



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 338 820**

51 Int. Cl.:

C08G 63/664 (2006.01)

C08G 81/00 (2006.01)

C08J 9/00 (2006.01)

C08J 9/28 (2006.01)

A61L 27/18 (2006.01)

A61L 15/26 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07711258 .9**

96 Fecha de presentación : **07.03.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1996643**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2008**

54

Título: **Copolímeros en bloque hidrófilos degradables con biocompatibilidad mejorada para la regeneración de tejidos blandos.**

30

Prioridad: **09.03.2006 DK 2006 00337**
01.09.2006 DK 2006 01131
26.10.2006 PCT/EP2006/067837

73

Titular/es: **Coloplast A/S**
Holteham 1
3050 Humlebaek, DK

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.05.2010

72

Inventor/es: **Vange, Jakob;**
Schwach-Abdellaoui, Khadija;
Everland, Hanne;
Nielsen, Peter, Sylvest;
Nielsen, Brian;
Jespersen, Lene, Karin y
Nielsen, Lene, Feldskov

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.05.2010

74

Agente: **Polo Flores, Carlos**

ES 2 338 820 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

Copolímeros en bloque hidrófilos degradables con biocompatibilidad mejorada para la regeneración de tejidos blandos.

Ámbito de la invención

La presente invención se refiere a nuevos polímeros biodegradables, a materiales porosos y otros que comprenden tales polímeros y a diversos usos médicos de tales materiales.

Antecedentes de la invención

Las matrices tisular soporte son estructuras porosas a las cuales se pueden incorporar células. Generalmente están hechas de materiales biocompatibles degradables y se añaden al tejido para guiar la organización, crecimiento y diferenciación de las células en el proceso de formación de tejido funcional. Los materiales usados pueden ser de origen bien natural o bien sintético.

El poli(L-láctido) (PLLA), el poli(D/L-láctido) (PDLLA) y el poli(láctido-co-glicólido) (PLGA) se conocen desde hace tiempo como materiales degradables para implantes y todos ellos están aprobados por la FDA con este fin. Se han usado como matrices tisulares soporte para hueso, cartílago, hígado, piel, uretra, intestinos, tendones y tejidos cardiovasculares.

Un ejemplo típico de una de estas aplicaciones es la fabricación del polímero en forma de estructura porosa, a menudo mediante colada de disolvente/filtrado de partículas. A continuación, la estructura se moja previamente con etanol y se lava sucesivamente con agua. Esta etapa es necesaria porque estos polímeros son hidrófobos y los intentos por mojarlos directamente con agua fallan. La estructura mojada se siembra entonces con células y se dejan crecer en un bioreactor antes de la implantación.

También son conocidos los copolímeros de poliéteres y poliésteres. Éstos generalmente no se usan como matrices tisulares soporte, puesto que los polímeros que contienen PEG (polietilenglicol) son conocidos por resistir la adhesión de células y proteínas. Esta clase de polímeros se usan como vehículos en la administración de fármacos, para lo cual es útil la elevada hidrofilia y resistencia a la contaminación de la parte de poliéter.

El PLGA y los copolímeros de PEG y PLGA son conocidos por presentar una buena biocompatibilidad porque son no tóxicos para las células y no producen respuesta inflamatoria en el tejido. En el documento Zange y col., Journal of Controlled Release, 56, 1998, 249-258, se examina la biocompatibilidad de diversos copolímeros de PEG-PLGA con modelos *in vitro* y ninguno muestra efectos adversos de los polímeros en fibroblastos de ratones. Para que un polímero tenga un buen comportamiento en una matriz tisular soporte, una buena biocompatibilidad no es suficiente. Las células se tienen que adherir de forma eficaz al material. Se sabe que los polímeros que contienen PEG y las superficies recubiertas con PEG resisten la adhesión de células y proteínas.

El documento US6.201.072B1 enseña un grupo de copolímeros tribloque de PLGA-PEG-PLGA con bajo peso molecular y diferentes características de hidrosolubilidad para aplicaciones de administración de fármacos.

El documento WO03000778A1 usa (entre otros) MPEG-PLGA (MPEG = metoxi-polietilenglicol) con un enlace en el extremo OH funcional con fines de liberación de fármacos.

El documento US20040076673 desvela MPEG-PLGA con $M_w < 5000$ para administración de fármacos vía oral.

El documento CN1446841 desvela materiales soporte porosos tridimensionales de copolímeros en bloque de poli(láctido)-poliéter y un procedimiento de preparación de tales copolímeros en bloque.

Los polímeros para ingeniería tisular pueden ser bien naturales o bien sintéticos. Los polímeros sintéticos cuyo uso está más extendido son del grupo de los poliésteres. Los más comunes en este grupo son PLLA, PDLLA, PLGA, PCL (poli- ϵ -caprolactona) y diversos copolímeros de los mismos. Todos son materiales hidrófobos y la adhesión inicial de células a matrices tisulares soporte de estos materiales es, como mucho, lenta.

Los presentes inventores han descubierto que, mediante la incorporación de un bloque hidrófilo (es decir, un bloque de polialquilenglicol) en el polímero, la biocompatibilidad de los poliésteres mejora. Esto es debido a mejores características de mojabilidad del material y a que la adhesión inicial de las células disminuye en materiales no polares. Además, se ha descubierto que, manteniendo bajo el contenido molar de unidades de polialquilenos respecto al contenido molar de unidades de láctido/glicólido, es decir, como máximo el 14% molar, se obtienen polímeros y materiales derivados superiores.

ES 2 338 820 T3

Breve descripción de la invención

Un aspecto de la presente invención se refiere a un polímero biodegradable de fórmula general:



en la que

10 A es un resto de poli (láctido-co-glicólido) de un peso molecular de al menos 8.000 g/mol, estando la relación molar entre (i) unidades de láctido [-CH(CH₃)-COO-] y (ii) unidades de glicólido [-CH₂-COO-] en el resto de poli (láctido-co-glicólido) en el intervalo de 80:20 a 10:90, en concreto de 70:30 a 10:90,

15 n representa el número medio de unidades -(CH₂CH₂O)- dentro de una cadena polimérica y es un número entero en el intervalo de 16-250,

20 la relación molar entre (iii) unidades de polietilenglicol [-CH₂CH₂O-] respecto a la cantidad combinada de (i) unidades de láctido [-CH(CH₃)-COO-] y (ii) unidades de glicólido [-CH₂-COO-] en el(los) resto(s) de poli(láctido-co-glicólido) está en el intervalo de 1:99 a 12:88,

y en el que el peso molecular medio numérico del copolímero es de al menos 20.000 g/mol.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un material poroso biodegradable que comprende un polímero de fórmula general:



en la que

30 A es un resto de poli(láctido-co-glicólido) de un peso molecular de al menos 4.000 g/mol, estando la relación molar entre (i) unidades de láctido [-CH(CH₃)-COO-] y (ii) unidades de glicólido [-CH₂-COO-] en el resto de poli(láctido-co-glicólido) en el intervalo de 80:20 a 10:90,

35 B es bien un resto de poli (láctido-co-glicólido) como se ha definido para A o bien se selecciona del grupo constituido por hidrógeno, alquilos C₁₋₆ y grupos protectores de hidroxilo,

40 uno de R¹ y R² dentro de cada unidad -(CHR¹CHR²O)- se selecciona de hidrógeno y metilo y el otro de R¹ y R² dentro de la misma unidad -(CHR¹CHR²O)- es hidrógeno,

n representa el número medio de unidades -(CHR¹CHR²O)- dentro de una cadena polimérica y es un número entero en el intervalo de 10-1000,

45 la relación molar entre (iii) unidades de polialquilenglicol [-CHR¹CHR²O-] respecto a la cantidad combinada de (i) unidades de láctido [-CH(CH₃)-COO-] y (ii) unidades de glicólido [-CH₂-COO-] en el(los) resto(s) de poli(láctido-co-glicólido) es como máximo de 14:86,

y en el que el peso molecular medio numérico del copolímero es de al menos 10.000 g/mol,

50 en el que la porosidad es al menos del 50%, tal como en el intervalo de 50-99,5%.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un material poroso biodegradable de un polímero, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

55 (a) disolver un polímero tal como se define en el presente documento en un disolvente no acuoso para obtener una disolución polimérica;

(b) congelar la disolución obtenida en la etapa (a) para obtener una disolución polimérica congelada; y

60 (c) secar en congelación la disolución polimérica congelada obtenida en la etapa (b) para obtener un material poroso biodegradable.

