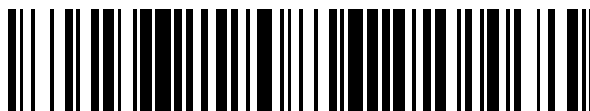


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 787 355**

51 Int. Cl.:

A61L 27/50 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61B 5/00 (2006.01)

A61N 1/05 (2006.01)

A61B 5/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2014** **E 14188556 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020** **EP 3006055**

54 Título: **Biomateriales mejorados para implantes neuronales, y uso de dichos biomateriales en el diagnóstico y terapia de enfermedades neuronales**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.10.2020

73 Titular/es:

**ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG
(100.0%)
Fahnenbergplatz
79085 Freiburg, DE**

72 Inventor/es:

**SHASTRI, PRASAD y
BLUMENTHAL, NILS R.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 787 355 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Biomateriales mejorados para implantes neuronales, y uso de dichos biomateriales en el diagnóstico y terapia de enfermedades neuronales

5 La presente invención se refiere a un implante neuronal que comprende un biomaterial que tiene una superficie externa con una nanorrugosidad estocástica (Rq), y la aplicación de dicha nanorrugosidad estocástica para prevenir las cicatrices gliales.

10 El control de las respuestas celulares en superficies de biomateriales es crucial en aplicaciones biomédicas tales como la ingeniería de tejidos y las prótesis implantables. Dado que las células encuentran diversas características topográficas a nanoescala en su entorno natural, se ha postulado que la nanotopografía de superficie puede ser una ruta alternativa para fabricar biomateriales con una respuesta celular deseable.

15 Las superficies de ingeniería se crean de varias maneras, típicamente mediante mecanizado, tratamiento de superficies y revestimiento. Muy a menudo, se utiliza una combinación de diversas operaciones de mecanizado, tratamiento y revestimiento para producir superficies con características que son deseables para una aplicación particular. Cada procedimiento de generación de superficie produce una topografía de superficie característica del
 20 procedimiento y de las variables del procedimiento utilizadas. La topografía de la superficie, por lo tanto, contiene la firma del procedimiento de generación de superficie y, como tal, puede usarse para diagnosticar, monitorizar y controlar el procedimiento de fabricación. La topografía de la superficie establece una correspondencia entre un fenómeno de superficie de ingeniería (por ejemplo, desgaste, vibración, etc.) y sus características topográficas (por ejemplo, área de apoyo, volumen de retención de aceite, etc.). Un perfil de superficie puede estar compuesto de un intervalo de componentes de frecuencia. Los componentes de alta frecuencia (u onda corta) corresponden a aquellos que se perciben como rugosos y, por lo tanto, se denominan "rugosidad". Los componentes de baja frecuencia (u onda larga) corresponden a cambios más graduales en el perfil, y a menudo se asocian con los términos "ondulación" o incluso "forma". La ondulación o el componente de baja frecuencia es de naturaleza
 25 periódica, mientras que el componente de alta frecuencia o la rugosidad es aleatoria. Los diferentes componentes de frecuencia en un perfil de superficie pueden separarse mediante un procedimiento denominado como filtrado. La rugosidad superficial aleatoria es la característica de cualquier procedimiento de mecanizado, y se caracteriza por muchos parámetros estadísticos y de amplitud.

30 Lipski et al. (en: AM Lipski, C Pino, FR Haselton, I-W. Chen and VP Shastri "The effect of silica nanoparticle-modified surfaces on cell morphology, cytoskeletal organization and function", Biomaterials, (28), 3836 (2008)) investigan el efecto de los conjuntos de nanopartículas (NP) dispuestos sobre un sustrato plano sobre la organización del citoesqueleto, la proliferación y la actividad metabólica en dos tipos de células. Para variar la rugosidad sin alterar la química, los sustratos de vidrio se revistieron con nanopartículas de sílice monodispersadas de 50, 100 y 300 nm de diámetro. El impacto de la rugosidad de la superficie en la nanoescala en la morfología celular se estudió cuantificando la dispersión celular, la forma, la alineación de F-actina citoesquelética, y el reclutamiento de
 35 complejos de adhesión focal (FAC) mediante análisis de imágenes. En los dos tipos de células analizadas, la rugosidad de la superficie introducida por las nanopartículas tuvo efectos específicos del tipo de células sobre la morfología y el metabolismo celulares. De forma interesante, para ambos tipos de células, la rugosidad de la superficie promovió la formación de fibras largas y gruesas de F-actina, que se alinearon con el eje largo de cada célula. Su descubrimiento de que la nanorrugosidad, tal como lo imparten los conjuntos de nanopartículas, afecta los procedimientos celulares de una manera específica de la célula, puede tener consecuencias de largo alcance en el desarrollo de biomateriales "inteligentes", especialmente para dirigir la diferenciación de las células madre.

45 Pennisi et al. (en: Pennisi CP, Dolatshahi-Pirouz A, Foss M, Chevallier J, Fink T, Zachar V, Besenbacher F, Yoshida K. Nanoscale topography reduces fibroblast growth, focal adhesion size and migration-related gene expression on platinum surfaces. Colloids Surf B Biointerfaces. 2011 Jul 1; 85(2):189-97. Epub 2011 Feb 26) describen una investigación de las respuestas de fibroblastos humanos primarios a sustratos de platino con diferentes niveles de rugosidad de la superficie a nanoescala. Las superficies nanorrugosas se fabricaron utilizando la técnica de deposición en ángulo rasante (GLAD). Se encontró que los niveles de respuestas celulares dependen de la rugosidad de la superficie y del tamaño de las características de la nanoescala. Los autores demostraron que, en respuesta a la nanotopografía, las células se diseminan menos y tienen una morfología alargada, mostrando signos de deterioro del citoesqueleto de actina y la formación reducida de complejos de adhesión focal. Aunque el crecimiento celular y la adhesión se vieron afectados en los sustratos nanorrugosos, la viabilidad celular no se vio afectada por la topografía.

55 En menor medida, los resultados también indicaron que la migración celular podría reducirse en las superficies nanorrugosas, ya que se encontró una expresión génica significativamente menor de los genes relacionados con la migración en las superficies más rugosas en comparación con la referencia plana. Los autores concluyen que esa nanotopografía de superficie influye en las respuestas de los fibroblastos en el platino, que puede usarse para reducir la adhesión celular en las superficies de implantes de platino, tales como los electrodos neuronales implantables.

Seil y Webster (en: Decreased astroglial cell adhesion and proliferation on zinc oxide nanoparticle polyurethane composites. *Int J Nanomedicine*. Dec 2008; 3(4): 523-531) describen un estudio sobre la actividad de las células astrogliales en materiales compuestos poliméricos de nanopartículas de ZnO. Las nanopartículas de ZnO incrustadas en poliuretano se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido para evaluar las características de la superficie a nanoescala de los compuestos. La química de la superficie se caracterizó mediante espectroscopía de fotoelectrones de rayos X. La respuesta celular astroglial se evaluó en función de la adhesión y proliferación celulares. La adhesión de astrocitos se redujo significativamente en materiales compuestos de nanopartículas de ZnO/poliuretano (PU) con una relación en peso de 50:50 (PU:ZnO) % en peso, 75:25 (PU: ZnO) % en peso, y 90:10 (PU:ZnO) % en peso, en comparación con PU puro. La producción exitosa de armazones compuestos de nanopartículas de ZnO adecuados para disminuir la densidad de células astrogliales demostró su potencial como material de canal de guía nerviosa.

El documento WO 2014/116132 describe un biomaterial para uso en la promoción de la regeneración neuronal en el sistema nervioso central, es decir, para abordar la falta de capacidad de los axones lesionados para regenerarse espontáneamente en el microambiente de la cicatriz glial ("estrategias de reparación nerviosa"). Aunque el material en sí tiene una rugosidad de entre alrededor de 10 nm y alrededor de 50 nm, la rugosidad no se reconoce como relevante para la función.

