos y polifosfacenos.

Los poliésteres alifáticos están entre los polímeros biodegradables preferentes para uso en la fabricación de los soportes de acuerdo con la presente invención. Los poliésteres alifáticos pueden ser homopolímeros o copolímeros (aleatorios, en bloque, segmentados, bloques afilados, injerto, tribloque, etc.) que tienen una estructura lineal, ramificada o en estrella. Los monómeros adecuados para hacer homopolímeros y copolímeros alifáticos incluyen, aunque no se limitan a, ácido láctico, láctido (incluyendo L-, D-, meso y mezclas L, D), ácido glicólico, glicólido, ε-caprolactona, p-dioxanona, carbonato de trimetileno, polioxaésteres, δ-valerolactona, β-butirolactona, ε-decalactona, 2,5-diketomorfolina, pivalolactona, α,α-dietilpropiolactona, carbonato de etileno, oxalato de etileno, 3-metil-2, 4-dioxano-2, 5-diona, 3,3-dietil-1, 4-dioxan-2, 5-diona, γ-butirolactona, 1,4-dioxepan-2-ona, 1,5-dioxepan-2-ona, 6,6-dimetil-dioxeapn-2-ona y 6,8-dioxabiciclolactona-7-ona. Estos polímeros pueden sintetizarse fácilmente por parte de aquellos entrenados en la técnica o comprarse en el mercado a varios proveedores, como Birmingham Polymers, Inc (Birmingham, Al).

Los copolímeros elastoméricos son particularmente útiles en la fabricación de soportes de la presente invención. Los soportes elastoméricos son menos abrasivos en el sitio de implantación en comparación con soportes rígidos no elastoméricos y pueden manipularse de manera más sencillas en el sitio quirúrgico. Tales polímeros se muestran en la patente de Estados Unidos Nº 6.365.1449. Esto es particularmente ventajoso cuando se coloca un soporte en un sitio tal como una funda subcutánea, omento se envuelve el soporte alrededor de un órgano tal como el páncreas. Los polímeros elastoméricos adecuados incluyen aquellos con una viscosidad inherente en el rango de 1,2 dL/g a 4 dL/g, más preferentemente de 1,2 dL/g a 2 dL/g, y más preferentemente de 1,4 dL/g a 2 dL/g, como se determina a 25ºC en una solución de 0,1 gramo por decilitro (g/dL) de polímero en hexafluoroisopropanol (HFIP). Además, los elastómeros adecuados muestran un alto porcentaje de estiramiento y un módulo bajo, mientras poseen buena fuerza de tensión y buenas características de recuperación.

En una realización preferente donde se usan copolímeros elastoméricos, el elastómero con el cual está formado el soporte muestra preferentemente un estiramiento porcentual mayor que el 200 por ciento, y más preferentemente mayor que 500 por ciento. Además de estas propiedades de estiramiento y módulo, los elastómeros adecuados deberían tener una fuerza de tensión superior a 3,5 MPA (500 psi.), preferentemente superior a 6,9 MPa (1.000 psi.); y una resistencia al desgarro superior a 8,9 kg/cm (50 libras/pulgada), preferentemente superior a 14,3 kg/cm (80 libras/pulgada).

Los elastómeros biodegradables biocompatibles ejemplares incluyen, aunque no se limitan a, copolímeros elastoméricos de ε-caprolactona y glicólido con una proporción molar de ε-caprolactona con glicólido de 35/65 a 65/35, más preferentemente de 35/65 a 45/55; copolímeros elastoméricos de ε-caprolactona y láctido donde la proporción molar de ε-caprolactona con láctido es de 35/65 a 65/35 y más preferentemente de 35/65 a 45/55; copolímeros elastoméricos de láctido y glicólido donde la proporción molar de láctido con glicólido es de 95/5 a 85/15; copolímeros elastoméricos de p-dioxanona y láctido donde la proporción molar de p-dioxanona con láctido es de 40/60 a 60/40; copolímeros elastoméricos de ε-caprolactona y p-dioxanona donde la proporción molar de ε-caprolactona con p-dioxanona es de 30/70 a 70/30; copolímeros elastoméricos de p-dioxanona y carbonato de trimetileno donde la proporción molar de p-dioxanona con carbonato de trimetileno es de 30/70 a 70/30; copolímeros elastoméricos de carbonato de trimetileno y glicólido donde la proporción molar de carbonato de trimetileno con glicólido es de 30/70 a 70/30; copolímeros elastoméricos de carbonato de trimetileno y láctido donde la proporción molar de carbonato de trimetileno con láctido es de 30/70 a 70/30 o mezclas de los mismos. Los polímeros elastoméricos ejemplares y métodos para formar soportes a partir de polímeros elastoméricos se desvelan en US 6.534.084; US 6.365.149; US 6 423.252 y US 6.355.699.