65 Aspectos adicionales de la presente invención se refieren a un elemento de un dispositivo médico de un material que comprende un polímero tal como se define en el presente documento; a un dispositivo médico de un material que comprende un polímero tal como se define en el presente documento; a un material poroso biodegradable tal como se define en el presente documento para uso en tratamientos, odontología o cirugía; al uso de un material poroso biodegradable tal como se define en el presente documento para la preparación de una matriz tisular soporte para

el soporte de la adhesión celular o el crecimiento para la regeneración de tejido; y al uso de un material poroso biodegradable tal como se define en el presente documento para la preparación de un vendaje de curas.

Breve descripción de las figuras

5 la fig. 1 ilustra matrices tisulares soporte de MPEG-PLGA de 2-30 kDa que soportan el desarrollo de epidermis reconstituida;

10 la fig. 2 disolución al 1,5% (p/p) de un polímero de lactido 2-30 al 50% (6% de MPEG (p/p)) en dioxano, congelada a -5°C y, a continuación, secada en congelación a -20°C;

la fig. 3 disolución al 1,5% (p/p) de un polímero de lactido 2-30 al 50% (6% de MPEG (p/p)) en dioxano, congelada a +5°C y, a continuación, secada en congelación a -20°C;

15 la fig. 4 imagen de SEM de MPEG-PLGA al 1,5% secado en congelación que contiene un 40% de partículas de ME (250 aumentos).

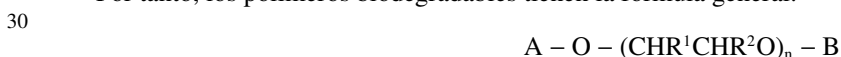
Descripción detallada de la invención

20 Los presentes inventores han descubierto que los polímeros biodegradables diseñados específicamente tienen propiedades muy interesantes que se pueden usar en matrices tisulares soporte para el soporte de la adhesión celular y el crecimiento para la regeneración de tejido.

Los polímeros

25 Los polímeros biodegradables de materiales biodegradables porosos están compuestos por un resto de polialquilenglicol y uno o dos restos de poli(láctido-co-glicólido).

Por tanto, los polímeros biodegradables tienen la fórmula general:



en la que

35 A es un resto de poli (láctido-co-glicólido) de un peso molecular de al menos 4.000 g/mol, estando la relación molar entre (i) unidades de lactido C-CH(CH₃)-COO-] y (ii) unidades de glicólido [-CH₂-COO-] en el resto de poli (láctido-co-glicólido) en el intervalo de 80:20 a 10:90, en concreto de 70:30 a 10:90,

40 B es bien un resto de poli (láctido-co-glicólido) como se ha definido para A o bien se selecciona del grupo constituido por hidrógeno, alquilos C₁₋₆ y grupos protectores de hidroxilo,

uno de R¹ y R² dentro de cada unidad -(CHR¹CHR²O)- se selecciona de hidrógeno y metilo y el otro de R¹ y R² dentro de la misma unidad -(CHR¹CHR²O)- es hidrógeno,

45 n representa el número medio de unidades -(CHR¹CHR²O)- dentro de una cadena polimérica y es un número entero en el intervalo de 10-1000, en concreto 16-250,

50 la relación molar entre (iii) unidades de polialquilenglicol [- (CHR¹CHR²O)-] respecto a la cantidad combinada de (i) unidades de lactido [-CH(CH₃)-COO-] y (ii) unidades de glicólido [-CH₂-COO-] en el(los) resto(s) de poli(láctido-co-glicólido) es como máximo de 14:86,

y en el que el peso molecular medio numérico del copolímero es de al menos 10.000 g/mol.

Por tanto, los polímeros pueden ser bien de tipo dibloque o bien de tipo tribloque.

55 Se sobreentiende que el polímero comprende bien uno o bien dos restos A, es decir, resto(s) de poli (láctido-co-glicólido). Se ha descubierto que tales restos deberían tener un peso molecular de al menos 4.000 g/mol, más concretamente de al menos 5000 g/mol o, incluso, de al menos 8000 g/mol.

60 El poli(láctido-co-glicólido) del polímero se puede degradar en condiciones fisiológicas, por ejemplo, en fluidos corporales y en tejido. Sin embargo, debido al peso molecular de estos restos (y a los otros requisitos expuestos en el presente documento), se cree que la degradación será lo suficientemente lenta como para que los materiales y objetos hechos del polímero puedan cumplir su propósito antes de que el polímero se degrade completamente.

65 La expresión "poli(láctido-co-glicólido)" abarca diversas variantes del polímero, por ejemplo, poli(láctido aleatorio-co-glicólido), poli(DL-láctido-co-glicólido), poli(mesoláctido-co-glicólido), poli(L-láctido-co-glicólido), y la secuencia de lactido/glicólido en el PLGA puede ser bien aleatoria, bien decreciente o bien en bloques, y el lactido puede ser L-láctido, DL-láctido, D-láctido o meso-láctido.

ES 2 338 820 T3

Preferiblemente, el poli(láctido-co-glicólido) es un poli(láctido aleatorio-co-glicólido) o un poli(láctido decreciente-co-glicólido).

Otra característica importante es el hecho de que la relación molar entre (i) unidades de láctido [-CH(CH₃)-COO-] y (ii) unidades de glicólido [-CH₂-COO-] en el(los) resto(s) de poli(láctido-co-glicólido) debería estar en el intervalo de 80:20 a 10:90, en concreto, de 70:30 a 10:90.

Se ha observado que, en general, los mejores resultados se obtienen para polímeros cuya relación molar entre (i) unidades de láctido [-CH(CH₃)-COO-] y (ii) unidades de glicólido [-CH₂-COO-] en el(los) resto(s) de poli(láctido-co-glicólido) es de 70:20 o inferior, o de 70:30 o inferior; sin embargo, también se han observado resultados bastante buenos para polímeros que tienen una relación molar respectiva de hasta 80:20, siempre y cuando la relación molar entre (iii) unidades de polialquilenglicol [-(CHR¹CHR²O)-] respecto a la cantidad combinada de (i) unidades de láctido [-CH(CH₃)-COO-] y (ii) unidades de glicólido [-CH₂-COO-] en el(los) resto(s) de poli(láctido-co-glicólido) sea como máximo de 10:90.

Como se mencionó anteriormente, B es bien un resto de poli(láctido-co-glicólido) como se ha definido para A o bien se selecciona del grupo constituido por hidrógeno, alquilos C₁₋₆ y grupos protectores de hidroxilo.

En una realización, B es bien un resto de poli(láctido-co-glicólido) como se ha definido para A, es decir, el polímero es de tipo tribloque.

En otra realización, B se selecciona del grupo constituido por hidrógeno, alquilos C₁₋₆ y grupos protectores de hidroxilo, es decir, el polímero es de tipo dibloque.

Habitualmente (en esta realización) B es un alquilo C₁₋₆, por ejemplo, metilo; etilo, 1-propilo, 2-propilo, 1-butilo, tert-butilo, 1-pentilo, etc., lo más preferible, metilo. En el caso de que B sea hidrógeno, es decir, corresponde a un grupo OH terminal, el polímero se prepara generalmente usando un grupo protector de hidroxilo como B. "Grupos protectores de hidroxilo" son grupos que se pueden eliminar después de la síntesis del polímero, por ejemplo, por hidrogenolisis, hidrólisis u otros medios adecuados, sin destruir el polímero, dejando así un grupo hidroxilo libre en la parte del PEG; véase, por ejemplo, libros que describen el estado de los procedimientos de la técnica, como los descritos por Greene, T.W. y Wuts, P.G.M. (Protecting Groups in Organic Synthesis, tercera edición o posteriores). Ejemplos especialmente útiles de los mismos son bencilo, tetrahidropirano, metoximetilo y benciloxicarbonilo. Tales grupos protectores de hidroxilo se pueden eliminar para obtener un polímero en el que B es hidrógeno.

Uno de R¹ y R² dentro de cada unidad -(CHR³CHR²O)- se selecciona de hidrógeno y metilo y el otro de R¹ y R² dentro de la misma unidad -(CHR¹CHR²O)- es hidrógeno. Por tanto, el resto -(CHR¹CHR²O)_n- puede ser bien un polietilenglicol, un polipropilenglicol o un poli (etilenglicol-co-propilenglicol). Preferiblemente, el resto -(CHR¹CHR²O)_n- es un polietilenglicol, es decir, ambos R¹ y R² dentro de cada unidad son hidrógeno.

n representa el número medio de unidades -(CHR¹CHR²O)- dentro de una cadena polimérica y es un número entero en el intervalo de 10-1000, en concreto, 16-250. Se debe sobreentender que n representa la media de unidades -(CHR¹CHR²O)- dentro de un conjunto de moléculas poliméricas. Esto será obvio para los expertos en la materia. El peso molecular del resto polialquilenglicol (CHR¹CHR²O)_n- está típicamente en el intervalo de 750-10.000 g/mol, por ejemplo, 750-1000 g/mol.