La formación de cicatrices gliales alrededor de los electrodos implantados poco después de la implantación en el cerebro conduce a la disfunción de estos electrodos. La formación de cicatrices gliales alrededor de los electrodos cerebrales implantables es el contribuyente dominante al fallo del electrodo. Descubrir estrategias para inhibir la formación de cicatrices gliales alrededor de los implantes cerebrales es fundamental para la función de los electrodos a largo plazo y, de este modo, mejoraría el tratamiento de pacientes con trastornos neurológicos tales como la epilepsia o la enfermedad de Parkinson.

Entre otros componentes, el sistema nervioso central (SNC) también está compuesto por macromoléculas de matriz extracelular y células de soporte de glía, y la contribución de los atributos físicos de estos componentes en el mantenimiento y la regulación de la función neuronal no se comprende bien. Estos componentes poseen una topografía bien definida.

En el contexto del desarrollo neuronal y la neurofisiología, los astrocitos tienen un papel establecido en el mantenimiento de la función neuronal. Forman una vasta red que proporciona la matriz física y bioquímica sobre la cual las neuronas prosperan y funcionan (véase, por ejemplo, Theodosis D, Poulain D, Oliet S (2008) Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol Rev*: 983-1008. Wade JJ, McDaid LJ, Harkin J, Crunelli V, Kelso J a S (2011) Bidirectional coupling between astrocytes and neurons mediates learning and dynamic coordination in the brain: a multiple modeling approach. *PLoS One* 6: e29445).

La plasticidad encontrada en el cerebro se puede atribuir en parte a los cambios morfológicos que ocurren en los procesos astrocíticos que pueden alterar no solo la geometría del entorno neuronal sino que también inducen cambios dinámicos en las interacciones astrocito-neurona que afectan la neurotransmisión, los gradientes de señal, y la relación entre sinapsis. De forma interesante, los cambios en el entorno neuronal inducidos por los astrocitos involucran moléculas de la matriz extracelular (ECM) tales como los proteoglicanos (PGs), postulando un papel importante para la topografía en el desarrollo neuronal.

Un glioma es un tipo de tumor que comienza en el cerebro o la columna vertebral. Se llama glioma porque surge de las células gliales, tales como los astrocitos. Los gliomas representan alrededor del 30% de todos los tumores cerebrales y del sistema nervioso central y el 80% de todos los tumores cerebrales malignos. El glioblastoma multiforme es un astrocitoma maligno, y es el tumor cerebral primario más común entre los adultos.

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la pérdida de la función neuronal en el sistema nervioso central (SNC). Esta pérdida de función ocurre predominantemente alrededor de las placas seniles, que consisten principalmente en depósitos de beta amiloide. El mecanismo exacto por el cual ocurre la muerte neuronal y la pérdida de función actualmente no se conoce bien.

Actualmente, las terapias se centran en disolver los depósitos de beta amiloide, y este enfoque no ha tenido mucho éxito. Un enfoque es utilizar la toxina B del cólera unida covalentemente a la proteína básica de mielina. Terapias basadas en anticuerpos anti-placa beta amiloide (por ejemplo, Bapineuzumab) desarrolladas conjuntamente por Johnson & Johnson y Pfizer han fracasado en los ensayos clínicos de Fase III. Recientemente, en julio de 2014, otro anticuerpo dirigido a la placa beta amiloide (Crenezumab) desarrollado por Roche/Genentech no logró cumplir sus objetivos de fase II. De este modo, existe una necesidad real de desarrollar nuevas dianas para prevenir o revertir la pérdida de la función neuronal debido al Alzheimer.

Satoh et al. (en: Satoh K, Hata M, Takahara S, Tsuzaki H, Yokota H, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Yamada T. A novel membrane protein, encoded by the gene covering KIAA0233, is transcriptionally induced in senile plaque-associated astrocytes. *Brain Res*. 2006 Sep 7; 1108(1):19-27. Epub 2006 Jul 18), en un esfuerzo por identificar moléculas derivadas de astrocitos que pueden estar íntimamente asociadas con la progresión de AD, identificaron

un nuevo gen de rata inducido por Abeta, designado Mib, cuya contraparte humana cubre KIAA0233. En los cerebros con AD, Mib se expresa en astrocitos activados asociados con placas seniles, pero no se expresa en neuronas alrededor de las lesiones. A partir de estas observaciones, Mib parece ser un nuevo gen que responde a la beta amiloide que puede desempeñar un papel en la activación inflamatoria de los astrocitos alrededor de las placas seniles en el cerebro con AD.

Para resolver los objetos anteriores, los presentes inventores han desarrollado superficies de biomateriales con propiedades que interfieren con la organización de astroglias y fibroblastos, lo cual es necesario para la formación de, por ejemplo, una cicatriz glial.

De este modo, en un primer aspecto de la presente invención, el objeto de la presente invención se resuelve mediante un implante neuronal que comprende un biomaterial que tiene una superficie externa con una nanorrugosidad estocástica (Rq) de entre 25 y 40 nm, preferiblemente de entre 32 nm +/- 5 nm, y el más preferido de alrededor de 32 nm para uso en la prevención de la formación de cicatrices gliales.

Se describen superficies de biomateriales, ya sea como la superficie como tal y/o como revestimientos, con topografías específicas que alteran el fenotipo de los astrocitos. La superficie o el revestimiento genera una nanotopografía con una rugosidad específica en la superficie del implante y, por lo tanto, puede evitar problemas comunes con los implantes actuales, tales como, por ejemplo, la formación de cicatrices gliales alrededor del implante in vitro y/o in vivo.

El documento US 2007-0038307 describe nanomateriales para prótesis neuronales y ortopédicas. Las nanofibras de carbono compuestas mejoran el crecimiento neuronal y minimizan la formación de tejido cicatrizal glial. Se describen métodos y composiciones para promover el crecimiento neuronal y minimizar la formación de tejido cicatrizal durante la monitorización y el tratamiento prolongados del tejido neuronal. La nanofibra de carbono de poliuretano compuesta es un material adecuado para el implante neuronal. Los nanomateriales de carbono compuestos disminuyen la adhesión de astrocitos y fibroblastos.

El implante neuronal puede estar hecho de cualquiera de una variedad de materiales que se sabe que son adecuados para servir como (parte de) un implante neuronal, preferiblemente como se describe en este documento. Se prefiere el implante neuronal según la presente invención, en el que dicho biomaterial se selecciona de platino, polímeros sintéticos, por ejemplo poli(organo)siloxanos, polímeros antimicrobianos, materiales impregnados/revestidos con nanotubos de carbono (CNTs) y/o grafeno, polipirrol (PPy), poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT), politertiofeno (PTTh), cyclotene®, y parylene C.

Más preferido es un implante neuronal para uso según la presente invención, en el que dicho implante comprende un componente seleccionado de un alambre de polímero, un nanotubo, una serie de postes o pilares de tamaño micrométrico, fibras de carbono, y nanofibras de carbono compuestas.

Se utiliza una amplia variedad de biomateriales en los implantes neuronales para el sistema nervioso central (SNC): fármacos o portadores genéticos para el tratamiento de trastornos neurológicos y tumores cerebrales, almacenes para promover la regeneración de tejidos, electrodos neuronales para restaurar las funciones neurológicas perdidas, o sistemas de derivación para hidrocefalia. Los biomateriales utilizados en el SNC incluyen silicón, lípidos, polímeros naturales y polímeros sintéticos en diversas formas según sus aplicaciones. Algunas aplicaciones, tales como los electrodos neuronales o las derivaciones del SNC, requieren que los biomateriales permanezcan en funcionamiento indefinidamente. Otras aplicaciones, tales como los portadores de fármacos o los almacenes de tejido, requieren que los biomateriales se degraden después de que se cumpla su función. Para una revisión con respecto a los biomateriales que pueden usarse en el contexto de la presente invención, véase, por ejemplo, Zhong Y y Bellamkonda RV (Biomaterials for the central nervous system. J R Soc Interface. 2008 Sep 6; 5(26):957-75).

