



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 291 189**

51 Int. Cl.:
C12M 3/00 (2006.01)
A61L 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00905419 .8**
86 Fecha de presentación : **12.02.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1165749**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2002**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de armazones poliméricos, porosos, biodegradables y biocompatibles para ingeniería tisular.**

30 Prioridad: **18.03.1999 KR 99-009263**
16.11.1999 KR 99-050922

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

73 Titular/es: **KOREA ADVANCED INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY**
373-1, Koosung-dong, Yusong-ku
Taejon 305-338, KR
Regen Biotech, Inc.

72 Inventor/es: **Yoon, Jun, Jin;**
Park, Tae, Gwan y
Nam, Yoon, Sung

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 291 189 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

Procedimiento para la preparación de armazones poliméricos, porosos, biodegradables y biocompatibles para ingeniería tisular.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere, en general, a un procedimiento para preparar armazones porosos tridimensionales que pueden utilizarse como soportes o matrices de cultivo para el cultivo tisular *in vitro* y, más particularmente, a la utilización de sales efervescentes en la preparación de armazones a través de una fase de gel, permitiendo así que se moldeen los armazones en formas deseables y que presenten un tamaño de poro y una porosidad deseables.

Técnica anterior

15 Para su utilización en el cultivo de tejidos biológicos, se requiere básicamente que los polímeros presenten biocompatibilidad y biodegradabilidad. Los poliésteres alifáticos que llevan ácido láctico o ácido glicólico como unidad de la estructura principal se aprobaron como satisfactorios según los requisitos de la Food and Drug Administration (FDA), EE.UU., y son los más utilizados en la actualidad. Los ejemplos de tales poliésteres alifáticos, biocompatibles y biodegradables incluyen poli(ácido láctico) (PLA) poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(caprolactona), poli(valerolactona), poli(hidroxibutirato), poli(hidroxivalerato), etc.

Habiéndose probado que son biocompatibles, se han utilizado mucho los poliésteres alifáticos como vehículos de administración de fármacos o suturas durante un periodo prolongado de tiempo.

25 Se ha descubierto que PLGA proporciona polímeros biodegradables con diversos periodos de degradación controlando la razón de monómero de ácido láctico y monómero de ácido glicólico y/o modificando el procedimiento de síntesis de los mismos.

30 Además de la biodegradabilidad y la biocompatibilidad, otros requisitos para los polímeros para el cultivo de tejidos biológicos son un área superficial lo suficientemente grande como para permitir la adhesión celular a altas densidades, un tamaño de poro lo suficientemente grande como para facilitar la vascularización en el tejido cultivado tras su trasplante en un huésped y la transmisión de sustancias, tales como nutrientes, factores de crecimiento y hormonas, y la interconectividad de los poros.

35 Normalmente, los armazones poliméricos porosos que satisfacen los requisitos anteriores se preparan como se expone a continuación.

40 Los armazones más populares y disponibles comercialmente son los constituidos por suturas de PGA (malla de fibra de PGA no tejida). Se realizan en formas tridimensionales mediante tratamiento térmico de sutura enredados aleatoriamente. La malla muestra una porosidad muy elevada y un tamaño de poro suficientemente grande además de una alta interconectividad, pero encuentra una gama limitada de aplicaciones debido a una mala resistencia mecánica (véanse: A. G. Mikos, Y. Bao, L. G. Cima, D. E. Ingber, J. P. Vacanti, y R. Langer, J. Biomed. Mater. Res. (1993) 27, 183-189).

45 Otro procedimiento de preparación de los armazones poliméricos porosos es de lixiviación de materiales particulados, apoyado por A. G. Mikos *et al.* (Véanse: A. G. Mikos, G. Sarakinos, S. M. Leite, J. P. Vacanti, y R. Langer, Biomaterials (1993) 14, 5, 323-330; A. G. Mikos, A. J. Thorsen, L. A. Czerwonka, Y. Bao, R. Langer, D. N. Winslow, y J. P. Vacanti, Polymer (1994) 35, 5, 1068-1077). El procedimiento de lixiviación de materiales particulados presenta la ventaja que consiste en el control fácil de los tamaños de poro de los armazones dependiendo del tamaño de la sal (NaCl) empleada, pero presenta una desventaja, porque las sales que permanecen en los armazones o su morfología rugosa producen daño celular.

55 Además, puede usarse un procedimiento de liofilización en emulsión y un procedimiento de expansión de gas a alta presión para la preparación de dichos armazones (véanse: k. Whang, C. H. Thomas, K. E. Healy, G. Nuber, Polymer (1995) 36, 4, 837-842; J. J. Mooney, D. F. Baldwin, N. P. Suh, J. P. Vacanti, y R. Langer, Biomaterials (1996) 17, 1417-1422). A pesar de sus propias ventajas, los procedimientos presentan la limitación de que existen dificultades para preparar poros celulares abiertos.

60 Recientemente, se han realizado intentos para construir los armazones aprovechándose de la separación de fases de las disoluciones poliméricas (H. Lo, M. S. Ponticiello, K. W. Leong, Tissue Eng. (1995) 1, 15-28; H. Lo, S. Kadiyala, S. e. Guggino, K. W. Leong, J. Biomed. Mater. Res. (1996) 30, 475-484; Ch. Schugens, V. Maguet., Ch. Grandfils, R. Jerome, Ph. Teyssie, J. Biomed. Mater. Res. (1996) 30, 449-461).

65 Tal como se mencionó anteriormente, se han desarrollado diversos procedimientos para la preparación de armazones poliméricos tridimensionales en los que puede inducirse la adhesión y diferenciación celular. No obstante, siguen detectándose problemas que han de solucionarse en la preparación de armazones tridimensionales para cultivo tisular con polímeros biodegradables. En la actualidad, sólo unas cuantas empresas, tales como Advanced Tissue Science Inc.

y Texas Biotechnology Inc. han tenido éxito en la comercialización de tales armazones, en los que se utiliza la sutura de PGA a pequeña escala.

Descripción de la invención

5

Un objetivo de la presente invención consiste en superar los problemas anteriores encontrados en las técnicas anteriores y proporcionar un procedimiento para preparar armazones porosos, tridimensionales, biodegradables para cultivo tisular, mediante el cual pueden moldearse los armazones en formas deseables y presentar tamaños de poro y porosidades deseables.

10

Basándose en la presente invención, puede obtenerse el objetivo anterior mediante la provisión de un procedimiento para preparar armazones porosos, tridimensionales, biodegradables para cultivo tisular, que comprende las etapas siguientes que consisten en disolver un polímero biodegradable en un disolvente orgánico para preparar una disolución polimérica de alta viscosidad, mezclar homogéneamente una sal efervescente en la disolución polimérica para dar un gel mixto de polímero/sal/disolvente orgánico, eliminar el disolvente orgánico del gel mixto de polímero/sal/disolvente orgánico, sumergir la suspensión de gel de polímero libre de disolvente orgánico/sal en una disolución ácida o disolución acuosa caliente para hacer que la sal resulte efervescente a temperatura ambiente para producir una estructura polimérica tridimensional, y lavar con agua destilada y liofilizar la estructura polimérica.