El resto -(CHR¹CHR²O)_n- generalmente no se degrada en condiciones fisiológicas, pero puede, por otra parte, ser secretado sin alteración por el cuerpo humano.

La relación molar entre (iii) unidades de polialquilenglicol [-(CHR¹CHR²O)-] respecto a la cantidad combinada de (i) unidades de láctido [-CH(CH₃)-COO-] y (ii) unidades de glicólido [-CH₂-COO-] en el(los) resto(s) de poli(láctido-co-glicólido) también juega un papel determinado y debería ser, como máximo, de 14:86. Más típicamente, la relación/PROPORCIÓN es como máximo de 12:88, en concreto como máximo de 10:90 o, incluso, como máximo de 8:92. A menudo, la relación está en el intervalo de 0,5:99,5 a 14:86, tal como en el intervalo de 1:99 a 14: 86 o en el intervalo de 1:99 a 12:88, en concreto, en el intervalo de 2:98 a 10:90 o, incluso, en el intervalo de 2:98 a 8:92.

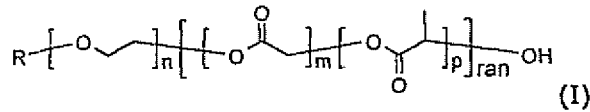
Se cree que el peso molecular del copolímero para uso en los materiales porosos no es especialmente relevante siempre y cuando sea al menos de 10.000 g/mol. Sin embargo, preferiblemente, el peso molecular es de al menos 15.000 g/mol. El "peso molecular" se debe interpretar como el peso molecular medio numérico del polímero, porque un experto en la materia sabrá que el peso molecular de las moléculas de polímero dentro de un conjunto de moléculas de polímero estará representado por valores distribuidos en torno al valor medio, por ejemplo, representado por una distribución gaussiana. Más típicamente, el peso molecular está en el intervalo 10.000-1.000.000 g/mol, tal como 15.000-250.000 g/mol ó 20.000-200.000 g/mol. Se ha descubierto que polímeros especialmente interesantes son aquellos que tienen un peso molecular de al menos 20.000 g/mol, tal como al menos 30.000 g/mol.

65

ES 2 338 820 T3

La estructura del polímero se puede ilustrar como se indica a continuación (donde R se selecciona de hidrógeno, alquilos C₁₋₆ y grupos protectores de hidroxilo; n es como se definió anteriormente, y m, p y ran se seleccionan de forma que se cumplan los requisitos del(los) resto(s) de poli(láctido-co-glicólido) anteriormente mencionados:

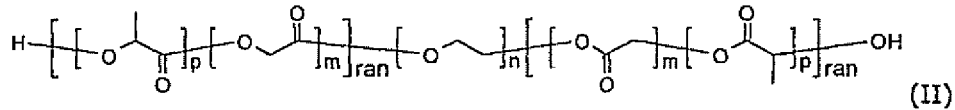
5



10

polímero tipo dibloque

15



20

Para cada una de las estructuras poliméricas (I) y (II) anteriormente mencionadas será obvio que las unidades [-CH₂-COO-] láctido y glicólido representadas por p y m pueden estar aleatoriamente distribuidas dependiendo de los materiales de partida y las condiciones de reacción.

25

Además, es obvio que las unidades de láctido [-CH(CH₃)-COO-] pueden ser bien D/L, bien L o bien D, típicamente D/L o L, o mesoláctido.

30

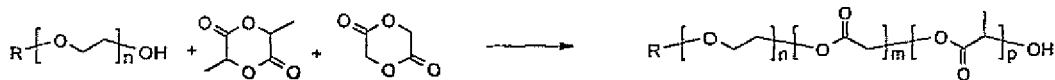
Preparación de polímeros

En principio, los polímeros se pueden preparar según los principios conocidos por los expertos en la materia.

35

En principio, el polímero en el que B no es un resto A (polímeros tipo dibloque) se puede preparar como se expone a continuación:

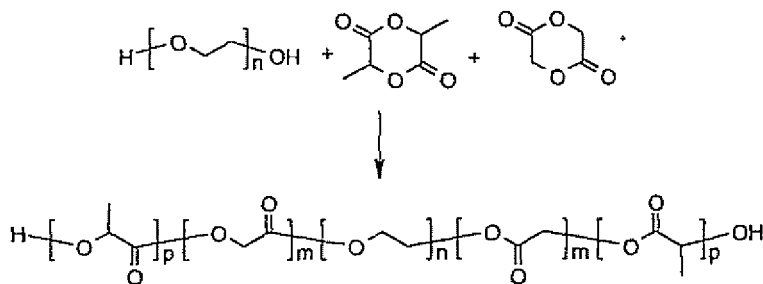
40



45

En principio, el polímero en el que B es un resto A (polímeros tipo tribloque) se pueden preparar como se expone a continuación:

50



55

A menos que se apliquen condiciones especiales, la distribución de unidades láctido [-CH(CH₃)-COO-] y unidades glicólido [-CH₂-COO-] será aleatoria o decreciente en cada resto poli(láctido-co-glicólido).

60

La síntesis de los polímeros según la invención se ilustra adicionalmente en la sección Parte experimental.

Los materiales

65

Los polímeros son útiles para una amplia gama de materiales para uso médico, odontológico y quirúrgico.

El material es un material poroso biodegradable que comprende un polímero tal como se define en el presente documento, en el que la porosidad es de al menos el 50%, tal como en el intervalo de 50-99,5%.

ES 2 338 820 T3

El elevado grado de porosidad puede, como se describirá de forma adicional posteriormente, ser obtenido por secado en congelación, es decir, el material, preferiblemente, se seca en congelación.

El espacio hueco del material del polímero puede estar no ocupado para permitir o incluso facilitar la adhesión de las células y/o el crecimiento para la regeneración de tejido. En una realización, sin embargo, los poros del material están al menos parcialmente ocupados por uno o más componentes de la matriz extracelular (ME). Tales componentes pueden facilitar la adhesión celular y/o el crecimiento para la regeneración de tejido. Ejemplos de componentes de la matriz extracelular son sulfato de condroitina, hialuronano, ácido hialurónico, sulfato de heparina, sulfato de heparano, sulfato de dermatano, factores de crecimiento, trombina, fibrina, fibronectina, elastina, colágeno, gelatina y agrecano.

Los componentes de la matriz extracelular se podrían añadir bien como partículas, que se dispersan heterogéneamente, o bien como un recubrimiento superficial. La concentración de los componentes de la matriz extracelular respecto al polímero sintético está típicamente en el intervalo de 0,5-15% (p/p), preferiblemente por debajo del 10% (p/p). Además, la concentración de los componentes de la matriz extracelular es, preferiblemente, como máximo del 0,3% (p/v), por ejemplo, como máximo del 0,2% (p/v), respecto al volumen del material. En algunas realizaciones, sin embargo, la concentración de los componentes de la matriz extracelular respecto al polímero sintético puede ser tan elevada como del 80%, tal como de 40-70%. En estas realizaciones, la concentración de los componentes de la matriz extracelular es, preferiblemente, de 0,1-5% (p/v), por ejemplo, de 0,5-4% (p/v).

Respecto a la biodegradabilidad, en algunas realizaciones es preferible que el grado de degradación del material esté en el intervalo de 0,9-0,1, tal como de 0,8-0,2, cuando se ensaya durante 28 días con el Ensayo de Biodegradación descrito en la sección Parte experimental.

Los materiales porosos se pueden preparar según técnicas conocidas, por ejemplo, como se desvela en el documento Antonios G. Mikos, Amy J. Thorsen, Lisa A. Cherwonka, Yuan Bao y Robert Langer; Preparation and characterization of poly(L-lactide) foams; Polymer 35, 1068-1077 (1994). Una técnica muy útil para la preparación de los materiales porosos es, sin embargo, el secado en congelación.