Por lo general, los implantes neuronales, tales como los electrodos para la implantación cerebral, están hechos de polímeros, metales o una combinación de ambos. Los revestimientos de material para estos electrodos no se usan ampliamente. La sorprendente ventaja de la presente invención es la creación de nanotopografía en las superficies de los implantes que permite un control del comportamiento de las células circundantes (especialmente los astrocitos que son los principales contribuyentes, por ejemplo, en la formación de cicatrices gliales).

La fibrosis tisular, o formación de cicatrices, es una respuesta común al daño en la mayoría de los órganos del cuerpo. El sistema nervioso central (SNC) es especial porque las células fibrogénicas están restringidas a nichos vasculares y meníngeos. Sin embargo, la interrupción de la barrera hematoencefálica y la inflamación pueden desencadenar las células del estroma y desencadenar la formación de cicatrices. Astroglia se segrega a partir del núcleo de la lesión inflamatoria, y la denominada "cicatriz glial" compuesta de astrocitos hipertróficos sella el daño del tejido neuronal intacto. En el núcleo de la lesión, se desarrolla un segundo tipo de "cicatriz fibrótica", que es sensible a los mediadores inflamatorios. La cicatriz fibrótica representa una barrera importante para la regeneración del SNC. Por lo tanto, la prevención de la fibrosis puede ser una estrategia terapéutica valiosa para los trastornos neurológicos tales como el accidente cerebrovascular, la lesión de la médula espinal y la esclerosis múltiple (véase Fernández-Klett F, Priller J. The fibrotic scar in neurological disorders. Brain Pathol. 2014 Jul;24(4):404-13).

Al inhibir la formación de cicatrices gliales alrededor de los electrodos neuronales implantables, por ejemplo el cerebro, para uso según la presente invención, es posible usar estos dispositivos para tratamientos y terapias a largo plazo, lo que actualmente no es posible.

5 Se prefiere un implante neuronal para uso según la presente invención, en el que dicho implante es permanente o no permanente, y se selecciona preferiblemente de un electrodo de medida y/o estimulante, tal como nanoelectrodos flexibles, un marcapasos, y un dispositivo de suministro de fármaco.

10 Como se describe en el presente documento, el implante neuronal para uso según la presente invención puede usarse, al menos en parte, como un dispositivo de suministro de fármaco. De este modo, se prefiere además un implante neuronal para uso según la presente invención, en el que dicho biomaterial comprende además una sustancia activa, que puede seleccionarse preferiblemente de un fármaco farmacéuticamente activo, un antibiótico, una sustancia citotóxica, una sustancia antiinflamatoria, un polipéptido, un polisacárido, NGF, y colágeno u otros agentes neurotrópicos y neuroprotectores, tales como, por ejemplo, BDNF.

15 Asplund et al. (Asplund M, Boehler C, Stieglitz T. Anti-inflammatory polymer electrodes for glial scar treatment: bringing the conceptual idea to future results. *Front Neuroeng.* 2014 May 13; 7:9) describen electrodos poliméricos que también podrían ser útiles como implantes en el contexto de la presente invención.

Los inventores prevén que la invención conduzca a un uso terapéutico mejorado de electrodos cerebrales y otros implantes neuronales (por ejemplo, cerebrales). Especialmente, se describe el uso en la estimulación cerebral profunda de pacientes con enfermedad de Parkinson.

20 Se describe un método para producir el implante neuronal para uso según la presente invención como se describe en el presente documento, que comprende la etapa de proporcionar un dispositivo de implante neuronal prefabricado con un biomaterial que tiene una superficie externa con una nanorrugosidad estocástica (Rq) de entre 25 y 40 nm, preferiblemente de entre 32 nm +/- 5 nm, y lo más preferido de alrededor de 32 nm. En el contexto de la presente solicitud, "alrededor de" significará +/- 10 por ciento de un valor dado.

25 Se prefiere un método como se describe, en el que dicho dispositivo de implante neuronal prefabricado consiste al menos parcialmente en dicho biomaterial, o en el que dicho biomaterial se aplica como un revestimiento a dicho dispositivo de implante neuronal prefabricado. El método también puede comprender la prefabricación del implante neuronal, incluida la provisión de la nanorrugosidad directa o indirectamente (es decir, durante la producción o como una etapa de producción separada) al implante. Adicionalmente/alternativamente, en un método preferido como se describe, la nanorrugosidad estocástica (Rq) se aplica a dicho biomaterial usando un método adecuado conocido por la persona experta, preferiblemente seleccionado de pulido, mecanizado, tratamiento de superficie, revestimiento, polarización catódica, grabado ácido, laminado, plasma atmosférico, tratamiento con láser, y fundición.

Los presentes inventores prevén que la invención conduzca a un uso terapéutico mejorado de electrodos cerebrales y otros implantes cerebrales.

35 Preferiblemente, el método también comprende un método para producir dicho implante como se describe aquí, antes de implantarlo.

Un mamífero, en el contexto de la presente invención, se selecciona preferiblemente de un ratón, rata, mono, cabra, oveja, gato, perro, caballo, conejo, cerdo, y ser humano.

40 El hallazgo de que las regiones de acumulación de placa amiloide en la enfermedad de Alzheimer implican cambios en la nanorrugosidad de los tejidos proporciona un vínculo entre las señales físicas a nanoescala y la pérdida de función en las neuronas.

En resumen, los hallazgos clave de la presente invención proporcionan pruebas del papel hasta ahora inexplorado para la ECM y los cambios asociados a las células gliales en la nanorrugosidad estocástica en el neurodesarrollo y las neuropatologías.

45 La presente invención se describirá ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos con referencia a las figuras adjuntas; sin embargo, sin limitarse a los mismos.

En las Figuras:

50 La Figura 1 muestra un panel de la formación de tejido cicatrizal glial in vitro sobre una superficie lisa de vidrio (panel superior; Rq = 3,5 nm). En comparación, no se forma tejido cicatrizal glial en las superficies con una topografía modificada (panel inferior; Rq = 32 nm). Rq es la raíz de la media cuadrática de la rugosidad.

La Figura 2 muestra (izquierda) la cantidad relativa de tejido cicatrizal glial formado in vitro alrededor de alambres de polímero (barra gris) o alambres de polímero revestidos con una topografía de superficie alterada (barra negra). La figura de la derecha muestra el tamaño del tejido cicatrizal glial formado in vitro después de volver a colocarlo en un

vidrio plano que es una superficie lisa (línea negra) o superficies con una topografía modificada, Rq 32 nm (línea gris).

La Figura 3 muestra los rasgos morfológicos y funcionales en las células PC-12 en sustratos nanorrugosos: (a) Microscopía de fuerza atómica (AFM) de sustratos modificados con nanopartículas de sílice (SNP) con la correspondiente rugosidad Rq de la superficie. (b) Morfología de las células PC-12 en Rq = 3,5 nm, Rq = 32 nm y Rq = 80 nm visualizada por tinción para F-actina. Impacto de la nanorrugosidad en la polarización de PC-12 según se evalúa determinando: (c) número de neuritas por célula, y (d) longitud de neuritas. (e) Influencia de la nanorrugosidad en la actividad de acetilcolinesterasa (AChE). Imágenes mediante FURA-2 sensible al calcio de células PC-12 diferenciadas sobre sustratos y superficies de vidrio liso con una Rq de 32 nm: (f) cambio en los niveles de calcio intracelular según lo evaluado por la intensidad de FURA-2, (g) tasa de despolarización según lo determinado por la pendiente de la porción de despolarización de la curva (inmediatamente después de la adición de KCl). Significancia estadística: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

La Figura 4 muestra que la morfología y la función de las neuronas y astrocitos del hipocampo de rata están influidas por la rugosidad del sustrato: interacción neurona-astrocito sobre (a) sustrato de vidrio liso, (b) sobre sustrato de Rq = 32 nm. Los astrocitos se visualizaron usando anticuerpos contra GFAP (gris oscuro), y las neuronas se visualizaron usando anticuerpos contra MAP-2 (gris claro). Cuantificación de la asociación neurona-astrocito en: (c) cultivos a corto plazo (5 días), y (d) cultivos a largo plazo (6 semanas). Imágenes mediante FURA-2 sensible al calcio en neuronas del hipocampo en sustratos y superficies de vidrio liso con Rq de 32 nm: (e) cambio en el nivel de calcio intracelular según lo evaluado por la intensidad de FURA-2, (f) tasa de despolarización determinada por la pendiente de la porción de despolarización de la curva (inmediatamente después de la adición de KCl). Significancia estadística: *** p <0,001.