15

Breve descripción de los dibujos

20

Los anteriores y otros objetivos, características y otras ventajas de la presente invención se pondrán más claramente de manifiesto a partir de la siguiente descripción detallada haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

25

La figura 1 es una fotografía de SEM que muestra la estructura de superficie (1a) y la estructura en sección transversal del armazón basado en poli(ácido L-láctico) preparado en el ejemplo I;

30

La figura 2a es una fotografía de SEM que muestra la estructura de superficie del armazón basado en poli(ácido L-láctico) preparado utilizando una razón en peso de sal:polímero de 10:1 en el ejemplo II y la figura 2b es una fotografía ampliada de la figura 2a;

35

La figura 2c es una fotografía de SEM que muestra la estructura de superficie del armazón basado en poli(ácido L-láctico) preparado utilizando una razón en peso de sal:polímero de 20:1 en el ejemplo II y la figura 2d es una fotografía ampliada de la figura 2c;

40

La figura 3 es una fotografía de SEM ampliada que muestra la superficie del armazón poroso basado en poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) preparado en el ejemplo III;

La figura 4a es una fotografía de SEM que muestra la superficie del armazón poroso basado en poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) de 2 mm de espesor con un diámetro de 10 mm, preparado en el ejemplo IV y la figura 4b es una fotografía ampliada de la figura 4a;

45

La figura 4c es una fotografía de SEM que muestra la superficie del armazón poroso basado en poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) de 5 mm de espesor con un diámetro de 10 mm, preparado en el ejemplo IV y la figura 4d es una fotografía ampliada de la figura 4c;

50

La figura 5a es una fotografía de SEM que muestra la sección transversal del armazón poroso basado en poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) de 2 mm de espesor con un diámetro de 10 mm y la figura 5b es una fotografía ampliada de la figura 5a;

La figura 5c es una fotografía de SEM que muestra la sección transversal del armazón poroso basado en poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) de 5 mm de espesor con un diámetro de 10 mm y la figura 5d es una fotografía ampliada de la figura 5c;

55

La figura 6 es una fotografía de SEM que muestra los hepatocitos de rata que se han inoculado sobre el armazón poroso de la figura 3 y cultivado durante 7 días; y

La figura 7 es una microfotografía óptica que muestra la distribución de hepatocitos viables tras un ensayo de MTT para la determinación de la viabilidad de las células cultivadas.

60

Mejores modos de poner en práctica la invención

65

Antes de que se dé a conocer o se describa el presente procedimiento de preparación (título de la invención), ha de entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria es con el fin de describir formas de realización particulares únicamente y no pretende ser limitativo. Debe observarse que, tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

ES 2 291 189 T3

A lo largo de esta solicitud, en la que se hace referencia a publicaciones, se incorporan a la presente memoria las descripciones de estas publicaciones en su totalidad como referencia en esta solicitud con el fin de describir con mayor detalle el estado de la técnica a la que se refiere esta invención.

5 En la presente invención, la preparación de armazones porosos, tridimensionales, biodegradables y biocompatibles para cultivo tisular se basa en la separación de fases y la lixiviación de materiales particulados. En primer lugar, se disuelve un polímero biodegradable y biocompatible en un disolvente inorgánico para dar una disolución altamente concentrada con alta viscosidad. Opcionalmente, la disolución polimérica se mezcla adicionalmente con un disolvente orgánico que no disuelve el polímero, de modo que se concentra la disolución en una fase de gel de una disolución concentrada. Haciendo esto, es posible preparar armazones poliméricos porosos incluso con polímeros de bajo peso molecular, biodegradables que no pueden usarse convencionalmente como materiales debido a que sus disoluciones son de baja viscosidad incluso a altas concentraciones. Después, se mezcla homogéneamente la disolución polimérica con una sal efervescente, seguido de la eliminación del disolvente orgánico del gel mixto de polímero/sal/disolvente orgánico resultante. Al sumergir la suspensión de gel de polímero libre de disolvente orgánico/sal en una disolución ácida o disolución acuosa caliente se produce la efervescencia de la sal, dando como resultado una estructura porosa. Posteriormente, se lava esta estructura con agua destilada y se liofiliza para producir un armazón, que es adecuado para el cultivo celular o tisular.

20 Resulta útil como el polímero biodegradable y biocompatible en la presente invención uno seleccionado de entre el grupo constituido por poli(ácido L-láctico) (PLLA), poli(ácido D,L-láctico) amorfo (PDLLA), poli(ácido glicólico), poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(caprolactona), poli(hidroxibutirato) y copolímeros de estos polímeros. Pueden utilizarse independientemente de su peso molecular, pero se obtienen mejores resultados a partir de los de peso molecular comprendido en el intervalo entre 5.000 y 500.000.

25 Los ejemplos del disolvente orgánico para su utilización para disolver los polímeros biodegradables incluyen cloruro de metileno, cloroformo, acetona, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, N-metilpirrolidona, dioxano, tetrahydrofurano, acetato de etilo, metiletilcetona y acetonitrilo. Se ponen como ejemplos del disolvente orgánico, que no puede disolver el polímero biodegradable, usado para la concentración de la disolución polimérica, mediante etanol, metanol, etanol acuoso, etil éter, dietil éter, hexano, éter de petróleo y éter de petróleo acuoso.

30 Con un tamaño de 100-500 μm , la sal efervescente se selecciona de entre el grupo constituido por carbonato de amonio, bicarbonato de amonio, carbonato de sodio y bicarbonato de sodio. Se prefiere utilizar la sal a una cantidad tal que la razón en peso del polímero con respecto a la sal efervescente pueda estar en el intervalo de 1:1 a 1:100.

35 Dependiendo del disolvente orgánico que queda en el gel mixto de polímero/sal/disolvente orgánico, pueden utilizarse diversos procedimientos para eliminar el disolvente orgánico. Los disolventes orgánicos con puntos de ebullición relativamente bajos, tales como cloruro de metileno, cloroformo y dioxano, se eliminan mediante secado a presión normal o al vacío mientras que los disolventes de alto punto de ebullición, tales como dimetilsulfóxido (DMSO) y metilpirrolidona, se sustituyen por disolventes de bajo punto de ebullición, tales como etanol y metanol, antes de secarse a presión atmosférica o al vacío.

45 Con el fin de que se produzca la efervescencia de la sal de la suspensión de polímero/sal efervescente, se usan disoluciones acuosas ácidas o de agua destilada calientes. Ocupa un periodo prolongado de tiempo producir la efervescencia de la sal con agua destilada tibia. Si se eleva la temperatura del agua destilada, puede reducirse el tiempo de reacción. No es necesario que la temperatura esté particularmente limitada, sino que puede seleccionarse según el criterio de los expertos en la materia. Por otro lado, las disoluciones acuosas ácidas facilitan que se produzca la efervescencia de la sal a temperatura ambiente en un corto periodo de tiempo. Además, sus concentraciones afectan al tamaño de los poros formados en los armazones, de modo que el tamaño de poro puede estar bajo el control de la concentración. Por lo tanto, la efervescencia de la sal con las disoluciones acuosas ácidas hace posible evitar la termodistorsión del polímero y formar poros con tamaños deseables así como asentar dentro del armazón poroso los fármacos necesarios para el cultivo celular.

55 Está disponible, para la efervescencia de la presente invención, el ácido seleccionado de entre el grupo constituido por ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fórmico, ácido tartárico, ácido salicílico, ácido benzoico y ácido glutámico. Para su utilización, se disuelven estos ácidos hasta la concentración del 1% o sobresaturación en agua o en una disolución acuosa saturada con un disolvente orgánico, tal como cloruro de metileno, cloroformo, dioxano, dimetilsulfóxido (DMSO) y metilpirrolidona.