Por tanto, la presente invención también proporciona un procedimiento para la preparación de un material poroso biodegradable de un polímero, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- (a) disolver un polímero tal como se define en el presente documento en un disolvente no acuoso para obtener una disolución polimérica;
- (b) congelar la disolución obtenida en la etapa (a) para obtener una disolución polimérica congelada; y
- (c) secar en congelación la disolución polimérica congelada obtenida en la etapa (b) para obtener el material poroso biodegradable.

El disolvente no acuoso usado en el procedimiento se debería seleccionar, respecto al punto de fusión, de forma que se pueda congelar adecuadamente. Ejemplos ilustrativos del mismo son dioxano (pf. 12°C) y dimetilcarbonato (pf. 4°C).

En una variante, la disolución polimérica, después de la etapa (a), se vierte o cuela en un molde adecuado. De esta forma es posible obtener una forma tridimensional del material específicamente diseñada para la aplicación concreta.

Además, la invención también abarca una variante en la que las partículas de componentes de la matriz extracelular se dispersan en la disolución obtenida en la etapa (a) antes de que la disolución (dispersión) se congele como se define en la etapa (b).

La invención también abarca la variante más específica, en la que los componentes de la matriz extracelular se disuelven en un disolvente adecuado y, a continuación, se añaden a la disolución obtenida en la etapa (a). Mediante su mezcla con el disolvente de la etapa (a), es decir, un disolvente para el polímero tal como se define en el presente documento, lo más probable es que los componentes de la matriz extracelular precipiten para formar una dispersión.

Además, la invención abarca una variante en la que el material poroso biodegradable obtenido en la etapa (c), en una etapa posterior, se sumerge en una disolución de glucosaminoglicano (por ejemplo, hialuronano) y posteriormente se seca en congelación de nuevo.

La invención también proporciona un elemento de un dispositivo médico de un material que comprende un polímero tal como se define en el presente documento.

Cuando se usa en el presente contexto, la expresión “dispositivo médico” pretende abarcar vendajes de curas, suturas, implantes, etc. El término “elemento” pretende significar una determinada parte, sección o capa de dicho dispositivo médico.

Por tanto, en una realización, el elemento es el recubrimiento externo de un dispositivo médico.

ES 2 338 820 T3

En otra realización, el material forma la capa externa de un vendaje de curas.

En una variante concreta, la invención proporciona un dispositivo médico de un material que comprende un polímero tal como se define en el presente documento, es decir, el dispositivo médico está hecho en su totalidad del material. En una variante, el dispositivo médico está en forma de malla o red, en concreto de malla, tal como malla para hernias. En otra variante, el dispositivo médico está en forma de fibra, en concreto de sutura.

En algunas realizaciones alternativas, el material está presente en forma de fibra o estructura fibrosa preparada a partir del polímero definido en el presente documento, posiblemente en combinación con componentes de la matriz extracelular. Las fibras o materiales fibrosos se pueden preparar mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia, por ejemplo, enfriamiento ultrarrápido (melt spinning), electrospinning, extrusión, etc. Tales fibras o materiales fibrosos pueden, por ejemplo, ser usados como suturas, mallas para hernias, matrices tisulares soporte, etc.

Diversos usos

Como será obvio a partir de lo anterior, los polímeros y materiales tienen multitud de usos en el ámbito de la medicina, sanidad, cirugía, odontología, etc., en concreto usos en los que es necesario un polímero biodegradable, por ejemplo, vendajes de curas, matrices tisulares soporte para la fijación de células y crecimiento para la regeneración de tejido, suturas, mallas para hernias, cartílago, ligamentos, implantes, etc.

Por tanto, la presente invención también se refiere a un material poroso biodegradable tal como se define en el presente documento para uso en tratamientos, odontología o cirugía.

Más particularmente, la invención también se refiere al uso de un material poroso biodegradable tal como se define en el presente documento para la preparación de una matriz tisular soporte para el soporte de la adhesión celular o el crecimiento para la regeneración de tejido, y al uso de un material poroso biodegradable tal como se define en el presente documento para la preparación de un vendaje de curas.

Parte experimental

Ensayo de biodegradación

La biodegradabilidad del material poroso biodegradable se puede determinar como se indica a continuación.

Se sumerge completamente aprox. 1 gramo de un material poroso en un medio (suero fetal bovino al 10% en DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco)) y se almacena a 37°C durante un período de 28 días. El medio se cambia dos veces a la semana, es decir, los días 3, 7, 10, 14, 17, 21 y 24. El día 28, el material poroso se analiza por GCP. La biodegradación se mide como el peso molecular medio numérico respecto al valor inicial.

Se ensayó MPEG-PLGA poroso (2-30 kDa, L:G 50:50) y la biodegradación se determinó como aprox. 0,5 (valor $M_{n/w}$ respecto al valor inicial).

Resumen

Como intento de hacer el PLGA más hidrófilo, el MPEG o PEG se copolimerizó con PLGA para proporcionar copolímeros con un bajo contenido de MPEG/PEG (<20% (p/p) MPEG/PEG). Cuando estos polímeros se ensayaron y compararon con PLGA solo, las adhesiones iniciales de las células al MPEG-PLGA y PLGA-PEG-PLGA fueron superiores a las del PLGA solo y la morfología y fijación de las células fueron mejores.

Esto es sorprendente, puesto que los polímeros que contienen PEG son conocidos en la bibliografía por resistir la adhesión de proteínas y células. La clave para el rendimiento mejorado de nuestros polímeros parece ser que el contenido de PEG en el polímero se mantiene bajo (como máximo del 14% en moles), puesto que los polímeros con elevado contenido de PEG proporcionaron una mala adhesión y morfología en los ensayos biológicos.

El PLA tiene tiempos de degradación prolongados en comparación con el PLGA y nuestros experimentos muestran que un mayor contenido de láctido en la parte de PLGA del poliéster-PLGA proporciona una adhesión más lenta de las células.

Polímeros biodegradables sintéticos conocidos son típicamente materiales hidrófobos con una lenta adhesión inicial de las células en un entorno biológico. Hemos intentado modificar la hidrofilia del PLGA mediante la síntesis de un copolímero en bloque de MPEG-PLGA. Nuestro primer polímero fue MPEG-PLGA de 1,9-30 kDa con una relación G:L de 50:50 (mol). Éstos se transforman en finas láminas porosas mediante secado en congelación. En un ensayo biológico la adhesión de las células tanto inicial como a largo plazo fue excelente y el rendimiento fue superior al del PLGA no modificado. Esto es sorprendente puesto que la bibliografía describe que la incorporación de PEG en polímeros los hace resistentes a la adhesión de células y proteínas. La clave de nuestro éxito parece ser que tenemos un contenido de PEG bajo (6% (p/p)) (véase tabla 2 posterior). Cuando el contenido de PEG es mayor (MPEG-PLGA de 5-30 kDa, 14% de PEG (p/p)) observamos una adhesión reducida de las células, tanto inicial como a largo plazo, en comparación con los materiales con bajo contenido de PEG y con PLGA solo.

ES 2 338 820 T3

Purificación de reactivos

El DL-láctido y el glicólido se recristalizan en etilacetato seco en atmósfera de nitrógeno y se secan al vacío. El PEG/MPEG se disuelve en un disolvente adecuado, se precipita en hexano frío, se filtra y se seca durante toda la noche. Se destila al vacío y se almacena en nitrógeno 2-etilhexanoato estañoso. Se destila etilacetato a partir de hidruro de calcio en nitrógeno. Se destila dioxano a partir de benzofenona de sodio en nitrógeno. Se destila tolueno a partir de benzofenona de sodio en nitrógeno.

Síntesis de polímeros

Se añade PEG/MPEG, DL-láctido, glicólido y octanoato estañoso al 4% (p/v) en tolueno a un vial en una cámara de guantes con atmósfera de nitrógeno. El vial se cierra, se calienta y se agita hasta que el contenido es claro y homogéneo y, a continuación, se coloca en un horno a 120-200°C durante de 1 min a 48 horas, por ejemplo, hasta 6 h.

La síntesis también se puede realizar en una disolución en un disolvente adecuado (por ejemplo, dioxano) para facilitar la posterior purificación. A continuación, se añade PEG/MPEG, DL-láctido, glicólido y 2-etilhexanoato estañoso al 4% (p/v) en tolueno a un vial en una cámara de guantes con atmósfera de nitrógeno y se trata como anteriormente.

Purificación de polímeros

El polímero (véase tabla 1) se disuelve en un disolvente adecuado (por ejemplo, dioxano, tetrahidrofurano, cloroforno, acetona) y se precipita con agitación en un no disolvente (por ejemplo, agua, metanol, etanol, 1-propanol o 2-propanol) a una temperatura de -40 a 40°C. El polímero se deja reposar, se elimina el disolvente y el polímero se seca en un horno al vacío a 40-120°C durante toda la noche.