La Figura 5 muestra que piezo-1 es necesario para detectar la nanotopografía: (a) Micrografía electrónica de barrido representativa de células PC-12 cultivadas en la superficie nanorrugosa (se muestra Rq = 40 nm). PC-12 teñidas usando anti-FAM38A, un anticuerpo para el canal iónico mecanosensible Piezo-1 en Rq = 3,5 nm (b) y Rq = 32 nm (c). En superficies lisas, la tinción de FAM38A es pronunciada en los puntos de ramificación de las neuritas (indicados por círculos) (b), mientras que en las superficies nanorrugosas, la tinción de FAM38A es uniforme a lo largo de todos los procesos neuríticos (c). Morfología de los ganglios de la raíz dorsal de rata (d, e) y función (f, g) sobre vidrio y Rq de 32 nm. La inhibición de FAM38A con GsMTx4 (5 μM) da como resultado el desacoplamiento de las neuronas del hipocampo de los astrocitos en sustratos de vidrio lisos (h, i). El perfil de intensidad de FURA-2 (j) y la tasa de entrada de calcio (k) en las neuronas del hipocampo tras la despolarización con KCl sobre sustrato de vidrio liso y Rq = 32 nm es idéntico tras la inhibición de FAM38A. Significancia estadística: *** p <0,001.

La Figura 6 muestra que la nanorrugosidad altera los atributos físicos de los astrocitos: Dependencia del factor de forma de los astrocitos en la nanorrugosidad del sustrato: (a) La disminución del factor de forma en las superficies con Rq de 32 nm es consistente con un fenotipo más móvil (recuadro). Cambios morfológicos en la superficie celular de los astrocitos en superficies nanorrugosas: imágenes mediante AFM de astrocitos cultivados en vidrio (b) y en Rq = 32 nm (c) y los barridos de líneas transversales correspondientes, y cambios en la topografía de la superficie de astrocitos en superficies de 32 nm (d). Las áreas sombreadas muestran áreas representativas para los cálculos de Rq. Las placas de beta amiloide están asociadas con cambios topográficos en el tejido cerebral: cortes de cerebro humano embebidos en parafina teñidos con el colorante de plata de Bielschowsky (e): imagen izquierda; humano sano (AD-), imagen derecha; paciente diagnosticado con Alzheimer (AD+): placas β amiloides reveladoras indicadas por puntas de flecha amarillas. Panel inferior; barridos mediante AFM en modo de repiqueteo (10 μm x 10 μm) de una de las áreas representativas (superior), barrido de mayor aumento (2 μm x 2 μm) de la misma área (inferior), y vistas transversales de la imagen de 2 μm x 2 μm correspondiente anterior. (f) Histogramas de valores de Rq de tejido cerebral sano, y placas de β amiloide en pacientes con Alzheimer que muestran un cambio general de la rugosidad del tejido a Rq más altos y una mayor heterogeneidad en la rugosidad en cortes cerebrales AD+. Los valores de Rq se calcularon usando un área de barrido de 700 nm x 700 nm.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Las propiedades de la superficie de biomaterial de la invención para uso se ensayaron y verificaron en un modelo experimental clínicamente relevante. En el modelo in vitro de cicatrización glial, los alambres de polímero con el revestimiento superficial pudieron inhibir la formación de cicatriz glial. Además, el tejido cicatrizal glial ya formado (in vitro) se descompone cuando se expone a un régimen específico de nanotopografía, ya que se utiliza para el revestimiento. Se implantaron alambres de polímero con revestimiento superficial en geles de agarosa con una consistencia casi similar a la del tejido cerebral, y se demostró que el revestimiento era estable después de esta implantación (véanse Figuras 1 y 2).

Las superficies de los materiales se pueden caracterizar por su morfología y rugosidad mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

Ejemplo 2

La nanotopografía modula la polaridad de las células PC-12 y mejora la función

Dado que las macromoléculas se encuentran en un estado de alta entropía, y la entropía es una medida estadística de aleatoriedad, se espera que la rugosidad presentada por las macromoléculas sea estocástica (aleatoria). Los inventores simularon nanorugosidad de la ECM aleatoria utilizando un conjunto de coloides de sílice monodispersos de tamaño creciente (Lipski AM, Pino CJ, Haselton FR, Chen I-W, Shastri VP (2008) The effect of silica nanoparticle-modified surfaces on cell morphology, cytoskeletal organization and function. *Biomaterials* 29:3836-46, Lipski a. M et al. (2007) Nanoscale Engineering of Biomaterial Surfaces. *Adv Mater* 19:553-557) (Figura 3a). La rugosidad en este sistema aumenta logarítmicamente con el radio de nanopartículas, y puede recapitular la topografía desde el nivel de los agrupamientos de receptores hasta las características de la ECM (Shastri VP (2009) In vivo engineering of tissues: Biological considerations, challenges, strategies, and future directions. *Adv Mater* 21:3246-54), y además permite la producción de superficies con nanorugosidad estocástica. Por el contrario, las superficies que consisten en ranuras y crestas periódicas que se han estudiado ampliamente presentan rugosidad determinista.

Como una primera etapa, los inventores investigaron la capacidad de las células PC-12 (Greene L, Tischler S (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:2424-8), un sistema modelo bien establecido para estudiar la diferenciación neuronal, para percibir la nanorugosidad estocástica, y analizaron los cambios en su morfología y función.

Las células PC12 son de hecho capaces de percibir la nanorugosidad subyacente (de una manera dependiente de NGF y colágeno), y mostraron una diferenciación aumentada y rasgos funcionales asociados en una Rq específica de alrededor de 32 nm, como lo demuestra una morfología celular altamente polarizada (Figura 3b, panel central), y cambios asociados, tales como un crecimiento menor y más prolongado de neuritas (Figura 3c y 3d), en comparación con el vidrio, que se considera un sustrato liso (Rq aprox. 3,5 nm, Figura 3b, panel izquierdo). Más allá de esta rugosidad óptima del sustrato, las células eran más propensas a aglomerarse (Figura 3b, panel derecho). Si los portaobjetos o sustratos de cultivo no están revestidos con colágeno, entonces las células PC-12 no pueden detectar la rugosidad, y también necesitan NGF para expresar neuritas, que son los elementos sensores para detectar la nanotopografía. Para el crecimiento de las células neuronales, en general se ha de revestir el sustrato con colágeno polilisina u otro policitación, tal como la poli-L-ornitina. Sin embargo, este revestimiento no afecta la rugosidad y/o los valores de Rq.

Una medida del estado funcional de una neurona es la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE), ya que ésta es necesaria para la comunicación sináptica. De forma interesante, los niveles de AChE también alcanzaron su punto máximo en las células PC-12 en superficies con Rq de 32 nm (Figura 3e), que también coincidió con una respuesta de calcio acelerada y elevada a la despolarización (Figuras 3f y 3g).

La nanotopografía media la interacción neurona-astrocito del hipocampo

Los inventores plantearon entonces la siguiente pregunta: ¿pueden las células neuronales en general percibir la nanorugosidad, y, si es así, tiene un papel en la definición de su interacción y función? Las neuronas del hipocampo son responsables de la formación de la memoria. La pérdida de su función y la muerte se ha relacionado con neuropatologías, tales como la enfermedad de Parkinson y Alzheimer.