60 Puede obtenerse una mejor comprensión de la presente invención a partir de los ejemplos siguientes proporcionados a título ilustrativo y no limitativo de la presente invención.

Ejemplo I

Preparación de un armazón poroso a partir de poli(ácido L-láctico)

65 Se disolvió, en cloruro de metileno, PLLA con un peso molecular promedio en peso de 300.000 a una razón en peso de PLLA:cloruro de metileno de 1:6. Se aumentó la viscosidad de la disolución polimérica resultante mediante la evaporación del disolvente a presión atmosférica. A la disolución polimérica concentrada, se añadió bicarbonato

ES 2 291 189 T3

de amonio con una distribución de tamaño de 100-500 μm a una razón en masa de polímero:sal de 1:6, seguido de mezclado homogéneo para producir un gel de polímero/sal/disolvente.

Tras introducirse en un molde de latón que era de 3 mm de espesor con un diámetro de 25 mm, se privó al gel del disolvente cloruro de metileno mediante evaporación a la presión atmosférica. Se desalinizó la mezcla de polímero/sal separada del molde a vacío (9×10^{-6} Torr) durante 14 días y luego, se sumergió en agua destilada de 40°C para lixiviar por completo la sal restante.

Se secó el armazón polimérico libre de sal así obtenido en una secadora de vacío y se midió para determinar la porosidad y el volumen total de poros con la ayuda de un porosímetro de intrusión de mercurio (Porous Materials, Inc., Ithaca, NY). Se facilitan los resultados en la tabla 1, a continuación.

TABLA 1

Porosidad y volumen total de poros del armazón polimérico			
Sal:polímero (razón en peso)	Tamaño de la sal (μm)	Porosidad (%)	Volumen de poros (cm^3/g)
6:1	100-500	86,60	7,82

Utilizando un pulverizador catódico (Hummers, techniques U.S.A.), se recubrió el armazón polimérico con oro en una atmósfera de argón a 5 psi durante 5 min. bajo un campo eléctrico de 5 mA. Se fotografió el armazón para examinar su figura completa, las estructuras de superficie y en sección transversal, y la configuración de los poros internos mediante la utilización de microscopía electrónica de barrido (SEM) (Phillips 535M) y éstas se muestran en las figuras 1a y 1b.

Ejemplo II

Preparación de un armazón poroso a partir de poli(ácido L-láctico)

Se disolvió, en cloroformo, PLLA con un peso molecular promedio en peso de 300.000 a una razón en peso de PLLA:cloroformo comprendida entre 1:10 y 1:20. A las disoluciones poliméricas resultantes de alta viscosidad, se les añadieron partículas de bicarbonato de amonio con distribuciones de tamaño de 100-180 μm , 180-300 μm y 300-500 μm a razones en masa de polímero:sal de 1:10, 1:15 y 1:20 respectivamente, seguido de mezclado homogéneo para producir geles de polímero/sal/disolvente.

Tras introducirse en un molde de Teflon que era de 1,1 mm de espesor con un diámetro de 5 mm, se privó cada gel del disolvente cloruro de metileno mediante evaporación a la presión atmosférica. Se sumergieron las mezclas de polímero/sal separadas del molde en 3 litros de agua destilada mantenida a 90°C para producir la efervescencia de las sales para dar armazones poliméricos. Se secaron los armazones poliméricos libres de sal así obtenidos en una secadora de vacío.

Utilizando un pulverizador catódico (Hummers, techniques U.S.A.), se recubrieron los armazones poliméricos con oro en una atmósfera de argón a 5 psi durante 5 min. bajo un campo eléctrico de 5 mA. Se fotografió el armazón para examinar su figura completa, las estructuras de superficie y en sección transversal, y la configuración de los poros internos mediante la utilización de microscopía electrónica de barrido (SEM) (Phillips 535M) y se muestran las estructuras de superficie y de sección transversal de los armazones poliméricos en la figura 2. Las figuras 2a y 2b son para el armazón que utiliza la razón en masa de PLLA:sal de 1:10, mientras que las figuras 2c y 2d son para la razón en masa de PLLA:sal de 1:20. Tal como se observa en estas fotografías, las razones de sal superiores dan como resultado tamaños de poro mayores.

Se analizó el cambio de las propiedades térmicas en el armazón polimérico con la ayuda de un calorímetro diferencial de barrido, tal como el vendido por DuPont, identificado como modelo 2000, mientras se elevó la temperatura del armazón a una velocidad de elevación de 10°C/min desde -10°C hasta 200°C.

En una primera tanda de calentamiento, se midieron el armazón polimérico y un polvo de polímero preparado del mismo material para determinar el punto de fusión (T_f) y el cambio de entalpía (ΔH_f) en el punto de fusión mientras se realizó una medición de la temperatura de transición vítrea (T_g) en una segunda tanda de calentamiento. Se facilitan los resultados en la tabla 2, a continuación. Tal como resulta evidente a partir de los datos, no se encontraron diferencias tan grandes en las propiedades térmicas de interés entre el armazón polimérico y el polvo de PLLA, lo que indica que las propiedades térmicas del polímero no se alteran durante la preparación del armazón polimérico.

TABLA 2

Propiedades térmicas del armazón polimérico			
Materiales	Tg (°C)	Tf (°C)	Entalpía (J/g)
Polvo de polímero	62,65	177,17	34,50
Armazón	62,47	177,55	34,36

Con la ayuda de un porosímetro de intrusión de mercurio, se midieron los armazones poliméricos libres de sal para determinar la porosidad y el volumen total de poros, y se facilitan los resultados en la tabla 3, a continuación.

TABLA 3

Porosidades y volúmenes de poros de los armazones poliméricos				
Polímero: sal (razón en peso)	Tamaño de la sal (μm)	Porosidad* (%)	Porosidad** (%)	Volumen de poros (cm^3/g)
10:1	100-180	90,57	89,21	11,42
10:1	180-300	92,04	89,89	12,62
15:1	180-300	93,61	91,96	15,18
20:1	180-300	95,12	93,49	19,21
10:1	300-500	93,52	91,15	11,94

* resultados de la medición de pesos y volúmenes de los armazones

** resultados de la medición de un porosímetro de intrusión de mercurio

Los datos de la tabla 3 demuestran que la porosidad y el volumen total de poros del armazón aumentan con la razón de sal creciente, pero no dependen mucho del tamaño de la sal utilizada.

También se realizó una medición de la compresión del módulo de los armazones poliméricos porosos preparados anteriormente. A este respecto, se usó el aparato Instron 5538 para hacer descender una celda de carga de 10 newton (N) a una velocidad de 2 mm/min verticalmente sobre una muestra de armazón, que tenía una forma cilíndrica de 12 mm de altura con un diámetro de 6 mm según la norma ASTM F451-95. Se facilitan los resultados, junto con la porosidad, en la tabla 4, a continuación.

TABLA 4

Compresión del módulo del armazón polimérico		
Polímero: sal (razón en peso)	Porosidad* (%)	Compresión del módulo (kPa)
10:1	90,68	243 \pm 32,5
20:1	95,20	65,8 \pm 5,4

Resulta evidente a partir de los datos de la tabla 4 que disminuye la compresión del módulo del armazón polimérico a medida que aumenta la porosidad. Se obtuvo una excelente compresión del módulo cuando la razón en masa de sal con respecto a PLLA era de 10:1.