En otra realización, es deseable usar mezclas de polímero para formar estructuras que pasan de una composición a otra composición en una arquitectura de tipo gradiente. Los soportes compuestos que tienen esta arquitectura de tipo gradiente son particularmente ventajosos en aplicaciones de ingeniería de tejidos para reparar o regenerar la estructura de tejido que ocurre de manera natural. Por ejemplo, mezclando un copolímero elastomérico de ε-caprolactona y glicólido con un copolímero elástico de ε-caprolactona y láctido (por ejemplo, con una proporción molar de 5/95) puede formarse un soporte que pasa de un material esponjoso más suave a un material más duro y rígido. Claramente, un experto en la técnica que tiene el beneficio de esta divulgación apreciará que pueden usarse otras mezclas de polímeros para efectos similares de gradientes, o para proporcionar gradientes diferentes, por ejemplo, perfiles diferentes de degradación, perfiles de respuesta a esfuerzos o diferentes grados de elasticidad. Tales estructuras se han desvelado en WO02051463.

Con un soporte compuesto, las fibras encapsuladas por una matriz porosa se organizan como alfombras no tejidas. Preferentemente, las fibras tienen forma de una alfombra fibrosa no tejida. Las técnicas de fabricación conocidas en colocación húmeda y colocación seca pueden usarse para preparar la alfombra fibrosa no tejida del soporte compuesto de la presente invención (“Textiles no tejidos”, por Radko Krcma, Textile Trade Press, Manchester, Reino Unido, 1967).

La matriz porosa del soporte como la aquí descrita tiene preferentemente la forma de una espuma polimérica. Un soporte de espuma o la matriz de espuma de un soporte compuesto puede estar formada mediante una variedad de técnicas bien conocidas por aquellos que tiene experiencia en la técnica. Por ejemplo, los materiales poliméricos iniciales pueden formarse mediante liofilización, formación de espuma con disolvente supercrítico, extracción con inyección de gas, moldeo con inyección de gas o fundición con un material extraíble (por ejemplo, sales, azúcares o materiales adecuados similares).

En una realización, el soporte compuesto de la presente invención se hace usando una técnica de separación en fases polímero-disolvente, tal como liofilización. Las etapas implicadas en la preparación de estas espumas incluyen la elección de disolventes apropiados para la liofilización de polímeros y la preparación de una solución homogénea del polímero en el disolvente. La solución de polímero se somete después a un ciclo de congelación y de secado en vacío. La etapa de congelación separa en fases la solución de polímero y la etapa de secado en vacío retira el disolvente mediante sublimación y/o secado, dejando así una matriz polimérica porosa, o una espuma porosa interconectada con céulas abiertas.

Los disolventes adecuados disuelven el polímero biodegradable para formar la matriz de espuma, y mantienen las fibras (por ejemplo, de una alfombra no tejida) del soporte compuesto. Los disolventes apropiados que se combinarán con el polímero apropiado incluyen, aunque no se limitan a, hexafluoroisopropanol (HFIP), éteres cíclicos (por ejemplo, tetrahidrofurano (THF) y fluoruro dimetileno (DMF)), acetona, metiletilacetona (MEK), 1,4-dioxano, dimetilcarbonato, benceno, tolueno, N-metil pirrolidona, Dimetilformadida, cloroformo y mezclas de los mismos. Un experto en la técnica podría hacer las parejas apropiadas. Entre setos disolventes, un disolvente preferente es 2,4-dioxano. Una solución homogénea del polímero en el disolvente se prepara usando técnicas estándares.

La concentración de polímero aplicable o la cantidad de disolvente que se usará puede variar, dependiendo del polímero y disolvente usado. En general, la cantidad de polímero en la solución está en el rango de 0,01% a aproximadamente 90% por peso y, preferentemente, está en el rango de 0,1% a 30% por peso, dependiendo de factores tales como la solubilidad del polímero en un disolvente dado y las propiedades finales deseadas en el soporte de espuma que incluyen el perfil de liberación del agente farmacéutico añadido.

En otra realización más de la invención, el componente de espuma o el componente fibroso de un soporte pueden enlazarse químicamente de manera cruzada o combinarse con hidrogeles, tales como glicol de polietileno y poli (N-isopropilacrilamida).

En otra realización más, el soporte de la presente invención puede combinarse con un biopolímero seleccionado del grupo consistente en ácido hialurónico, colágeno, colágeno recombinante, celulosa, elastina, alginatos, sulfato de condroitina, quitosano y submucosa del intestino delgado (SID).

Los soportes de la presente invención incluyen preferentemente poros interconectados o vacíos, que facilitan la incorporación de células al soporte, así como el transporte de nutrientes y/o expansión de células dentro del soporte. Los poros interconectados tienen un tamaño preferentemente en el rango de 50 a 1000 µm (micrones), preferentemente de 50 a 400 µm (micrones), y preferentemente constituyen del 70 al 95 por ciento del volumen total del soporte. El rango del tamaño del poro en el soporte puede manipularse modificando las etapas del proceso durante la preparación del soporte.