Los polímeros se analizan por espectroscopía de RMN y por GPC para confirmar su estructura, peso molecular y pureza.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 338 820 T3

TABLA 1

Ejemplos de síntesis de diversos polímeros de MPEG-PLGA

Polímero	relación G/L	glicólido (g)	DL-láctido (g)	Iniciador	Iniciador (g)	4% Sn(Oct) ₂ (μL)	dioxano (g)
750-15000 50L	50:50	2,12	2,64	MPEG 750 Da	0,238	129	5
1100-20000 50L	50:50	2,11	2,63	MPEG 1100 Da	0,261	98	5
1900-30000 50L	50:50	2,10	2,60	MPEG 1900 Da	0,298	65	5
1900-30000 80L	20:80	0,79	3,91	MPEG 1900 Da	0,298	65	5
5000-30000 50L	50:50	1,86	2,31	MPEG 5000 Da	0,833	68	5
15000-1900-15000 50L	50:50	2,10	2,60	PEG 1900 Da	0,298	65	5
30000-5000-30000 50L	50:50	2,06	2,56	PEG 5000 Da	0,385	31	5

55 Procedimiento de realización de matrices tisulares soporte

El polímero (por ejemplo, de 1,9-30 kDa) se disuelve en un disolvente adecuado (por ejemplo, dioxano) hasta una concentración de 0,5-10% (p/v). La disolución se vierte en un molde, se congela y se seca en congelación hasta lograr una lámina porosa. Los componentes de la matriz extracelular se pueden incorporar bien mediante dispersión de tales componentes en el disolvente o bien mediante tratamiento posterior de la lámina porosa con una dispersión/disolución de componentes de la matriz extracelular.

65 Ensayo de las matrices tisulares soporte

Los estudios de biocompatibilidad (véase tabla 2) de las diferentes matrices tisulares soporte de MPEG-PLGA y PLGA se realizaron sembrando fibroblastos primarios en una concentración de $2,5 \times 10^4$ células/cm² en la superficie de las matrices tisulares soporte. La evaluación de la fijación, viabilidad y crecimiento de las células se realizó los días 1, 3 y 7 tiñendo las células usando rojo neutro seguido de evaluación usando un microscopio invertido Leica DMIRE2

ES 2 338 820 T3

equipado con una cámara a color enfriada Evolution MP (Media Cybernetics) y se tomaron imágenes digitales usando el software Image Pro Plus 5.1 (Media Cybernetics).

5 Los estudios comparativos de la biocompatibilidad de las matrices tisulares soporte secadas en congelación de PLGA mostraron la adhesión general de células con morfología fina pero una cantidad inicial muy baja de células. Comparando estas matrices tisulares soporte con las de MPEG-PLGA de 2-30 kDa, observamos una mejor compatibilidad de las matrices tisulares soporte de MPEG-PLGA debido a que se adhiere una mayor cantidad de células a esta matriz tisular soporte debido a una mejor capacidad de mojado.

10 Las células crecen con una morfología fina y se observa una buena adherencia al MPEG-PLGA de 1,9-30 kDa desde el principio del ensayo y un aumento en la cantidad de células desde el día 1 al día 7. El aumento del tamaño de la parte de MPEG del MPEG-PLGA hasta 5-30 kDa proporciona únicamente células redondeadas con muy poca o ninguna adherencia a la superficie de las matrices tisulares soporte, proporcionando un biocompatibilidad disminuida pronunciada y que empeora del día 1 al días 7.

15 Si se ensaya MPEG-PLGA de 2-15 kDa y se compara con MPEG-PLGA de 2-20 kDa y con MPEG-PLGA de 2-30 kDa, observamos una fijación y viabilidad mayores de los fibroblastos cuando se aumentó el tamaño de la parte de PLGA. Esto significa que la mejor biocompatibilidad se obtenía con 2-30 kDa. El aumento del tamaño de 2-15 kDa a 2-20 kDa proporciona el mayor efecto positivo sobre la biocompatibilidad en comparación con la diferencia de 2-20 kDa a 2-30 kDa.

20 El aumento de la proporción L:G en MPEG-PLGA de 2-20 kDa de 50:50 a 80:20 proporciona una fijación y viabilidad menores de los fibroblastos.

25

(Tabla pasa a página siguiente)

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 338 820 T3

TABLA 2

Resumen de los ensayos de biocompatibilidad

	Matriz					Fijación			Viabilidad		
5	tisular										
10	soporte										
	Tipo	tamaño	LA	realación	%PEG	Día	Día 3	Día 7	Día	Día 3	Día 7
			% ²⁾	EO ³⁾	(p/p)	1			1		
15	PLGA ¹⁾		50	0:100	0	+	++	++++	+++	+++	++++
		2-15	50	16:84	12 (ref)	+	+	+	++	++	++
20		2-15	60	17:83	12 (ref)	+	+	+	++	++	+
		2-15	80	17:83	12 (ref)	+	+	+	+	+	+
		2-20	50	13:87	9	++	+++	+++	++	+++	+++ ++
25		2-20	60	13:87	9	++	++	++	++	++	+
		2-20	80	14:86	9	+	+	+	+	+	+++++
		2-30	50	9:91	9:91	6	+++	+++++	+++++	+++++	+++++
30		2-30	60	9:91		6	+++	+++	+++++	+++++	+++++
		2-30	80			6	+++	++++	++++	++++	
35	MPEG-PLGA										
		5-25	5-	50	23:77	17 (ref)	+	+	+	+	+
40		30	5-79	50	20:80	9:91	14 (ref)	++	+	+	++
				50		6	+++	++++	+++++	+++++	+++++
45											
	PLGA-	13-61-3	50	25:75	9:91	19 (ref)	+	+	+	+	+
50	PEG-	23-3-23	50	9:91	6		+++	+++++	+++++	+++++	+++++
	PLGA	47-6-47	50		6		++	+++	++++	+++	++++

1) PLGA 5050DL Alkermes MEDISORB de alta I.V.

2) LA como % en moles de la parte de PLGA del polímero

3) relación entre unidades de EO y unidades de láctido/glicólido

Los resultados se clasifican subjetivamente de + a +++++; + significa baja fijación y baja viabilidad, mientras que +++++ es fijación y viabilidad excelentes.

ES 2 338 820 T3

Los queratinocitos humanos se pueden cultivar *in vitro* en matrices tisulares soporte de MPEG-PLGA pobladas con fibroblastos para formar epidermis reconstituida multicapa y diferenciada (véase figura 1). La epidermis reconstituida muestra características morfológicas que se asemejan a la epidermis normal *in vivo*.

5 En las muestras histológicas encontramos pruebas claras de capas de células basales (estrato basal) y una capa córnea superior final con capas que se asemejan, sin embargo, a capas granulares y espinosas inmaduras ligeramente hiperproliferativas. La falta de maduración final se debería atribuir al modelo *in vitro* elegido más que al material de la matriz tisular soporte.

10 *Preparación de matrices tisulares soporte de MPEG-PLGA que contienen partículas de ME*

Preparación de matrices tisulares soporte de un material compuesto de MPEG-PLGA y ME: Se disolvió metoxi-poli(etilenglicol)-poli(láctido-co-glicólido) (M_n 2.000-30.000, L: G 1:1; preparado como se ha descrito anteriormente) en 1,4-dioxano hasta lograr una disolución al 1,5%. Para muestras que contenían UBM (Acell Inc., USA), el UBM se
15 añadió a la disolución con agitación; se mezclaron a alta velocidad 0, 0,017, 0,038, 0,064, 0,1, 0,15, 0,225 g/matriz tisular soporte (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60% p/p) y se vertieron 10 ml en un molde de 7,3x7,3 cm. La disolución se congeló a -5°C y se liofilizó a -20°C durante 5 h y a 20°C durante aprox. 15 h. Las muestras se colocaron en un desecador a vacío durante toda la noche para eliminar el dioxano residual.

20 Las imágenes de SEM demuestran que las partículas de ME están homogéneamente distribuidas en la matriz tisular soporte, figura 4.