Ejemplo de Prueba I

Para confirmar la idoneidad del cultivo celular tridimensional del armazón polimérico, poroso preparado en el ejemplo 2, se transplantaron hepatocitos de rata en el armazón polimérico, poroso según la enseñanza de Mooney (P. M. Kaufmann, S. Heimrath, B. S. Kim, D. J. Mooney, Cell Transplantation (1997) 6, 5, 463-468). Se midió que la

ES 2 291 189 T3

eficacia de trasplante era de aproximadamente el 90-98%, lo que indica que el armazón poroso es de una estructura adecuada para el trasplante celular. Se facilitan resultados detallados en la tabla 5, a continuación.

Se realizó un ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) para analizar la actividad de los hepatocitos adheridos al armazón. Con este fin, se cultivaron las células durante 24 horas a 37°C a presión atmosférica en una atmósfera mixta del 95% de O₂ y el 5% de CO₂. Cuando se transplantaron los hepatocitos a una población de 7x10⁴ células/dispositivo, la actividad fue de aproximadamente el 40%, mientras que una población de 4,8x10⁵ células/dispositivo dio como resultado el 30%. Así, se disminuyó gradualmente la actividad de los hepatocitos a medida que se trasplantaban mayores números de células.

Siguiendo técnicas bien conocidas (P. O. Seglen, *Methods Cell. Biol.* (1976) 13, 29-83; J. C. Y. Dunn, R. G. Tompkins, M. L. Yarmush, *Biotechnol. Prog.* (1991) 7, 237-245), se realizó un examen de la viabilidad de los hepatocitos de rata. Tras separarse del armazón polimérico poroso, se encontró que las células mostraban una viabilidad de aproximadamente el 90% tal como se mide mediante una prueba de exclusión de azul tripano.

TABLA 5

Eficacia de trasplante de las células				
Nº de células/dispositivo	7x10 ⁴	1,4x10 ⁵	2,8x10 ⁵	4,8x10 ⁵
Eficacia(%)	93,97 ± 0,22	90,29 ± 1,31	97,72 ± 0,82	97,93 ± 0,82

Ejemplo III

Preparación de un armazón poroso a partir de poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) mediante una disolución polimérica

Se disolvió en cloroformo, poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA) 65/35 con un peso molecular promedio en peso de 180.000, a una cantidad del 30% en peso. A la disolución polimérica resultante de alta viscosidad, se le añadieron partículas de bicarbonato de amonio comprendidas, en tamaño, entre 180 y 300 μm, a razones en masa de polímero:sal de 1:10, 1:15 y 1:20, respectivamente, seguido de mezclado homogéneo para producir geles de polímero/sal/disolvente.

Tras introducirse en un molde de Teflon de 2 mm de espesor con un diámetro de 5 mm, se privó cada gel del disolvente cloruro de metileno mediante evaporación a presión atmosférica. Se mezcló cada una de las mezclas de polímero/sal separadas del molde en 3 litros de disoluciones de ácido cítrico de diversas concentraciones (20%, 40%, 60%, sobresaturada), y se agitó para producir la efervescencia de la sal. Tras la finalización de la efervescencia, se retiraron los armazones poliméricos porosos así preparados, se lavaron con agua destilada y se secaron en una secadora de vacío.

Con la ayuda de una porosimetría de intrusión de mercurio (Porous Materials Inc., Ithaca, NY), se midieron los armazones para determinar la porosidad y el volumen total de poros, y se resumen los resultados en la tabla 6, a continuación.

TABLA 6

Porosidad y volumen de poros del armazón polimérico			
Conc. de ácido cítrico (%)	Diámetro de poro (μm)	Volumen de poros (cc/g)	Porosidad (%)
20	122,03 ± 22,56	8,0603	98,03
40	149,49 ± 36,24	8,396	98,04
60	163,44 ± 0,74	9,2803	98,11
Sobresaturada	186,24 ± 22,86	9,9842	98,64

ES 2 291 189 T3

Se realizó una observación de las figuras completas y estructuras de superficie y de sección transversal de los armazones, y la configuración de sus poros internos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (Phillips 535M) y los resultados se proporcionan en la figura 3.

5 Antes de la observación, se recubrieron los armazones poliméricos con oro en una atmósfera de argón a 5 psi durante 5 min. en un campo eléctrico de 5 mA usando un pulverizador catódico (Hummers, techniques U.S.A.).

10 También se realizó una medición de la compresión del módulo de los armazones poliméricos porosos preparados anteriormente. A este respecto, se usó el aparato Istron 5538 para hacer descender una celda de carga de 10 newton (N) a una velocidad de 2 mm/min. verticalmente sobre una muestra de armazón, que presentaba un forma cilíndrica de 12 mm de altura con un diámetro de 6 mm según la norma ASTM F451-95. Se proporcionan los resultados, junto con la porosidad, en la tabla 7, a continuación.

15 TABLA 7

Porosidad y compresión del módulo del armazón polimérico		
Sal:polímero (razón en peso)	Porosidad (%)	Compresión del módulo (kPa)
10:1	98,64	29,24 ± 0,40
15:1	98,92	16,45 ± 7,75
20:1	99,11	11,91 ± 0,54

20 Tal como se demuestra en la tabla 6, concentraciones más altas de ácido cítrico hacen que la sal experimente más reacción de efervescencia activa, dando como resultado un mayor aumento del tamaño de poro y la porosidad. Además, se reconoce también a partir de los datos de la tabla 7 que, aumentando la razón de sal con respecto al polímero da como resultado el aumento de la porosidad mientras se reduce la compresión del módulo del armazón polimérico. Es decir, un aumento de la porosidad conduce a una reducción en la compresión del módulo del armazón poroso.

35

Ejemplo IV

40 *Preparación de un armazón poroso a partir de poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) mediante precipitación polimérica*

Se añadió una disolución de poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA) 65/35, tal como se usó en el ejemplo III, en cloroformo con un exceso de etanol, y se dejó reposar durante 10 min. para precipitar el polímero. Tras la concentración, el precipitado polimérico se mantuvo en sí en una fase de gel.

45 Al precipitado polimérico libre de etanol, se le añadieron partículas de bicarbonato de amonio comprendidas, en tamaño, entre 180 y 300 μm , a una razón en masa de polímero:sal de 1:10. La suspensión de gel de polímero/sal/disolvente preparada contenía una cantidad incluso menor de disolvente orgánico que la que contenía la del ejemplo III.

50 Tras introducirse en dos moldes de Teflon que eran de 2 mm y 5 mm de espesor con un diámetro de 5 mm respectivamente, se privó al gel el disolvente mediante evaporación a presión atmosférica. Se mezclaron las mezclas de polímero/sal separadas de los moldes en 3 litros de disolución sobresaturada de ácido cítrico y se agitaron para producir la efervescencia de la sal. Tras la finalización de la efervescencia, se retiraron los armazones poliméricos porosos así preparados, se lavaron con agua destilada y se secaron en una secadora de vacío.

55

Se realizó una observación de las figuras completas, y las estructuras de superficie y de sección transversal de los armazones, y la configuración de sus poros internos, mediante un microscopio electrónico de barrido, tal como en el ejemplo III y se facilitan los resultados en las figuras 4 y 5. Tal como se muestra en estas figuras, los armazones porosos preparados según la invención presentan poros de tamaños uniformes superiores en interconectividad y distribuidos uniformemente a lo largo de los mismos independientemente de los tamaños de poro.