Por lo tanto, los inventores evaluaron la respuesta de cultivos primarios mixtos de neuronas y astrocitos del hipocampo de ratas a los diferentes regímenes de rugosidad. Sorprendentemente, las neuronas primarias del hipocampo también respondieron a la rugosidad de manera similar a la PC-12 dopaminérgica, y exhibieron estructuras polarizadas prominentes, similares a axones, en exactamente la misma Rq de 32 nm.

Un hallazgo también notable fue que la nanorugosidad parecía modular la relación y la dependencia de las neuronas de los astrocitos. Está bien establecido que las neuronas requieren astrocitos para sobrevivir (Cui W, Allen ND, Skynner M, Gusterson B, Clark a J (2001) Inducible ablation of astrocytes shows that these cells are required for neuronal survival in the adult brain. *Glia* 34:272-82), y de hecho, en superficies con una Rq por encima y por debajo de 32 nm, se encontraron predominantemente neuronas asociadas con astrocitos (Figuras 4a y 4c). Sin embargo, en Rq de aprox. 32 nm, las neuronas se disociaron de los astrocitos (Figuras 4b y 4c) y continuaron sobreviviendo independientemente incluso hasta 6 semanas (Figura 4d). Después de 5 días, el porcentaje de neuronas que estaban asociadas con los astrocitos en la superficie con Rq de 32 nm era de alrededor de 15%, que era 1,5 - 2 veces menor que el de otras Rq, que oscilaba entre 20 - 40%, y 6 veces menor que aquel en el sustrato de vidrio liso (Figura 4c). Es decir, en comparación con las otras Rq, más del doble de neuronas en la superficie con Rq de 32 nm sobrevivieron independientemente de los astrocitos. Sin embargo, a las 6 semanas, el porcentaje de neuronas que sobrevivieron independientemente de los astrocitos en la Rq de 32 nm fue 6 veces mayor en comparación con las otras Rq. Mientras que más del 90% de las neuronas se asociaron con astrocitos en otras rugosidades, solo el 15% de las neuronas se asociaron con astrocitos en Rq de 32 nm (Figura 4d). Sorprendentemente, las neuronas del hipocampo en superficies con Rq de 32 nm, a pesar de estar disociadas de los astrocitos, mostraron un orden de magnitud más rápido y un aumento más fuerte en los niveles de calcio intracelular después de la despolarización de

la membrana en comparación con aquellas en las superficies lisas (Figuras 4e y 4f). De este modo, parecía haber una R_q favorable de alrededor de 32 nm en la que tanto PC-12 como las neuronas del hipocampo parecían ser más funcionales.

5 Canal iónico mecanosensible - Piezo-1 es responsable de la detección de señales físicas a nanoescala por las neuronas

Estudios anteriores mostraron que la nanorrugosidad estocástica alteró la organización de complejos de adhesión focal en preosteoblastos altamente migratorios y células endoteliales (AM Lipski, C Pino, FR Haselton, I-W. Chen, y VP Shastri; "The effect of silica nanoparticle-modified surfaces on cell morphology, cytoskeletal organization and function", *Biomaterials*, (28), 3836 (2008)). Dado que las neuronas tienen una capacidad migratoria limitada (Fricker R a et al. (1999) Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain. *J Neurosci* 19:5990-6005), una pregunta abierta crítica fue cómo las neuronas perciben la nanorrugosidad. Las micrografías electrónicas de barrido revelaron que las neuritas realmente hacen contacto íntimo con la topografía subyacente (Figura 5a). Tal contacto íntimo entre las neuritas y la superficie debería manifestarse como cambios en la tensión de la membrana. Dado que la conformación y distribución de los canales iónicos mecanosensibles se altera en respuesta a los cambios en la tensión y curvatura de la membrana (Nilius B (2010) Pressing and squeezing with Piezos. *EMBO Rep* 11:902-3), los inventores investigaron el patrón de expresión de FAM38A, una proteína transmembránica activada por integrina, que forma parte del canal iónico mecanosensible Piezo-1 (Coste B et al. (2010) Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 330:55-60). Piezo-1 se expresa por las neuronas del SNC y no por las neuronas sensoriales tales como los ganglios de la raíz dorsal (DRG) (Roudaut Y et al. (2012) Touch sense: functional organization and molecular determinants of mechanosensitive receptors. *Channels* 6:234-45).

Se observó que, mientras que la expresión de FAM38A en células PC-12 en vidrio estaba predominantemente localizada en puntos de ramificación de neuritas que serían una región de alta tensión citoesquelética (Figura 5b), por el contrario, se podía observar una distribución más uniforme de FAM38A en la R_q óptima de 32 nm, lo que sugiere un cambio drástico en el entorno mecánico de la neurita a medida que perciben la nanorrugosidad (Figura 5c). Dado que el nivel de expresión de FAM38A no se alteró, y PC-12 durante la diferenciación no mostró ningún cambio en la fuerza de fijación o la motilidad en respuesta a la nanorrugosidad, los cambios observados en el patrón de expresión de Piezo-1 se pueden vincular a la nanotopografía subyacente.

El papel de Piezo-1 en la detección de la topografía se ve reforzado además por los hallazgos de que los GRD, que carecen de este canal mecanosensible, pero poseen Piezo-2, no muestran cambios morfológicos en los sustratos de nanorrugosidad (Figuras 5d y 5e). Esto se confirma aún más mediante la obtención de imágenes del flujo de calcio, que mostró patrones de despolarización y tasa de entrada de calcio similares en DRG que crecen en R_q de 3,5 DRG que crecen en R_q de 32 nm (Figuras 5f y 5g).

Las interacciones neurona-astrocito implican señales topográficas proporcionadas por los astrocitos y Piezo-1

35 Como se indicó anteriormente, las neuronas primarias del hipocampo requieren la interacción con los astrocitos para su supervivencia (Cui W, Allen ND, Skynner M, Gusterson B, Clark a J (2001) Inducible ablation of astrocytes shows that these cells are required for neuronal survival in the adult brain. *Glia* 34:272-82). Esto planteó la pregunta de por qué las neuronas favorecen la superficie sobre la asociación con los astrocitos. El análisis mediante AFM de la superficie de los astrocitos asociados con las neuronas llevó a los inventores al notable hallazgo de que la rugosidad de la superficie de los astrocitos estaba alrededor de una R_q de 26-28 nm (Figura 6d), y esto coincide bastante bien con el régimen de rugosidad en el que las neuronas exhiben desacoplamiento de astrocitos.

El papel de la mecanotransducción en el mantenimiento de las interacciones neurona-astrocito es respaldado por los hallazgos de los inventores que al inhibir Piezo-1 con la toxina GsMTx4 (Delmas P, Hao J, Rodat-Despoix L (2011) Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons. *Nat Rev Neurosci* 12:139-53, Bae C, Sachs F, Gottlieb P (2011) The mechanosensitive ion channel Piezo1 is inhibited by the peptide GsMTx4. *Biochemistry* 50:6295-6300), las neuronas se desacoplan de los astrocitos incluso en sustratos de vidrio lisos (Figuras 5h y 5i) en los que normalmente muestran una fuerte asociación (Figuras 4a, 4c y 4d). Además, el aumento de la sensibilidad a la despolarización que se observó en las neuronas del hipocampo en R_q de 32 nm se pierde con la inhibición de Piezo-1 (Figuras 5j y 5k). Esto proporciona pruebas directas de que el papel de la nanotopografía influye en la interacción y función neurona-astrocito del hipocampo a través de la mecanotransducción, y un papel claro para los canales iónicos de activación por estiramiento en estos procesos.