Preparación, morfología celular y crecimiento 3D en las matrices tisulares soporte de material compuesto de MPEG-PLGA y GAG con 4 concentraciones diferentes de GAG

25 Preparación de matrices tisulares soporte de un material compuesto de MPEG-PLGA y glicosaminoglicanos (GAG): Se disolvió metoxi-poli(etilenglicol)-poli(láctido-co-glicólido) (M_n 2.000-30.000, L:G 1:1; preparado como se ha descrito anteriormente) en 1,4-dioxano hasta lograr una disolución al 1,5%. Para muestras que contenían GAG, los GAG se añadieron a la disolución con agitación; se mezclaron a alta velocidad 0, 0,0015, 0,0031, 0,00625, 0,013
30 g/matriz tisular soporte (0, 1, 2, 4, 8% p/p) y se vertieron 10 ml en un molde de 7,3x7,3 cm. La disolución se congeló a -5°C y se liofilizó a -20°C durante 5 h y a 20°C durante aprox. 15 h. Las muestras se colocaron en un desecador a vacío durante toda la noche para eliminar el dioxano residual.

Para evaluar la morfología celular y el crecimiento 3D de las matrices tisulares soporte de material compuesto, se realizaron biopsias de cada tipo de matriz tisular soporte y se sembraron con fibroblastos humanos primarios (3ª
35 pasada) en la superficie de las matrices tisulares soporte con una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/cm² en un pequeño volumen de medio de crecimiento (10% FCS. en DMEM) que contenía antibióticos (penicilina, estreptomycin y anfotericina B) Las matrices tisulares soporte se incubaron a 37°C con el 5% de CO₂ antes de la adición de medio de crecimiento adicional. La evaluación de la fijación, morfología, crecimiento y población de las células de la matriz
40 tisular soporte se realizó los días 1, 3 y 7 tiñendo las células usando rojo neutro seguido de evaluación usando un microscopio invertido Leica DMIRE2 equipado con una cámara a color enfriada Evolution MP (Media Cybernetics). Se tomaron imágenes digitales usando el software Image Pro Plus 5.1 (Media Cybernetics).

La morfología celular y el crecimiento 3D en la matriz tisular soporte de MPEG-PLGA sin GAG mostró, los
45 primeros días del estudio, células adheridas creciendo como una combinación de células redondeadas y células con forma de huso. Las células crecían en la superficie de las matrices tisulares soporte. Durante el resto del estudio todas las células adquirieron forma de huso y desde el día 3 se observó crecimiento dentro de las matrices tisulares soporte. La adición del 1% de GAG (p/p) a las matrices tisulares soporte no cambió la forma en que crecían las células en este estudio en comparación con una matriz tisular soporte de MPEG-PLGA sin GAG. El aumento de la concentración de
50 GAG hasta el 2% (p/p) condujo, el día 1, a un crecimiento de las células más bien en regiones pequeñas en las que las células crecían cercanas. El aumento de la concentración de GAG hasta el 4 y el 8% (p/p) aumentó el tamaño de las regiones e hizo difícil distinguir células separadas.

El día 3 las células comenzaron a extenderse más sobre la superficie de las matrices tisulares soporte. Este efecto
55 fue más pronunciado con el 2 y el 4% (p/p) en comparación con las matrices tisulares soporte que contenían el 8% (p/p).

El día 7 las células crecían más sobre la superficie de las matrices tisulares soporte en la matriz tisular soporte de MPEG-PLGA puro y baja concentración de GAG en contraste con un mayor crecimiento interno en las matrices
60 tisulares que contenían mayores concentraciones de GAG y, como consecuencia de esto, las células crecían más extendidas con mayores concentraciones de GAG.

Liberación de GAG de las matrices tisulares soporte de material compuesto de MPEG-PLGA y GAG con concentraciones diferentes de GAG

65 Preparación de matrices tisulares soporte de material compuesto de MPEG-PLGA y GAG: Se disolvió metoxi-poli(etilenglicol)-poli(láctido-co-glicólido) (M_n 2.000-30.000, L: G 1:1; preparado como se ha descrito anteriormente) en 1,4-dioxano hasta lograr una disolución al 1,5%. Para muestras que contenían GAG, los GAG se añadieron a la

ES 2 338 820 T3

disolución con agitación; se mezclaron a alta velocidad 0, 0,0015, 0,0031, 0,013 g/matriz tisular soporte (0, 1, 2, 8% p/p) y se vertieron 10 ml en un molde de 7,3x7,3 cm. La disolución se congeló a -5°C y se liofilizó a -20°C durante 5 h y a 20°C durante aprox. 15 h. Las muestras se colocaron en un desecador a vacío durante toda la noche para eliminar el dioxano residual.

5 En el ensayo con azul de dimetilmileno (DMMB) el contenido de GAG sulfato se mide aumentando el OD a 525 nm. La disolución coloreada con DMMB se preparó según Farndale y col. (RW Farndale y col. Biochimica et Biophysica Acta 883:173-177, 1986). Brevemente, se disolvieron 16 mg de azul de 1,9-dimetilmileno en 1 L de agua que contenía 3,04 g de glicina, 2,37 g de NaCl y 95 ml de HCl 0,1 M, pH 3,0. Para medir la liberación de GAG de las matrices tisulares soporte de MPEG-PLGA que contenían el 0, 1, 2 y 8% (p/p) de GAG se realizaron biopsias de cada tipo de matriz tisular soporte. Estas biopsias se colocaron por duplicado en una placa de 48 pocillos y se vertieron 200 µl de disolución de DMMB sobre las matrices tisulares soporte, correspondiendo a la cantidad necesaria para cubrir las matrices tisulares soporte. Cinco minutos después se transfirieron 100 µl de la disolución coloreada de los pocillos a una placa de 96 pocillos y se midieron a 525 nm. Se usó un lector de microplacas SynergyTM HT Multi-Detection de Bio-Tek.

El resultado del estudio mostró una liberación inmediata de GAG de todas las matrices tisulares soporte que contenían GAG y ninguna liberación de las matrices tisulares soporte de MPEG-PLGA puro (véase figura 5). Se observó una liberación ligeramente mayor en la matriz tisular soporte con el 8% (p/p) en comparación con el 1 y el 2% (p/p).

Implantación de Integra y MPEG-PLGA en un modelo de ratón de 28 días

Se realizó una biopsia de 8 mm a dos grupos de 4 ratones (ratones NMRI de M&B-Taconic) en Pipeline Biotech A/S de matrices tisulares soporte respectivamente de Integra (Integra LifeSciences Corporation, USA) o de MPEG-PLGA (1,5% 2-30 50L) implantada bajo la piel en la región del cuello. La incisión en la piel se cerró con suturas. Los días 10 y 28, se eutanizaron 2 ratones de cada grupo con CO₂ y se extrajo la zona de la implantación, incluyendo la zona circundante, y se transfirió a una disolución tampón de formalina de Lilly antes de embeberla en parafina. Cada bloque de parafina se seccionó cuidadosamente en incrementos de 5 µm hasta localizar cada matriz tisular soporte y las capas posteriores se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Se recogieron imágenes digitales usando un microscopio de luz BX-60 Olympus equipado con una cámara a color enfriada Evolution MP (Media Cybernetics) y las imágenes digitales se tomaron usando el software Image Pro Plus 5.1. Un patólogo independiente realizó la evaluación histopatológica del estudio.

Integra mostró una buena integración con el tejido circundante y un crecimiento ligeramente fibrótico a lo largo del borde de la matriz tisular soporte el día 10. No se observaron fibroblastos en el medio de las matrices tisulares soporte. El día 10 había una inflamación mínima en las matrices tisulares soporte y sus alrededores; sin embargo, había algunas células gigantes. Las matrices tisulares soporte estaban todavía intactas tras 28 días, pero sin crecimiento adicional de fibroblastos.

El MPEG-PLGA mostró una muy buena integración con el tejido circundante el día 10, con una respuesta inflamatoria leve y un crecimiento significativo de células fibroblastos a lo largo del borde, correspondiendo a una respuesta fibrótica deseable, y células migratorias en el medio de la matriz tisular soporte. Al contrario que con Integra, el crecimiento continuó hasta el día 28 con formación de neodermis y sin respuesta inflamatoria.

En conclusión, el estudio en animales mostró que el MPEG-PLGA era el material para matrices tisulares soporte más adecuado, soportando el crecimiento de fibroblastos, la formación de neodermis y siendo bien tolerado por el huésped.

*Regeneración de cartilago con condrocitos en una matriz tisular soporte de MPEG-PLGA (estudio *in vivo* en cabras)*

El presente estudio pretende investigar la respuesta regenerativa de cartilago de una matriz tisular soporte porosa de MPEG-PLGA combinada con una suspensión de condrocitos en un modelo con defectos en todo el grosor del cartilago de cóndilo femoral de cabra.