60

Ejemplo V

65 Se prepararon armazones poliméricos porosos de maneras similares a la del ejemplo IV, con la excepción de que se usaron PLGA 50/50 y PLGA 75/25 en lugar del polímero biodegradable PLGA 65/35. Con ayuda de una porosimetría de intrusión de mercurio, se midieron los armazones poliméricos para determinar su porosidad, diámetro de poro y área superficial, y se proporcionan los resultados en la tabla 8, a continuación.

ES 2 291 189 T3

TABLA 8

Diámetro de poro, porosidad y área superficial del armazón polimérico			
Armazón	Diámetro de poro (μm)	Porosidad (%)	Área superficial (m^2/g)
PLGA 50:50 (3 mm)	121,59	86,60	89,21
PLGA 65:35 (3 mm)	206,4	89,21	89,89
PLGA 65:35 (3 mm)	210,51	88,73	91,96
PLGA 75:25 (3 mm)	199,27	89,89	93,49
PLGA 75:25 (3 mm)	208,71	91,96	91,15

A partir de los resultados de la tabla 8, resulta evidente que no existen grandes diferencias en la porosidad y el volumen total de poros entre los armazones poliméricos porosos preparados mediante precipitación polimérica y disolución polimérica.

El procedimiento descrito en el ejemplo IV presenta una ventaja sobre el del ejemplo III, porque están contenidas cantidades incluso más pequeñas de disolventes orgánicos en los geles de polímero/sal/disolvente inorgánico y, pueden eliminarse así más fácilmente, permitiendo de esta manera introducir de manera eficaz diversos fármacos en su interior, posteriormente.

Ejemplo de Prueba II

Cultivo celular utilizando un armazón poroso de poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico)

Para confirmar la idoneidad del cultivo celular tridimensional de los armazones poliméricos, porosos preparados, se trasplantaron hepatocitos de rata en el armazón polimérico, poroso según una técnica bien conocida (P. M. Kaufmann, *et al.*, Cell Transplantation (1997) 6, 5, 463-468) y se cultivaron durante 7 días (figura 6). El número de los hepatocitos que iban a trasplantarse estaba en el intervalo de 7×10^4 a 8×10^4 por armazón poroso. Se descubrió que tantos hepatocitos como en este intervalo presentaban una eficacia de trasplante de aproximadamente el 90-95%. Se creyó que esto resultaba de la distribución uniforme de los hepatocitos introducidos sobre los armazones porosos que eran superiores en la interconectividad entre los poros. Se incubaron los armazones poliméricos porosos, en los que se trasplantaron los hepatocitos, durante 7 días a 37°C en presencia de CO_2 al 5%, en una incubadora, para examinar la viabilidad de las células. A este respecto, se realizó un ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,4-difeniltetrazolio). Tal como se muestra en la figura 7, se distribuyeron uniformemente células viables sobre toda la estructura de armazón.

En la tabla 9, a continuación, se facilita la viabilidad celular para 7 días de incubación, junto con la cantidad de albúmina secretada, un indicador de la función de diferenciación de los hepatocitos.

TABLA 9

Viabilidad celular y cantidad de albúmina secretada de los hepatocitos cultivados en armazones poliméricos porosos durante 7 días

Nº de células inoculadas ($10^4/\text{armazón}$)	Viabilidad (% del nº de células viables en la fase inicial)	Cantidad de albúmina secretada (pg/célula)
14	37,924504	46,690272 \pm 4,049649
28	26,150778	35,523805 \pm 6,834733
42	25,298302	37,590655 \pm 2,815256
56	23,543620	34,181293 \pm 0,199821

Según los datos de la tabla 9, se redujo el número de células viables en aproximadamente el 20-30% tras la incubación de 7 días en el armazón polimérico poroso y disminuyen tanto la viabilidad como la secreción de albúmina de los hepatocitos cultivados en el armazón a medida que aumenta el número de las células inoculadas.

5 Aplicabilidad industrial

Tal como se describió anteriormente en la presente memoria, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar armazones poliméricos porosos, biodegradables y biocompatibles que son tan porosos e interconectables entre poros como para alojar y cultivar células aisladas de los tejidos que van a regenerarse artificialmente *in vitro*, tales como cartílago, hueso, hígado, válvula cardíaca, tracto gastrointestinal, conducto uretral, etc. Los armazones sirven como matrices excelentes para el cultivo artificial de diversos cultivos.

Además, basándose en la formación de poros mediante la efervescencia de sales en los geles preparados a partir de mezclas de polímero de poliéster biodegradable y sal efervescente, el procedimiento presenta la ventaja de controlar fácilmente el tamaño de poro y la porosidad de los armazones poliméricos, porosos tridimensionales controlando la cantidad y el tamaño de las sales efervescentes y la concentración de las disoluciones acuosas ácidas, mediante lo cual se inducen la efervescencia y la lixiviación de las sales.

La presente invención se ha descrito de una manera ilustrativa, y ha de entenderse que la terminología pretende ser de naturaleza descriptiva en lugar de limitativa. Son posibles muchas modificaciones y variaciones de la presente invención en vista de las enseñanzas anteriores. Por lo tanto, se entiende que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la invención puede ponerse en práctica de manera diferente a la descrita específicamente.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 291 189 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para preparar un armazón polimérico, poroso, biodegradable y biocompatible para la ingeniería tisular, que comprende las etapas que consisten en:

disolver un polímero biodegradable en un disolvente orgánico para preparar una disolución polimérica de alta viscosidad;

10 mezclar de manera homogénea una sal efervescente en la disolución polimérica para proporcionar un gel mixto de polímero/sal/disolvente orgánico;

eliminar el disolvente orgánico del gel mixto de polímero/sal/disolvente orgánico;

15 sumergir la suspensión de gel de polímero/sal libre de disolvente orgánico en una disolución ácida o disolución acuosa caliente para producir la efervescencia de la sal a temperatura ambiente para proporcionar una estructura polimérica tridimensional; y

lavar con agua destilada y liofilizar la estructura polimérica.

20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además la etapa que consiste en precipitar y concentrar el polímero en un disolvente orgánico que no disuelve el polímero, tras la etapa que consiste en disolver.

25 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polímero biodegradable es de un poliéster alifático seleccionado de entre el grupo constituido por poli(ácido L-láctico), poli(ácido D,L-láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico), poli(caprolactona), poli(hidroxibutirato) y copolímeros de estos polímeros.

30 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el disolvente orgánico para su utilización en la disolución del polímero biodegradable se selecciona de entre el grupo constituido por cloruro de metileno, cloroformo, acetona, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, N-metilpirrolidona, dioxano, tetrahidrofurano, acetato de etilo, metiletilcetona y acetonitrilo.

35 5. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el disolvente orgánico que no puede disolver el polímero se selecciona de entre el grupo constituido por agua, etanol, metanol, etanol acuoso, etil éter, dietil éter, hexano, éter de petróleo y éter de petróleo acuoso.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la sal efervescente se selecciona de entre el grupo constituido por carbonato de amonio, bicarbonato de amonio, carbonato de sodio y bicarbonato de sodio.