Los materiales de soporte se han estudiado extensamente como plantillas de tejido, conductos, barreras y depósitos útiles para la reparación de tejidos. En particular, los materiales sintéticos y naturales en forma de espumas, esponjas, geles, hidrogeles, textiles y estructuras no tejidas se han usado *in vitro* e *in vivo* para reconstruir

o regenerar tejido biológico, así como para administrar agentes quimiotácticos para inducir crecimiento de tejido, como los métodos desvelados en US 5.770.417, US 6.022.743, US 5.567.612, US 5.759.830, US 6.626.950, US 6.534.084, US 6.306.424, US 6.365.149, US 6.599.323, US 6.656.488 y US 6.333.029. Los polímeros ejemplares usados en el dispositivo de la presente invención se desvelan en la solicitud de patente de Estados Unidos US20040062753 A1 y la patente de Estados Unidos Nº 4.557.264.

Para formar un soporte incorporado con un agente farmacéutico, el agente farmacéutico puede mezclarse con la solución de polímero antes de formar el soporte. Alternativamente, un agente farmacéutico podría cubrir un soporte fabricado, preferentemente en presencia de un transportador farmacéutico. El agente farmacéutico puede presentarse como un líquido, un sólido finamente dividido, o cualquier otra forma física apropiada. Alternativamente, pueden añadirse excipientes al soporte para alterar la velocidad de liberación del agente farmacéutico. En una realización alternativa, el soporte incorporado con al menos un agente farmacéutico que aumenta los niveles celulares de HIF-1 α está además incorporado con al menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto antiinflamatorio, como, por ejemplo, los compuestos desvelados en US 6.509.369.

En una realización más, el soporte incorporado con al menos un agente farmacéutico que aumenta los niveles celulares de HIF-1 α está además incorporado con al menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto anti-apoptótico, como, por ejemplo, los compuestos desvelados en US 6.793.945.

En una realización más, el soporte incorporado con al menos un agente farmacéutico que aumenta los niveles celulares de HIF-1 α está además incorporado con al menos un compuesto farmacéutico que es un inhibidor de fibrosis, como, por ejemplo, los compuestos desvelados en US 6.331.298.

En una realización más, el soporte incorporado con al menos un agente farmacéutico que aumenta los niveles celulares de HIF-1 α está además incorporado con al menos un compuesto farmacéutico que es capaz de aumentar angiogénesis, como, por ejemplo, los compuestos desvelados en US20040220393 y US20040209901.

En una realización más, el soporte incorporado con al menos un agente farmacéutico que aumenta los niveles celulares de HIF-1 α está además incorporado con al menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto inmunosupresor, como, por ejemplo, los compuestos desvelados en US20040171623.

En una realización más, el soporte incorporado con al menos un agente farmacéutico que aumenta los niveles celulares de HIF-1 α está además incorporado con al menos un compuesto farmacéutico que es un factor de crecimiento, como, por ejemplo, los miembros de la familia TGF-β, incluyendo TGF-β1, 2 y 3, proteínas morfogénicas óseas (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12 y -13), factores de crecimiento de fibroblasto -1 y -2, factor de crecimiento derivado de plaquetas -AA y -BB, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (FCI-I, II), factor de diferenciación de crecimiento (FDC-5, -6, -8, -10, -15), factor de crecimiento derivado de célula endotelial vascular (FCEV), pleiotrofina, endotelina. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, factor 1-alfa inducible por hipoxia, péptido-I de tipo glucagón (GLP-1) y II, Extendina-4, ácido retinoico, hormona paratiroidea, tenascina-C, tropoelastina, péptidos derivados de trombina, catelicidinas, defensinas, laminina, péptidos biológicos que contienen dominios de enlace con células y heparina de proteínas de matriz extracelular adhesiva tales como fibronectina y vitronectina, inhibidores de MAPK, como, por ejemplo, los compuestos desvelados en US20040209901 y US20040132729.

En una realización alternativa, el soporte incorporado con al menos un agente farmacéutico que reduce la degradación de proteína HIF-1 α está además incorporado con al menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto antiinflamatorio, como, por ejemplo, los compuestos desvelados en US 6.509.369.

En una realización más, el soporte incorporado con al menos un agente farmacéutico que reduce la degradación de proteína HIF-1 α está además incorporado con al menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto anti-apoptótico, como, por ejemplo, los compuestos desvelados en US 6.793.945.

En una realización más, el soporte incorporado con al menos un agente farmacéutico que reduce la degradación de proteína HIF-1 α está además incorporado con al menos un compuesto farmacéutico que es un inhibidor de fibrosis, como, por ejemplo, los compuestos desvelados en US 6.331.298.