Regiones de acumulación de placa amiloide en la enfermedad de Alzheimer presentan una mayor nanorrugosidad tisular

55 La observación de los inventores de que la topografía de los astrocitos, una célula de soporte para las neuronas, puede dictar la función de las neuronas fenotípicamente no relacionadas, apunta a un paradigma más amplio en el que la información física y mecánica proporcionada por los astrocitos y las macromoléculas de la ECM desempeñan un papel no solo en el desarrollo neuronal sino también en neuropatologías. Existe amplia evidencia de que la

pérdida de memoria asociada con la enfermedad de Alzheimer (AD) se debe a la muerte de las neuronas del hipocampo. Los PGs como el sulfato de condroitina PGS (CSPGs) se han implicado tanto en la diferenciación neuronal como en neuropatologías tales como el Alzheimer (Galtrey CM, Fawcett JW (2007) The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res Rev* 54:1-18). Se ha descubierto que los CSPGs se localizan conjuntamente con placas de β -amiloide, y estudios *in vitro* han demostrado que los CSPGs pueden promover el ensamblaje de fibrillas β -amiloide, una etapa clave en la formación de la placa. De forma interesante, el β -amiloide estimula la producción de CSPGs en astrocitos, lo que tiene efectos negativos sobre la salud neuronal y la formación de sinapsis.

De este modo, la pérdida de la función de la neurona del hipocampo en la enfermedad de Alzheimer parece ser provocada por cambios en la topografía que experimentan las neuronas. Para investigar más esta premisa, los inventores analizaron las características topográficas de las placas de β -amiloide en el hipocampo de cortes cerebrales humanos utilizando AFM (Figura 6e). Los inventores hicieron la observación convincente de que, si bien la Rq del tejido cerebral sano (AD-) mostró una distribución gaussiana con una mediana centrada alrededor de 34 nm, el tejido de las personas diagnosticadas con Alzheimer (AD+) mostró una distribución bimodal de la rugosidad del tejido, con un pronunciado cambio en la mediana hacia valores de Rq más altos de 60 nm, acompañado de un patrón de Rq más heterogéneo (Figura 6f). La aparición de valores de Rq superiores a 80 nm, que es el intervalo de Rq en el que los inventores observan un aumento de la muerte celular neuronal, está de acuerdo con informes publicados de que las neuronas, cuando se exponen a β -amiloide, sufren apoptosis (Fraser PE, Lévesque L, McLachlan DR (1994) Alzheimer A beta amyloid forms an inhibitory neuronal substrate. *J Neurochem* 62:1227-30; Ivins KJ, Thornton PL, Rohn TT, Cotman CW (1999) Neuronal apoptosis induced by beta-amyloid is mediated by caspase-8. *Neurobiol Dis* 6:440-9). La observación actual de que la forma de los astrocitos se ve afectada por la nanorugosidad proporciona pruebas de que la señalización celular en el entorno neuronal puede estar mediada adicionalmente por señales basadas en ECM.

Los efectos de la nanorugosidad estocástica en la salud neuronal parecen manifestarse en dos escenarios posibles: (1) Los cambios en la rugosidad del tejido afectan el comportamiento de las células gliales, que entonces instiga cambios en el entorno de señalización de las neuronas, y/o (2) los cambios en las células generalmente estacionarias que proporcionan una red de apoyo para las células neuronales y las sinapsis, se han observado astrocitos migratorios y proliferantes en la cicatrización glial, un entorno con función neuronal disminuida (Buffo A, Rolando C, Ceruti S (2010) Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol* 79:77-89, Wanner IB et al. (2013) Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *J Neurosci* 33:12870-86). En la presente invención, se demostró que un entorno celular alterado en forma de nanotopografía afecta los atributos biofísicos de los astrocitos (forma, rugosidad) para alterar su interacción con las neuronas. La evidencia sólida para el segundo escenario deriva de un estudio reciente de Satoh et al. (Satoh K et al. (2006) A novel membrane protein, encoded by the gene covering KIAA0233, is transcriptionally induced in senile plaque-associated astrocytes. *Brain Res* 1108:19-27), mostró que hMib (un ortólogo humano de Piezo-1 de roedor) es inducido transcripcionalmente en astrocitos activados asociados con placas seniles de β -amiloide en cerebros humanos AD+. De forma interesante, las neuronas que expresan hMib muestran una morfología dañada, mientras que las neuronas de aspecto saludable no expresan hMib. La capacidad de detectar los cambios en la topografía de astrocitos inducidos por la rugosidad del tejido parece haber provocado cambios indeseables en las neuronas hMib+. Por el contrario, la incapacidad para detectar las señales mecánicas proporcionadas por los astrocitos parece desempeñar un papel en la pérdida de función en las neuronas hMib-. Dado que las neuronas sanas son hMib+, la pérdida de este marcador parece desempeñar un papel adicional en la deficiencia funcional asociada con el Alzheimer.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universitätsklinikum Freiburg

<120> Biomateriales mejorados para implantes neuronales, y uso de dichos biomateriales en el diagnóstico y terapia de enfermedades neuronales

5 <130> U30584EP

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

10 <212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 1

gcacaaaggc cuccgacuu 19

<210> 2

15 <211> 19

<212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 2

ggguugaaga uucgggaga 19

20 <210> 3

<211> 19

<212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 3

25 cggaagaaug gcagcgcau 19

<210> 4

<211> 19

<212> ARN

<213> Homo sapiens

30 <400> 4

cagaugaaca guugggcca 19

REIVINDICACIONES

1. Implante neuronal que comprende un biomaterial que tiene una superficie externa con una nanorrugosidad estocástica (Rq) de entre 25 y 40 nm, para uso en la prevención de la formación de cicatrices gliales.
- 5 2. El implante neuronal para uso según la reivindicación 1, en el que dicha nanorrugosidad estocástica (Rq) está entre 32 nm +/- 5 nm, tal como alrededor de 32 nm.
3. El implante neuronal para uso según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho biomaterial se selecciona de platino, oro, polímeros sintéticos, por ejemplo poli(organo)siloxanos, polímeros antimicrobianos, polipirrol (PPy), poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT), politertiofeno (PTTh), poli(pirrol) y sus derivados, cyclotene® y parylene C.
- 10 4. El implante neuronal para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho biomaterial comprende además una sustancia activa seleccionada de un fármaco farmacéuticamente activo, un antibiótico, una sustancia citotóxica, una sustancia antiinflamatoria, un polipéptido, NGF, BDNF, y colágeno.
- 5 15 5. El implante neuronal para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho implante comprende un componente seleccionado de un alambre de polímero, un nanotubo, una serie de postes o pilares de tamaño micrométrico, fibras de carbono, y nanofibras de carbono compuestas.
6. El implante neuronal para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho implante es permanente o no permanente, y se selecciona preferiblemente de un electrodo de medida y/o estimulante, tal como nanoelectrodos flexibles, un marcapasos, y un dispositivo de suministro de fármaco.
- 20 7. El implante neuronal para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha formación de cicatriz glial se evita en un trastorno neurológico seleccionado de epilepsia, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, y cáncer de cerebro.