40 7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la disolución acuosa, ácida, para su utilización en la producción de efervescencia de la sal en la suspensión de gel de mezcla de polímero/sal, es una disolución acuosa de ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fórmico, ácido tartárico, ácido salicílico, ácido benzoico y ácido glutámico.

45 8. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 3, en el que el polímero biodegradable está comprendido en el intervalo, en peso molecular, entre 5.000 y 500.000.

9. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 6, en el que la sal efervescente está comprendida en el intervalo, en tamaño de partícula, entre 100 y 500 μm .

50 10. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 6, en el que se añade la sal efervescente en una cantidad tal que la razón en peso de la sal con respecto al polímero puede estar comprendida en el intervalo entre 1:1 y 1:100.

55 11. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 7, en el que la disolución acuosa, ácida, se prepara disolviendo el ácido en agua o en una disolución acuosa saturada con un disolvente orgánico que puede disolver el polímero biodegradable, seleccionado de entre el grupo constituido por cloruro de metileno, cloroformo, acetona, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, N-metilpirrolidona, dioxano, tetrahidrofurano, acetato de etilo, metiletilcetona y acetonitrilo.

60 12. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 7, en el que la disolución acuosa, ácida, está comprendida en el intervalo, en concentración, entre 1% y sobresaturación.

Fig. 1(a)

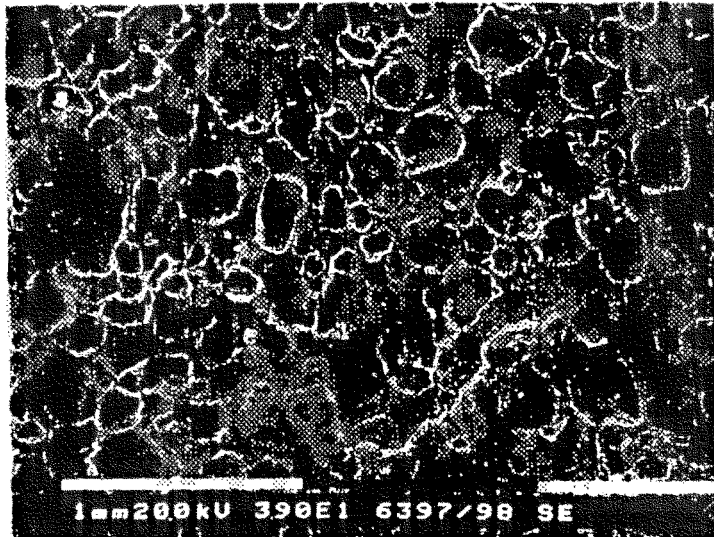


Fig. 1(b)

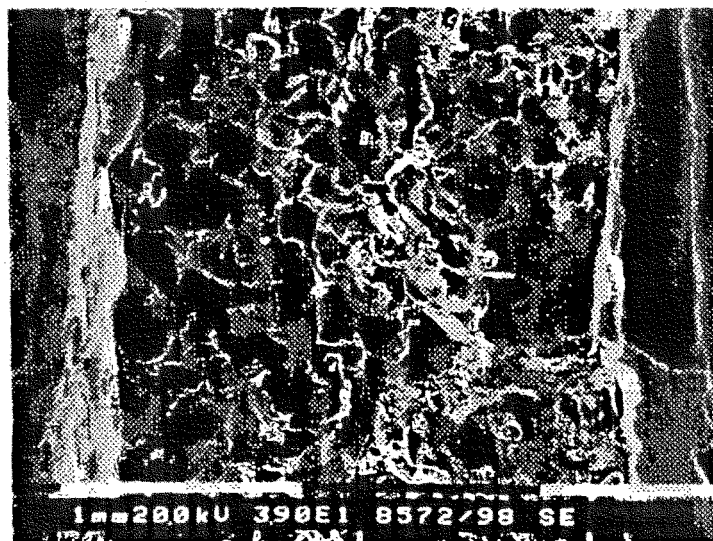


Fig. 2(a)

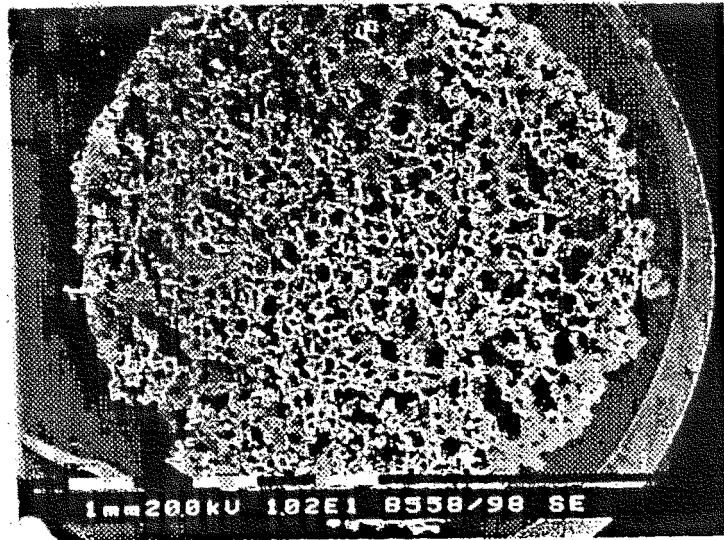


Fig. 2(b)

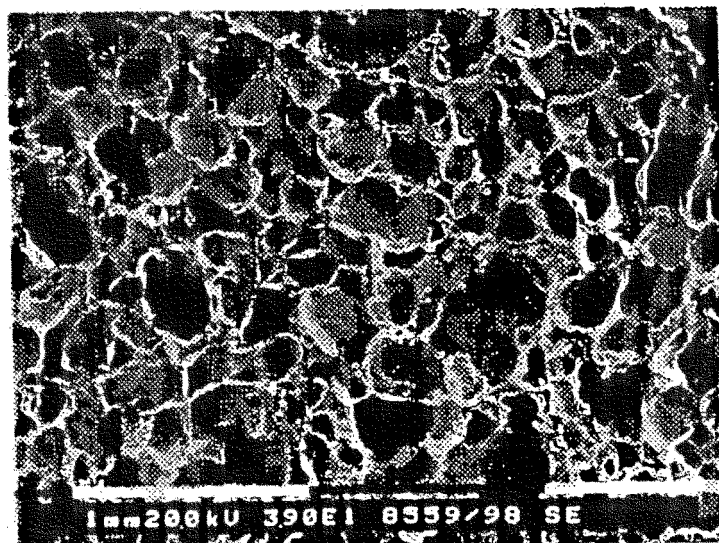


Fig. 2(c)

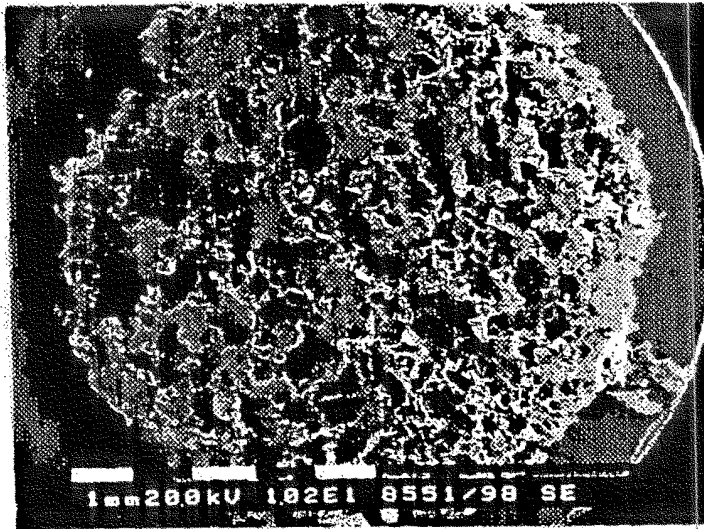


Fig. 2(d)