En una realización más, el soporte incorporado con al menos un agente farmacéutico que reduce la degradación de proteína HIF-1 α está además incorporado con al menos un compuesto farmacéutico que es capaz de aumentar angiogénesis, como, por ejemplo, los compuestos desvelados en US20040220393 y US20040209901.

En una realización más, el soporte incorporado con al menos un agente farmacéutico que reduce la degradación de proteína HIF-1 α está además incorporado con al menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto inmunosupresor, como, por ejemplo, los compuestos desvelados en US20040171623.

En una realización más, el soporte incorporado con al menos un agente farmacéutico que reduce la degradación de proteína HIF-1 α está además incorporado con al menos un compuesto farmacéutico que es un factor de crecimiento, como, por ejemplo, los miembros de la familia TGF-β, incluyendo TGF-β1, 2 y 3, proteínas morfogénicas óseas (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12 y -13), factores de crecimiento de fibroblasto -1 y -2, factor de crecimiento derivado de plaquetas -AA y -BB, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (FCI-I, II), factor de diferenciación de crecimiento (FDC-5, -6, -8, -10, -15), factor de crecimiento derivado de célula endotelial vascular (FCEV), pleiotrofina, endotelina. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, factor 1-alfa inducible por hipoxia, péptido-I de tipo glucagón (GLP-1) y II, Extendina-4, ácido retinoico, hormona paratiroidea, tenascina-C, tropoelastina, péptidos derivados de trombina, catelicidinas, defensinas, laminina, péptidos biológicos que contienen dominios de enlace con células y heparina de proteínas de matriz extracelular adhesiva tales como fibronectina y vitronectina, inhibidores de MAPK, como, por ejemplo, los compuestos desvelados en US20040209901 y US20040132729.

En una realización preferente, el agente farmacéutico que es capaz de aumentar los niveles celulares de HIF-1α es un inhibidor de propil-hidroxilasa, incorporado en las paredes de un soporte de la presente invención. En una realización más preferente, el inhibidor de prolil-hidroxilasa es etil-3,4-dihidroxibenzoato (Aldrich, Estados Unidos; catálogo# E2485-9) o 2,4-dietilpiridinnadicarboxilato (Compañía Química Cayman, Estados Unidos; catálogo# 71200).

En una realización preferente, el agente farmacéutico que es capaz de reducir la degradación de proteína HIF-1α es un inhibidor de propil-hidroxilasa, incorporado en las paredes de un soporte de la presente invención. En una realización más preferente, el inhibidor de prolil-hidroxilasa es etil-3,4-dihidroxibenzoato (Aldrich, Estados Unidos; catálogo# E2485-9) o 2,4-dietilpiridinnadicarboxilato (Compañía Química Cayman, Estados Unidos; catálogo# 71200).

La cantidad de inhibidor de prolil-hidroxilasa efectiva para promover angiogénesis o regular los genes implicados en angiogénesis pueden variar, dependiendo del soporte usado y la naturaleza del inhibidor, y un experto en la técnica puede determinarlo fácilmente. Hablando en términos generales, una cantidad efectiva de un inhibidor de prolil-hidroxilasa es de 1 pico gramo/cm$^2$ a 1 mg/cm$^2$ de la matriz polimérica, y más típicamente de 1 pico gramo/cm$^2$ a 10 µg/cm$^2$ de la matriz polimérica.

Los soportes biodegradables de la presente invención pueden sufrir degradación gradual (principalmente a través de hidrólisis) con liberación simultanea del agente farmacéutico dispersado durante un periodo prolongado o extendido que es suficiente para promover la vascularización del implante o del área alrededor del implante. Preferentemente el implante promueve la administración prolongada de al menos un agente farmacéutico, por ejemplo, durante 1 a 5.000 horas, preferentemente de 2 a 800 horas, de cantidades efectivas, por ejemplo, de 0,0001 mg/kg/hora a 10 mg/kg/hora, del agente farmacéutico. Esta forma de dosis puede administrarse cuando sea necesario dependiendo del sujeto que se está tratando, la severidad de la aflicción, el juicio del médico que lo prescribe, y similares. Después de esto o de procedimientos similares, aquellos expertos en la técnica serán capaces de preparar una variedad de formulaciones.

**Uso terapéutico de los implantes**

La presente invención proporciona un implante, que comprende un soporte que ha incorporado en él al menos un agente farmacéutico que es capaz de promover vascularización. Se piensa que el implante de la presente invención promueve la vascularización al aumentar los niveles de proteína HIF-1α en el sitio del implante o adyacente al sitio del implante, o reduciendo la degradación de HIF-1α en el sitio del implante o adyacente al sitio del implante.