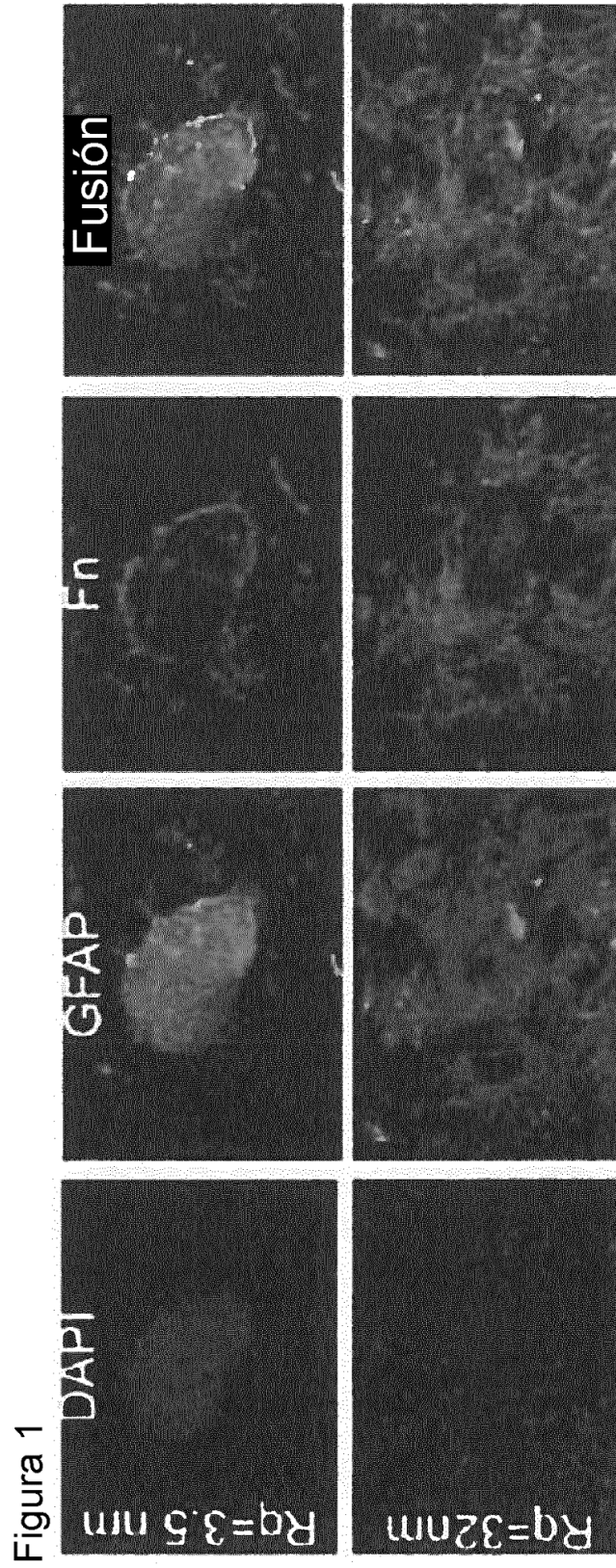
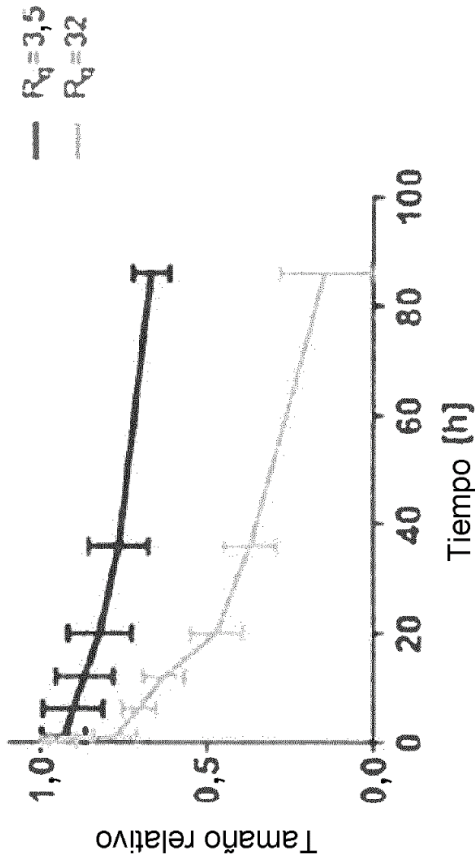
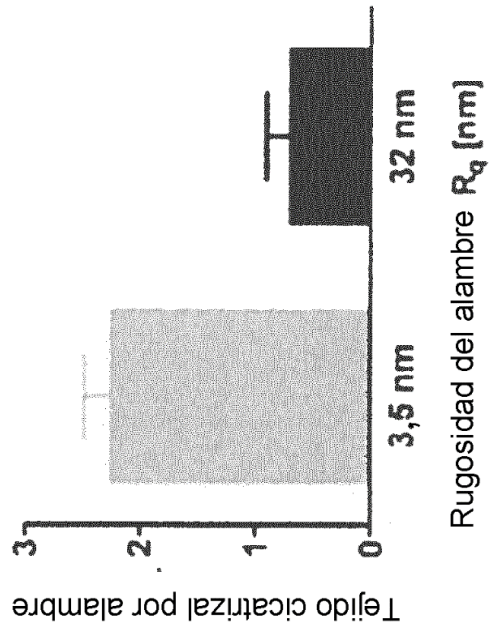