Procedimientos

Se usaron 10 cabras adultas para el estudio, y el estudio se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Foulum, Dinamarca. Se creó un defecto circular de 6 mm en ambos cóndilos femorales medios. Se recogió tejido cartilaginoso para el cultivo de condrocitos. Los defectos se aleatorizaron con cirugía abierta secundaria para los siguientes dos grupos de tratamiento.

1. Defecto vacío (control)

2. Disolución de fibrina/condrocitos en una matriz tisular soporte de MPEG-PLGA porosa secada en congelación (4% 2-30 50 L). Se realizó un seguimiento de los animales durante 4 meses. Análisis: puntuación macroscópica ICRS (0-12).

ES 2 338 820 T3

Se realizó un ensayo mecánico para evaluar la rigidez del tejido regenerado. Se realizaron análisis histológicos con puntuaciones de O, Driscoll y Pinada y llenado en tanto por ciento de los defectos.

Resultados

5

Las puntuaciones ICRS e histológicas demostraron una diferencia muy significativa entre los grupos. La regeneración de cartílago en el grupo MPEG-PLGA/células demostró un gran llenado de defectos y características tisulares cercanas al cartílago de hialina, mientras que en los defectos vacíos no se observó tejido regenerado. El ensayo mecánico demostró que no había diferencias entre los grupos de tratamiento.

10

Conclusión

El constructo MPEG-PLGA/células demostró una respuesta regenerativa de cartílago extensa con buenas características fenotípicas. Como se esperaba, no se observó regeneración en los defectos vacíos. La matriz celular de MPEG-PLGA poroso en combinación con condrocitos cultivados parece ser una buena técnica de ingeniería tisular de cartílago *in vivo*.

15

Referencias citadas en la descripción

20

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es solo para utilidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en su recopilación, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

25

Documentos de patente citados en la descripción

- US6201072B1 [0007]
- US20040076673A [0009]
- W003000778A1 [0008]
- CN1446841 [0010]

30

Bibliografía que no son patentes citada en la descripción

- **Zange** y col., *Journal of Controlled Release*, 1998, vol. 56, 249-258 [0006];
- **Greene**, T.W.; **Wuts**, P.G.M., *Protecting Groups in Organic Synthesis* [0031]
- **Antonios G. Mikos**; **Amy J. Thorsen**; **Lisa A Cherwonka**; **Yuan Bao**; **Robert Langer**; Preparation and characterization of poly(L-lactide) foams; *Polymer*, 1994, vol. 35, 1068-1077 [0052]
- **RW Farndale** y col. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1986, vol. 883, 173-177 [0097].

45

50

55

60

65

ES 2 338 820 T3

REIVINDICACIONES

1. Un material poroso biodegradable que comprende un polímero de fórmula general

5



en la que

10

A es un resto de poli (láctido-co-glicólido) de un peso molecular de al menos 4.000 g/mol, estando la relación molar entre (i) unidades de láctido [-CH(CH₃)-COO-] y (ii) unidades de glicólido [-CH₂-COO-] en el resto de poli (láctido-co-glicólido) en el intervalo de 80:20 a 10:90,

15

B es bien un resto de poli (láctido-co-glicólido) como se ha definido para A o bien se selecciona del grupo constituido por hidrógeno, alquilos C₁₋₆ y grupos protectores de hidroxilo,

uno de R¹ y R² dentro de cada unidad -(CHR¹HR²O)- se selecciona de hidrógeno y metilo y el otro de R¹ y R² dentro de la misma unidad -(CHR¹CHR²O)- es hidrógeno,

20

n representa el número medio de unidades -(CHR¹CHR²O)- dentro de una cadena polimérica y es un número entero en el intervalo de 10-1000,

25

la relación molar entre (iii) unidades de polialquilenglicol [- (CHR¹CHR²O)-] respecto a la cantidad combinada de (i) unidades de láctido [-CH(CH₃)-COO-] y (ii) unidades de glicólido [-CH₂-COO-] en el(los) resto(s) de poli(láctido-co-glicólido) es como máximo de 14:86, y en el que el peso molecular medio numérico del copolímero es de al menos 10.000 g/mol,

en el que la porosidad es al menos del 50%.

30

2. El material poroso según la reivindicación 1, en el que el peso molecular medio numérico del copolímero es de al menos 20.000 g/mol.

35

3. El material poroso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que ambos R¹ y R² dentro de cada unidad son hidrógeno.

40

4. El material poroso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que B es un resto de poli (láctido-co-glicólido) como se ha definido para A.

45

5. El material poroso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que B es un alquilo C₁₋₆.

6. El material poroso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que B es grupo protector de hidroxilo.

50

7. El material poroso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que B es hidrógeno.

8. El material poroso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polímero tiene la fórmula general:

55



en la que

60

A es un resto de poli(láctido-co-glicólido) de un peso molecular de al menos 8.000 g/mol, estando la relación molar entre (i) unidades de láctido [-CH(CH₃)-COO-] y (ii) unidades de glicólido [-CH₂-COO-] en el(los) resto(s) de poli (láctido-co-glicólido) está en el intervalo de 80:20 a 10:90,

n representa el número medio de unidades -(CH₂CH₂O)- dentro de una cadena polimérica y es un número entero en el intervalo de 16-250,

la relación molar entre (iii) unidades de polietilenglicol [- (CH₂CH₂O)-] respecto a la cantidad combinada de (i) unidades de láctido [-CH/CH₃)-COO-] y (ii) unidades de glicólido [-CH₂-COO-] en el(los) resto(s) de poli(láctido-co-glicólido) está en el intervalo de 1:99 a 12:88,

65

y en el que el peso molecular medio numérico del copolímero es de al menos 20.000 g/mol.

9. El material según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que se seca en congelación.

ES 2 338 820 T3

10. El material según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que los poros del material están al menos parcialmente ocupados por uno o más componentes de la matriz extracelular.

5 11. El material según la reivindicación 10, en el que el componente de la matriz extracelular se selecciona de sulfato de condroitina, hialuronano, ácido hialurónico, sulfato de heparina, sulfato de heparano, sulfato de dermatano, factores de crecimiento, trombina, fibrina, fibronectina, elastina, colágeno, gelatina y agregano.

12. Un polímero biodegradable de fórmula general:



en la que

15 A es un resto de poli (láctido-co-glicólido) de un peso molecular de al menos 8.000 g/mol, estando la relación molar entre (i) unidades de láctido [-CH(CH₃)-COO-] y (ii) unidades de glicólido [-CH₂-COO-] en el resto de poli (láctido-co-glicólido) en el intervalo de 80:20 a 10:90,

20 n representa el número medio de unidades -(CHR¹CHR²O)- dentro de una cadena polimérica y es un número entero en el intervalo de 16-250,

25 la relación molar entre (iii) unidades de polietilenglicol [-CH₂CH₂O-] respecto a la cantidad combinada de (i) unidades de láctido [-CH(CH₃)-COO-] y (ii) unidades de glicólido [-CH₂-COO-] en el(los) resto(s) de poli(láctido-co-glicólido) está en el intervalo de 1:99 a 12:88,

y en el que el peso molecular medio numérico del copolímero es de al menos 20.000 g/mol.

30 13. Un procedimiento para la preparación de un material poroso biodegradable de un polímero, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 35 (a) disolver un polímero tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en un disolvente no acuoso para obtener una disolución polimérica;
- (b) congelar la disolución obtenida en la etapa (a) para obtener una disolución polimérica congelada; y
- (c) secar en congelación la disolución polimérica congelada obtenida en la etapa (b) para obtener el material poroso biodegradable.

40 14. El procedimiento según la reivindicación 13, en el que la disolución polimérica, después de la etapa (a), se vierte o cuele en un molde adecuado.

45 15. Un elemento de un dispositivo médico de un material que comprende un polímero tal como se define en la reivindicación 12.

16. El elemento de un dispositivo médico según la reivindicación 15, en el que el elemento es el recubrimiento externo de un dispositivo médico.

50 17. Un dispositivo médico de un material que comprende un polímero tal como se define en la reivindicación 12.

18. El dispositivo médico según la reivindicación 17, que está en forma de malla o red.

19. El dispositivo médico según la reivindicación 17, que está en forma de fibra.

55 20. Un material poroso biodegradable como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para uso en tratamientos, odontología o cirugía.

60 21. El uso de un material poroso biodegradable tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para la preparación de una matriz tisular soporte para el soporte de la adhesión celular o el crecimiento para la regeneración de tejido.