El soporte de la presente invención puede implantarse en un animal. El implante contiene células terapéuticas o tejidos que se incorporan en el soporte antes de la implantación. Las células pueden cultivarse bajo condiciones estándares conocidas por aquellos expertos en la técnica con el fin de aumentar el número de células o inducir diferenciación al fenotipo deseado antes de sembrar el soporte. Alternativamente, las células pueden inyectarse directamente en el soporte y después cultivarse *in vitro* bajo condiciones que promuevan la proliferación y deposición de la matriz biológica apropiada antes de la implantación. Un experto en la técnica puede reconocer fácilmente estas condiciones.

Para introducir las células en un soporte, el soporte se pone en contacto e incuba con una suspensión que contiene las células, o grupos de células. La incubación puede realizarse durante un corto periodo de tiempo (< 1 día) justo antes de la implantación, o durante un periodo más largo (> 1 día) para permitir una mejor unión celular, proliferación celular y síntesis de matriz extracelular dentro del soporte sembrado antes de la implantación.

Los efectos de los implantes de la presente invención en niveles celulares de proteína HIF-1α y niveles de mARN pueden evaluarse en una variedad de modos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los niveles de HIF-1α mARN pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante análisis con ensayo Northern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR en tiempo real (RT-PCR). PCR cuantitativo en tiempo real es preferente en el presente. El

análisis de ARN puede realizarse en ARN celular total o poli(A)+mARN. Métodos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica. El análisis con ensayo Northern es también rutinario en la técnica. PCR cuantitativo en tiempo real puede realizarse de manera conveniente usando ABI PRISM® 7600, 7700 comercialmente disponible, o el Sistema de Detección de Secuencia 7900, disponible en PE-Applied Biosystems, Foster City, Calif., y usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los niveles de proteína de HIF-1α pueden cuantificarse en una variedad de modos bien conocidos en la técnica, como inmunoprecipitación. El análisis con ensayo Western (electrotransferencia), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Los anticuerpos dirigidos a HIF-1α puede identificarse y obtenerse a partir de una variedad de fuentes, como el catálogo MSRS de anticuerpos (Aerie Corporation, Birmingham, Mich.) o pueden prepararse mediante métodos convencionales de generación de anticuerpos monoclonales y policlonales bien conocidos en la técnica. Los métodos para el análisis de los niveles de proteína HIF-1α y mARN se desvelan en US 6.020.462.

La invención también proporciona un implante de la presente invención o un implante producido usando el método de la presente invención para uso en la fomentación de vascularización en u n paciente al implantar el soporte en un sitio dentro del paciente.

El sitio donde el dispositivo puede implantarse puede ser cualquier sitio clínicamente relevante, como, por ejemplo, el hígado, el páncreas natural, el espacio subcapsular renal, el mesenterio, el omento, un bolsillo subcutáneo o el peritoneo. El sitio puede ser un sitio inmunológicamente privilegiado, que exista de manera natural o creado usando, por ejemplo, células de Sertoli.

Las células terapéuticas útiles para administración incluyen células autólogas, alogénicas o xenogénicas. En el caso de que el implante sea para uso en tratamiento de diabetes, las células pueden ser células madre, células pancreáticas precursoras/progenitoras, células que producen insulina genéticamente fabricadas, islotes expandidos parcialmente o completamente diferenciados o células que producen insulina.

Tal tratamiento pueden también usarse para otros tipos de terapia celular, incluyendo, por ejemplo, hepatocitos para el tratamiento de insuficiencia hepática, células cromafines para dolor crónico, células que producen factores de coagulación para hemofilia, y células que producen factores de crecimiento nervioso para enfermedad neurodegenerativa como enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer, así como fibroblastos, miofibroblastos, células cardiovasculares, células neurales y células precursoras neurales.

Otras células que pueden ser terapéuticamente efectivas para diferentes aplicaciones incluyen, aunque no se limitan a, células progenitoras, células precursoras, células madre, células de médula ósea, células sanguíneas de cordón umbilical, angioblastos, células endoteliales, osteoblastos, células de músculo liso, células de hígado, fibroblastos, miofibroblastos, células cardiovasculares, células neurales, células precursoras neurales, células amnióticas y células placentarias post-parto. Las células pueden fabricarse genéticamente para producir una proteína terapéutica, o para reducir la respuesta inmune del receptor.

Las células introducidas en el implante de la presente invención no necesitan limitarse a solamente un tipo de célula. Los implantes de la presente invención permiten la construcción de “órganos artificiales”, donde los tipos de células encontrados en órganos normales como, por ejemplo, el hígado, el páncreas, el riñón, se incorporan en el soporte del implante. En una realización alternativa, las células son capaces de modular la respuesta inmune del receptor, como, por ejemplo, las células madre mesenquimales y las células T supresoras, como se desvela en US 6.328.960, US 6.281.012 y US 6.685.936.