Figura 2



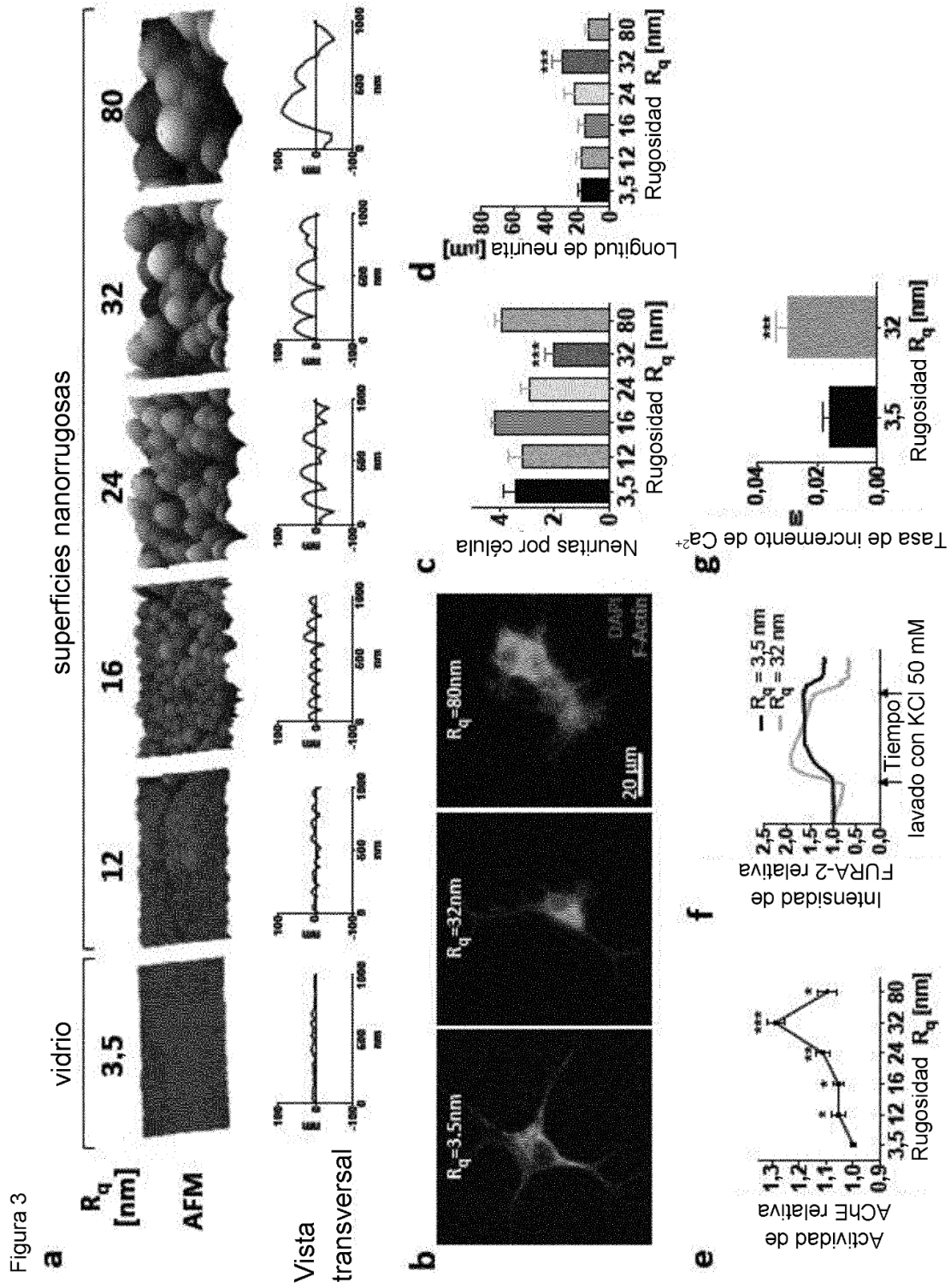


Figura 4

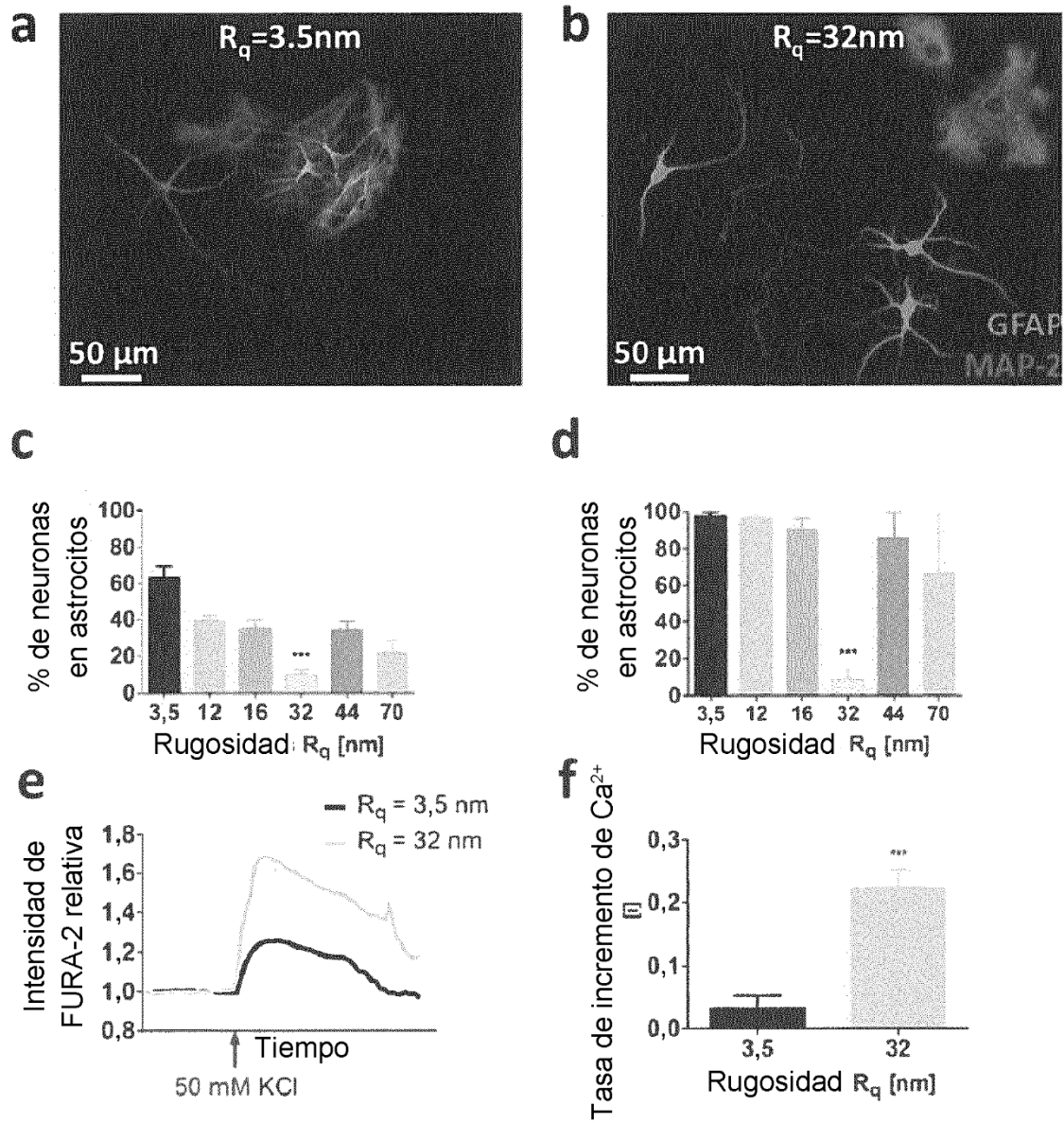


Figura 5

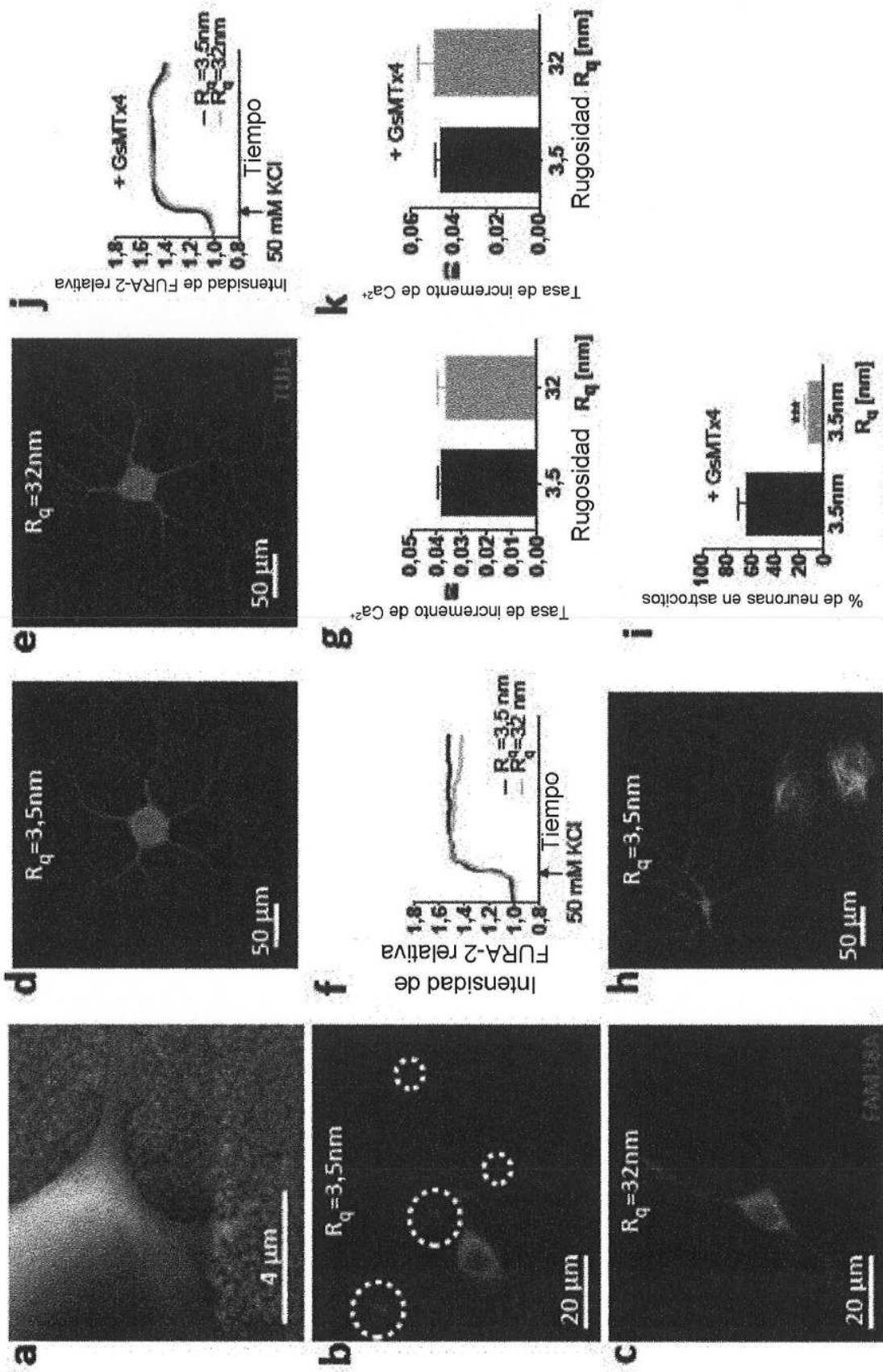


Figura 6