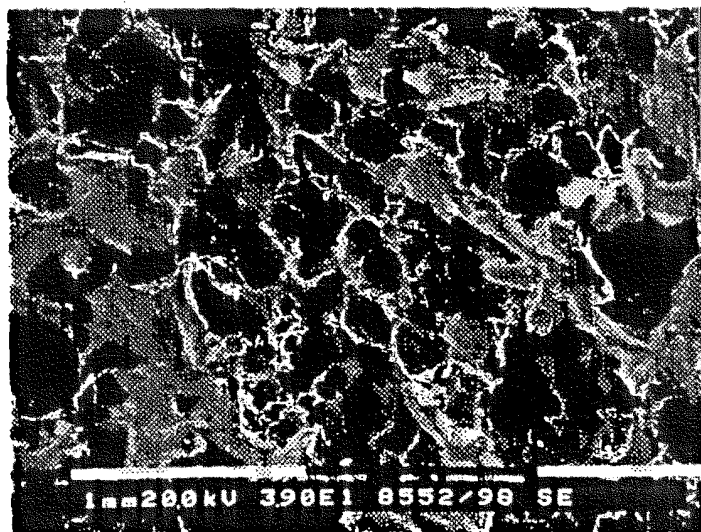


Fig. 3

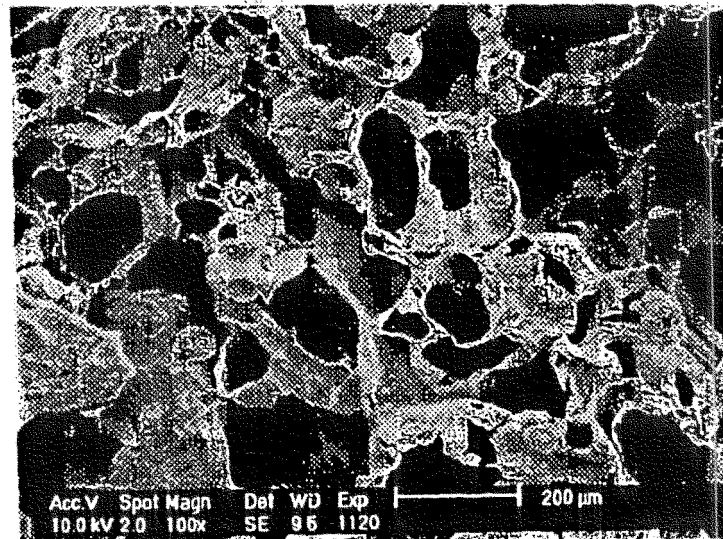


Fig. 4(a)

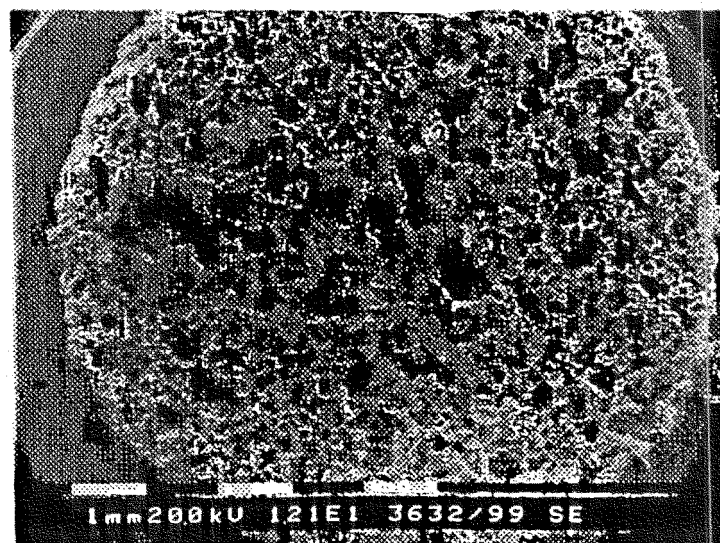


Fig 4(b).

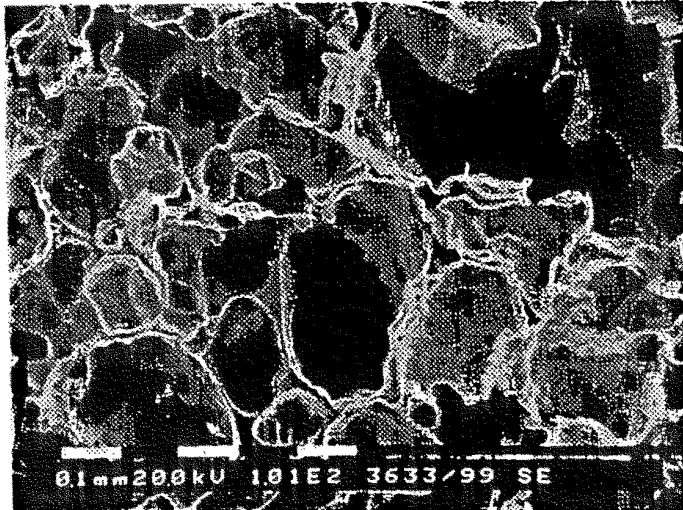


Fig. 4(c)

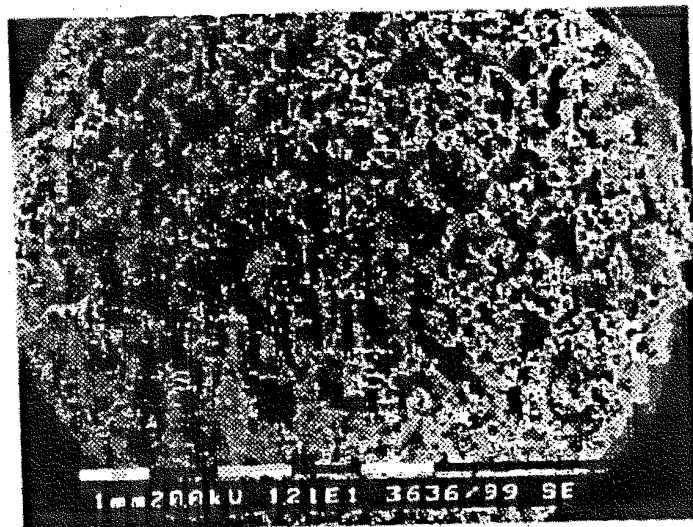


Fig. 4(d)