**Ejemplos de referencia**

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de los principios y práctica de la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención. En los ejemplos, los polímeros y monómeros se caracterizaron en composición química y pureza (NMR, FTIR), análisis térmico (DSC) y peso molecular mediante técnicas analíticas convencionales.

Las viscosidades inherentes (V.I, dL/g) de los polímeros y copolímeros se midieron usando un viscosímetro de dilución de calibre 50 Cannon-Ubbelhode (Labovisco, Zoetemeer, Holanda) sumergido en un baño de agua termostáticamente controlado a 30ºC utilizando cloroformo o hexafluoroisopropanol (HFIP) como el disolvente en una concentración de 0,1 g/dL.

En estos ejemplos se usan ciertas abreviaturas. Estas incluyen PCL para indicar ε-caprolactona polimerizada y PGA para indicar glicólido polimerizado. Además, las proporciones delante de la identificación del copolímero indican los respectivos porcentajes molares de cada componente.

**Ejemplo de referencia 1: Fabricación de un soporte que contiene al menos un agente farmacéutico**

Los soportes usados para formar el componente de espuma de los implantes de la presente invención pueden ser de cualquier tamaño y forma. La forma está dictada por el molde usado para formar el soporte, que en este ejemplo se hizo a medida por Hi-Tech Machine and Design LLC, Flemington, NJ, y no pretende limitar el alcance de la invención.

El polímero usado para fabricar el componente de espuma fue un copolímero PCL/PGA 35/65 producido por Birmingham Polymers Inc. (Birmingham, AL), con una V. I de 1,45 dL/g. Una proporción de peso 5/95 PCL/PGA en disolvente 1,4-dioxano se pesó. El polímero y el disolvente se colocaron en un matraz, que a su vez se puso en un baño de agua y se mezcló durante 5 horas a 70ºC para formar una solución. La solución después se filtró usando un dedal de extracción (porosidad extra gruesa, tipo ASTM 170-220 (EC)) y se almacenó en un matraz. Después se añadió inhibidor de hidroxilasa HIF-1α (etil-3, 4-dihidroxibenzoato, (Aldrich)) en las concentraciones enumeradas en la Tabla 1.

Un liofilizador a escala de laboratorio, o un secador mediante congelación (Modelo Duradry, FTS Kinetics, Stone Ridge, NY) se usó para formar el soporte de espuma. La solución de polímero se añadió en un molde de aluminio de 10,2 cm por 10,2 cm (4 pulgadas por 4 pulgadas) hasta una altura de 2 mm. El montaje del molde se colocó después en el estante del liofilizador y comenzó la secuencia de secado por congelación. La secuencia de secado por congelación usada en este ejemplo fue: 1) -17ºC durante 60 minutos, 2) -5ºC durante 60 minutos bajo vacío 100 mT, 3) 5ºC durante 60 minutos bajo vacío 20 mT, 4) 20ºC durante 60 minutos bajo vació 20 mT.

Después de haber completado el ciclo, el montaje del molde se sacó del liofilizador y se dejó desgasificar en una campana de vacío de 2 a 3 horas. El soporte de espuma se almacenó bajo nitrógeno. El tamaño del poro de este soporte compuesto se determinó usando análisis de porosimetría de mercurio (J. C. Groen y L. A. A. Peffer, “Influencia de medición de espacio muerto en las características de adsorción de zeolitos microporos”, The MicroReport, Tercer Trimestre 1997, Vol. 8, Nº 3, p. 8). El rango de tamaño de poro fue 1-300 µm con un tamaño medio de poro de 45 µm.

Los soportes resultantes contenían inhibidor de hidroxilasa HIF-1α atrapado en las paredes de la espuma polimérica. El grosor del soporte fue aproximadamente 1,5 mm.

**Ejemplo de referencia 2: Fabricación de un soporte compuesto que contiene al menos un agente farmacéutico**

En este ejemplo, se preparó un soporte a partir de dos partes: 1) un componente de espuma y 2) un componente de alfombra no tejida.

La alfombra no tejida se hizo de la siguiente manera: un copolímero de PGA/PLA (90/10) (Ethicon, USA) se extruyó por fundición en un hilo multifilamento continuo mediante métodos convencionales de hacer hilo y posteriormente se orientó en orden para aumentar la fuerza, estiramiento y energía requerida para romperse. Los hilos comprendían filamentos de aproximadamente 20 µm (micrones) de diámetro. Estos hilos después se cortaron y rizaron en longitudes uniformes de 5,1 cm (2 pulgadas) para formar una fibra principal de 5,1 cm (2 pulgadas).