22. El uso de un material poroso biodegradable tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para la preparación de un vendaje de curas.

65



Figura 1

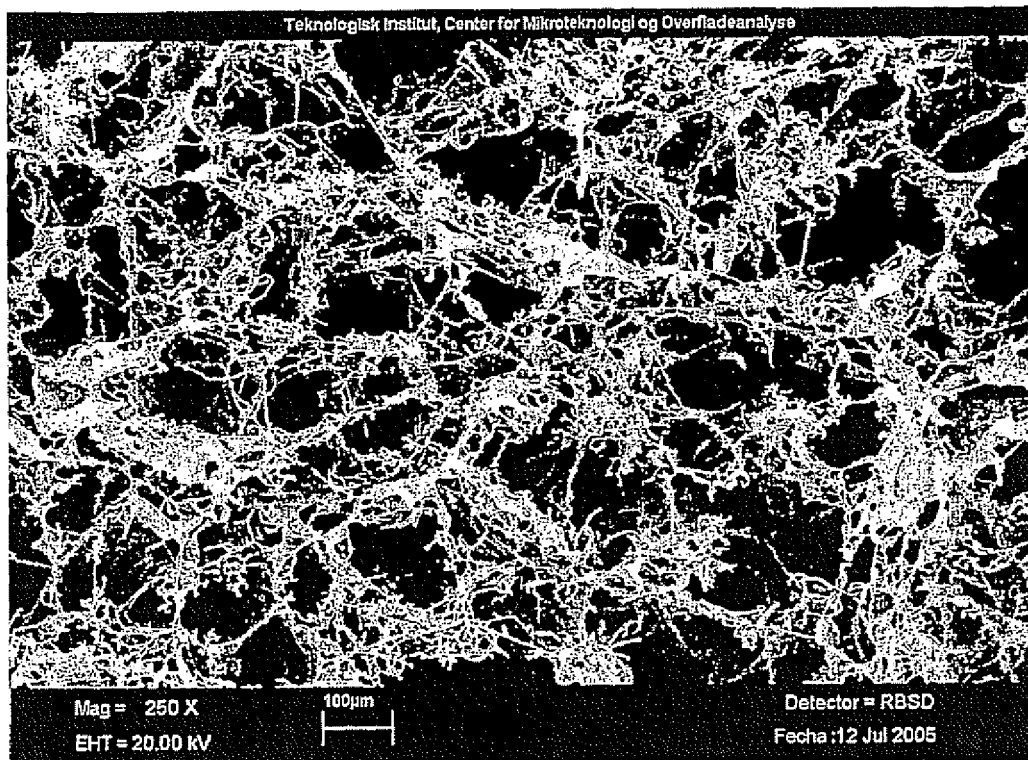


Figura 2

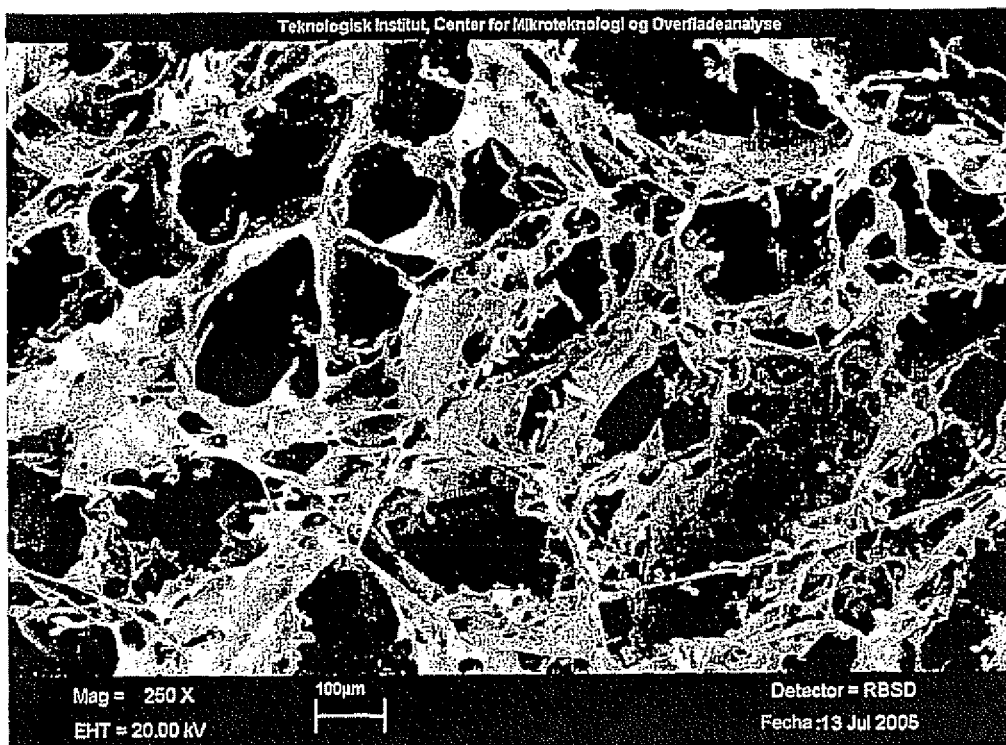


Figura 3

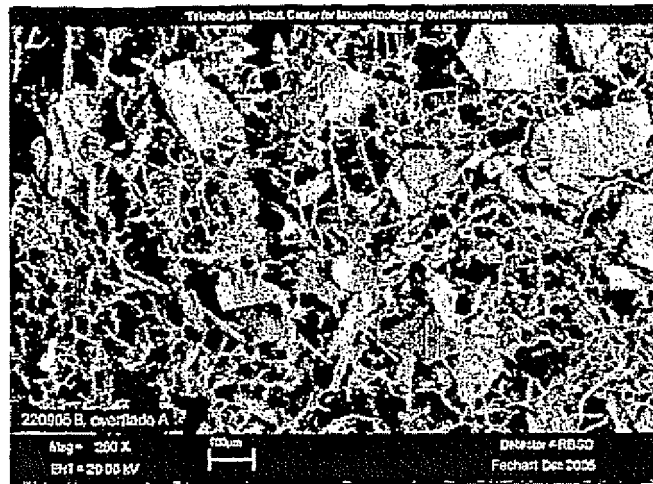


Figura 4

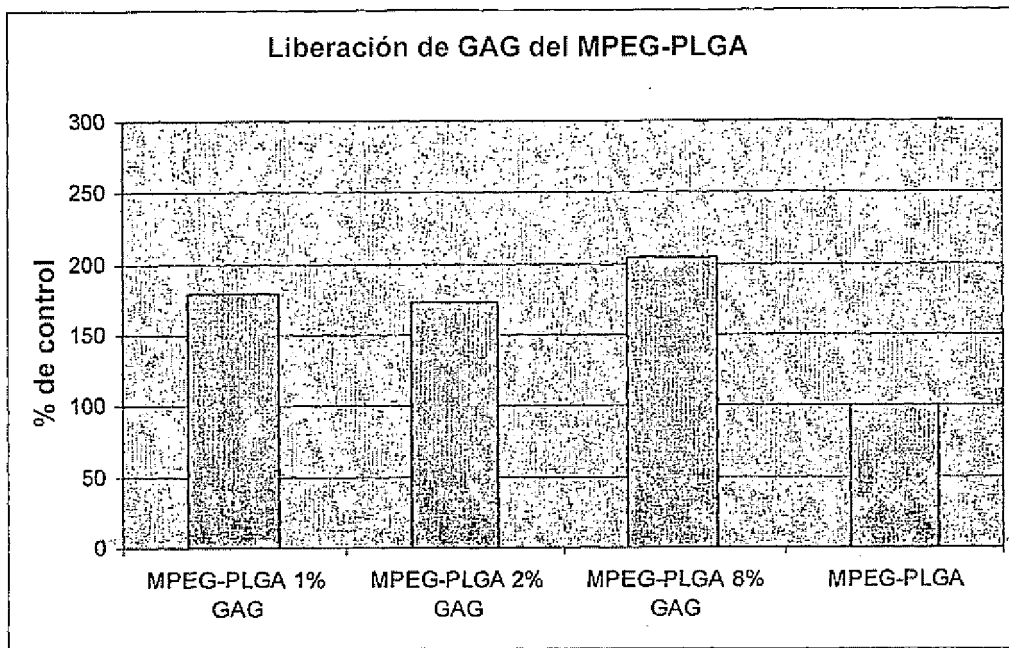


Figura 5