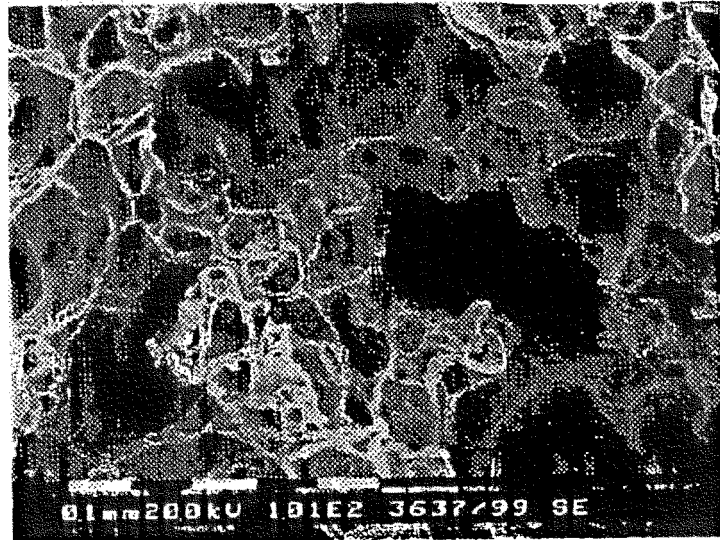


Fig. 5(a)

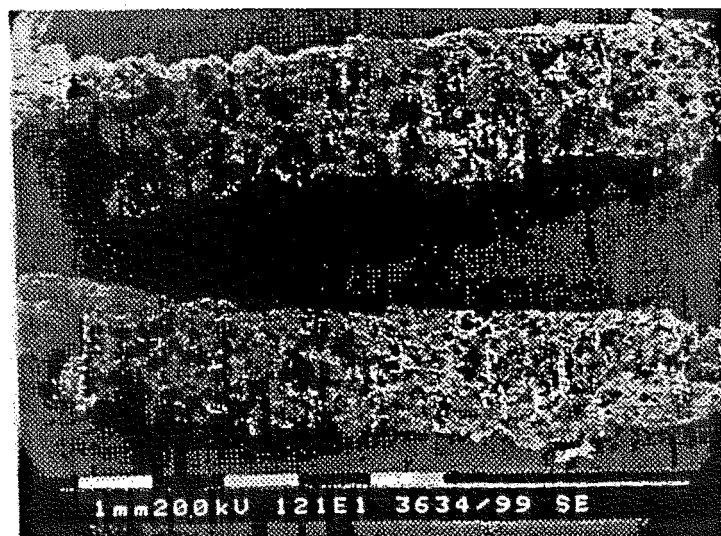


Fig. 5(b)

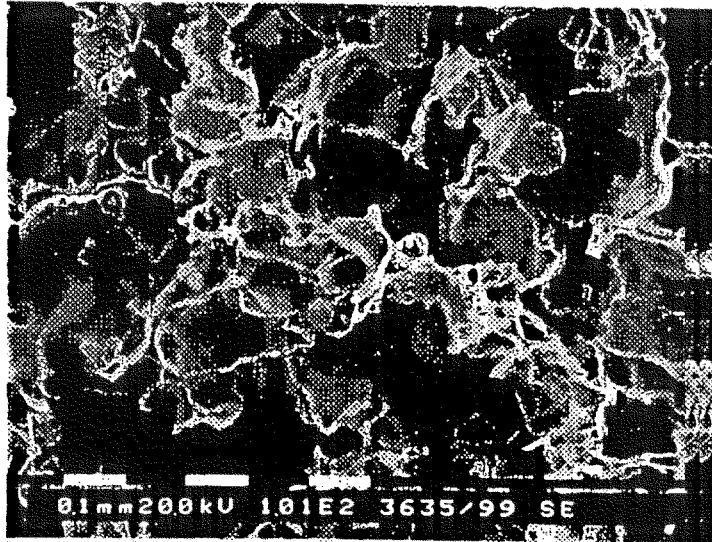


Fig. 5(c)

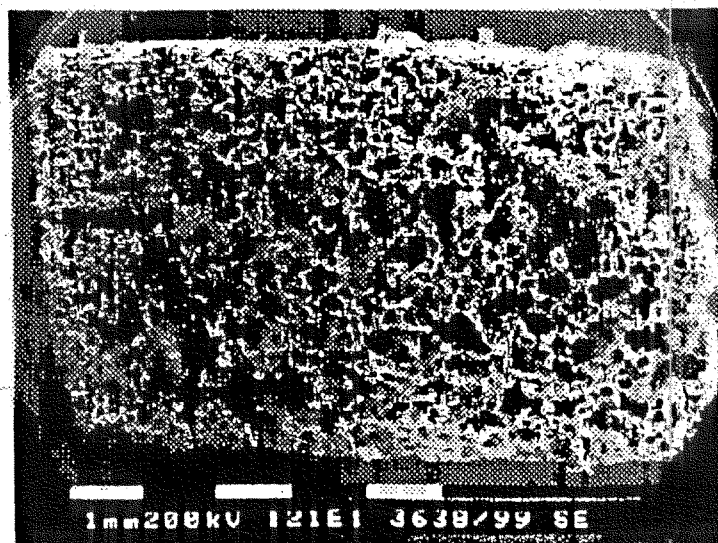


Fig. 5(d)

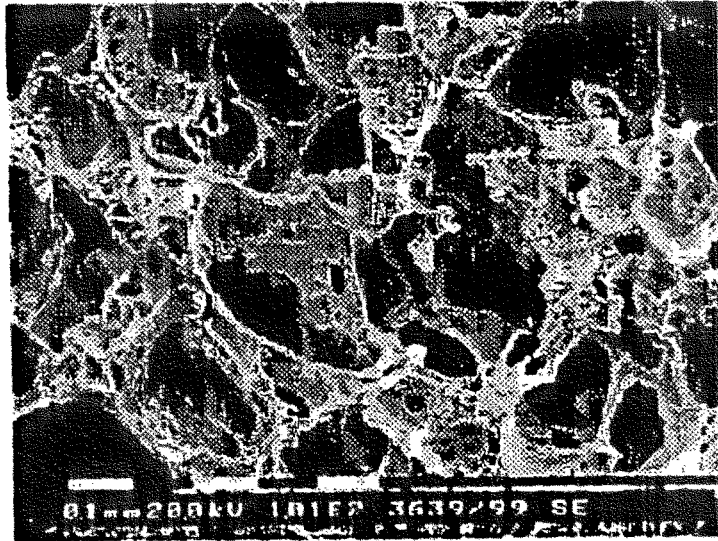


Fig. 6

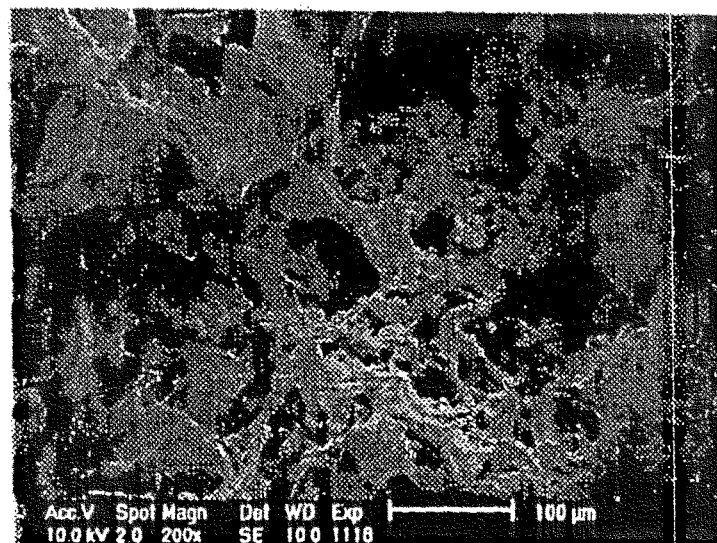


Fig. 7