Después se preparó una alfombra no tejida perforada con aguja en colocación seca utilizando las fibras principales de copolímero PGA/PLA 90/10. Las fibras principales se abrieron y cardaron en maquinaria estándar para no tejidos. La alfombra resultante tuvo forma de fibras principales en red. Las fibras principales en red se perforaron con aguja para formar la alfombra no tejida fibrosa perforada con aguja en colocación seca. La alfombra se restregó con isopropanol durante 60 minutos, seguido de secado bajo vacío. La alfombra resultante tuvo aproximadamente 2 mm de grosor.

El polímero usado para fabricar el componente de espuma fue un copolímero PCL/PGA 35/65 producido por Birmingham Polymers Inc. (Birmingham, AL), con una V. I de 1,45 dL/g. Una proporción de peso 0,5/99,5 PCL/PGA en disolvente 1,4-dioxano se pesó. El polímero y el disolvente se colocaron en un matraz, que a su vez se puso en un baño de agua y se mezcló durante 5 horas a 70ºC para formar una solución. La solución después se filtró usando un dedal de extracción (porosidad extra gruesa, tipo ASTM 170-220 (EC)) y se almacenó en un matraz. Después se añadió inhibidor de hidroxilasa HIF-1α (etil-3, 4-dihidroxibenzoato, (Aldrich)) en las concentraciones mostrada en la Tabla 1.

Un liofilizador a escala de laboratorio, o un secador mediante congelación (Modelo Duradry, FTS Kinetics, Stone Ridge, NY) se usó para formar el soporte de espuma. Aproximadamente 10 ml de la solución de polímero que contenía inhibidor de hidroxilasa HIF-1αs se añadió a un molde de aluminio de 4 pulgadas por 4 pulgadas para cubrir uniformemente la superficie del molde. La alfombra no tejida perforada con aguja se sumergió en el vaso de precipitación que contenía el resto de la solución hasta que se empapó por completo y después se colocó en el molde de aluminio. El resto de solución de polímero se vertió en el molde de manera que la solución cubrió la alfombra no tejida y alcanzó una altura de 2 mm en el molde.

El montaje del molde se colocó después en el estante del liofilizador y comenzó la secuencia de secado por congelación. La secuencia de secado por congelación usada en este ejemplo fue: 1) -17ºC durante 60 minutos, 2) -5ºC durante 60 minutos bajo vacío (100 mT), 3) 5ºC durante 60 minutos bajo vacío (20 mT), 4) 20ºC durante 60 minutos bajo vacío (20 mT).

Después de haber completado el ciclo, el montaje del molde se sacó del liofilizador y se dejó desgasificar en una campana de vacío de 2 a 3 horas. El soporte de espuma se almacenó bajo nitrógeno. El tamaño del poro de este soporte compuesto se determinó usando análisis de porosimetría de mercurio. El rango de tamaño de poro fue 1-300 µm con un tamaño medio de poro de 45 µm. Los soportes resultantes contenían inhibidor de hidroxilasa HIF-1α atrapado en las paredes de la espuma polimérica. El grosor del soporte fue aproximadamente 1,5 mm.

**Ejemplo de referencia 3: Caracterización de soporte cargado con un inhibidor de hidroxilasa HIF-1 alfa**

Se prepararon discos de 8 mm a partir de la lámina de espuma descrita en el Ejemplo 1 y se colocaron en un vial de cristal de 2 ml que contenía 0,5 ml de agua DI. El vial después se selló y se colocó en un agitador durante la noche para asegurar la completa liberación del contenido del fármaco del soporte en el disolvente. Al día siguiente el soporte se retiró del vial y la solución se analizó mediante HPLC para determinar el contenido total del fármaco. Se usó una columna C-18 con una fase móvil compuesta por 50% metanol y 50% agua (pH=2,7; $H_2SO_4$). La velocidad de flujo se controló en 1 ml/min. El volumen de inyección fuer 10µl y la detección se hizo en 254nm. El tiempo de ejecución del método fue 30 minutos. Se preparó una solución patrón disolviendo el fármaco en agua pura y se almacenó en el refrigerador en un matraz ámbar. Las soluciones estándares se prepararon mediante dilución en seri de la solución patrón. La curva de calibración resultó ser lineal en el rango de 5-100µg/ml. La linealidad y reproducibilidad se evaluaron mediante inyecciones por duplicado de cuatro estándares. La Tabla 1 muestra el contenido del agente en el soporte como una función de concentración inicial en solución de polímero.

TABLA 1. CONTENIDO DE ETIL-3,4-DIHIDROXIBENZOATO EN SOPORTE COMPUESTO

| | Cantidad de fármaco añadido µg/lámina de soporte de 10 cm X 10 cm | Contenido total de fármaco detectado ng/soporte 8 mm |
|---|---|---|
| Etil-3,4-dihidrobenzoato | 200 | 0,39 |
| | 2000 | 10,0 |
| | 20.000 | 92,7 |

## REIVINDICACIONES

**1.** Un implante biocompatible que comprende un soporte, al menos un agente farmacéutico que aumenta los niveles de proteína celular HIF-1α o inhibe la degradación de proteína HIF-1α y tejido de mamífero unido a o incorporado dentro del soporte; donde el soporte es una alfombra fibrosa encapsulada por y dispuesta dentro de una espuma.

**2.** El implante de la reivindicación 1, donde el soporte es biodegradable.

**3.** El implante de la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde al menos un agente farmacéutico se incorpora en el soporte antes de la formación del soporte añadiendo al menos un agente farmacéutico a una solución de polímero para formar el soporte.

**4.** El implante de la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde al menos un agente farmacéutico se incorpora en el soporte después de la formación del soporte cubriendo el soporte con al menos un agente farmacéutico.

**5.** El implante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el tejido de mamífero comprende células, tejido aislado de un órgano o un órgano aislado.

**6.** El implante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde al menos un agente farmacéutico es un inhibidor de hidroxilasa HIF-1α.

**7.** El implante de la reivindicación 6, donde el inhibidor de hidroxilasa HIF-1α es 2,4-dietilpiridinadicarboxilato o etil-3,4-dihidroxibenzoato.

**8.** El implante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la alfombrilla porosa del soporte está hecha mediante un procedimiento de colocación húmeda o colocación seca.

**9.** El implante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la espuma del soporte está formada por una técnica de separación en fase polímero-disolvente, formación de espuma con disolvente supercrítico, extracción con inyección de gas, moldeo con inyección de gas o fundición con un material extraíble.

**10.** El implante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el soporte está hecho con uno o más polímeros biodegradables.

**11.** El implante de la reivindicación 10, donde el polímero es ácido hialurónico, colágeno, colágeno recombinante, celulosa, elastina, un alginato, sulfato de condroitina, quitosano, quitina, queratina, seda, submucosa del intestino delgado (SID) o una combinación de los mismos.

**12**. El implante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el soporte está hecho de uno o más polímeros sintéticos.

**13.** El implante de la reivindicación 12, donde el polímero es un poliéster alifático, oxalato de polialquileno, poliamida, policarbonato, poliortoéster, polioxaéster, poliamidoéster, polianhidrido y polifosfaceno.

**14.** El implante de la reivindicación 13, donde el polímero es un poliéster alifático que es un homopolímero o copolímero de ácido láctico, láctido, ácido glicólico, glicólido, ε-caprolactona, p-dioxanona, carbonato de trimetileno, polioxaésteres, δ-valerolactona, β-butirolactona, ε-decalactona, 2,5-diketomorfolina, pivalolactona, α,α-dietilpropiolactona, carbonato de etileno, oxalato de etileno, 3-metil-2, 4-dioxano-2, 5-diona, 3,3-dietil-1, 4-dioxan-2,5-diona, γ-butirolactona, 1,4-dioxepan-2-ona, 1,5-dioxepan-2-ona, 6,6-dimetil-dioxeapn-2-ona y 6,8-dioxabiciclolactona-7-ona.

**15.** El implante de la reivindicación 12, donde el polímero es un elastómero.

**16.** El implante de la reivindicación 15, donde el elastómero es un copolímero de: ε-caprolactona y glicólido, ε-caprolactona y láctido, láctido y glicólido, p-dioxanona y láctido, ε-caprolactona y p-dioxanona, p-dioxanona y carbonato de trimetileno, carbonato de trimetileno y glicólido, carbonato de trimetileno y láctido o una combinación de los mismos.

**17.** El implante de la reivindicación 12, donde el material que comprende el soporte tiene una estructura en gradiente, caracterizada por una transición continua de una primera composición de polímero biodegradable a una segunda composición de polímero biodegradable.

**18.** Un método para hacer un implante biocompatible para aumentar los niveles celulares de HIF-1α o reducir la degradación de proteína HIF-1α, que comprende las etapas de:

a. incorporar al menos un agente farmacéutico capaz de aumentar los niveles celulares de HIF-1α o reducir la degradación de proteína HIF-1α en un soporte, donde el soporte es una alfombra fibrosa encapsulada por y dispuesta dentro de una espuma; e
b. introducir el tejido de mamífero en el soporte.

**19.** El método de la reivindicación 18, donde el soporte se trata además con al menos uno de un factor de crecimiento, un agente anti-rechazo, un analgésico, un antioxidante, un agente anti-apoptótico, un agente antiinflamatorio o un fármaco inmunosupresor.

**20.** Un implante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o un implante producido usando el método de la reivindicación 18 o reivindicación 19 para uso en la fomentación de vascularización en un paciente implantando el soporte en un sitio dentro de un paciente.

**21.** El implante para uso de la reivindicación20, donde el sitio es el hígado, el páncreas natural, el espacio subcapsular renal, el mesenterio, el omento, un bolsillo subcutáneo o el peritoneo.