

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 958 213**

21 Número de solicitud: 202230626

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

A61N 1/05 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

08.07.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

05.02.2024

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

10.04.2024

Fecha de concesión:

27.03.2025

45 Fecha de publicación de la concesión:

03.04.2025

73 Titular/es:

**FUNDACION HOSPITAL NACIONAL DE
PARAPLÉJICOS PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA
INTEGRACIÓN (FUHNPAIIN) (100.00%)
Finca la Peraleda, s/n
45071 Toledo (Toledo) ES**

72 Inventor/es:

**COLLAZOS CASTRO, Jorge Eduardo y
ALVES SAMPAIO, Alexandra Manuela**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **IMPLANTE ELECTROACTIVO LIBERADOR DE FÁRMACOS PARA PROMOVER LA
REPARACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO**

57 Resumen:

Implante electroactivo liberador de fármacos para promover la reparación del sistema nervioso.

La presente invención se refiere a un implante electroactivo para la liberación de fármacos con actividad antifibrótica y facilitadora del crecimiento neural, y a su uso combinado con protocolos de electroestimulación y con otros fármacos para promover la reparación del sistema nervioso in vivo; así como a los compuestos, métodos y procedimientos para preparar y ejecutar dichos implantes, y a los sistemas de electroestimulación neural que incorporan los compuestos o se coadministran con los compuestos para prevenir la fibrosis e inducir el crecimiento axonal o dendrítico sobre o alrededor de los electrodos implantados.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 958 213 B2

DESCRIPCIÓN

IMPLANTE ELECTROACTIVO LIBERADOR DE FÁRMACOS PARA PROMOVER
LA REPARACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO

5

La presente invención se refiere a un implante electroactivo para la liberación de fármacos con actividad antifibrótica y facilitadora del crecimiento neural, y a su uso combinado con protocolos de electroestimulación y con otros fármacos para promover la reparación del sistema nervioso *in vivo*; así como a los compuestos, métodos y procedimientos para preparar y ejecutar dichos implantes, y a los sistemas de electroestimulación neural que incorporan los compuestos o se coadministran con los compuestos para prevenir la fibrosis e inducir el crecimiento axonal o dendrítico sobre o alrededor de los electrodos implantados.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El sistema nervioso (SN) resulta dañado en procesos patológicos muy diversos incluyendo el trauma, la hemorragia y eventos vasculares que llevan a hipoxia e isquemia, infecciones, trastornos inflamatorios, enfermedades genéticas, metabólicas, tóxicas y neurodegenerativas. En la práctica clínica, estas patologías pueden afectar cualquier región del sistema nervioso central (SNC), compuesto por el encéfalo y la médula espinal, o involucrar al sistema nervioso periférico (SNP), formado por nervios que transportan información sensorial y motriz desde/a todos los órganos del cuerpo. La pérdida funcional secundaria a una lesión neurológica depende de la localización y la severidad de esta.

La lesión traumática de la médula espinal es un tipo de daño neurológico frecuente y bien estudiado, pero aún sin tratamiento efectivo. La fisiopatología de la lesión medular (LM), así como las estrategias propuestas para su reparación, se describen de forma pormenorizada en distintas publicaciones (Collazos-Castro JE. Lesión y reparación de la médula espinal: aspectos neuropatológicos y funcionales. En: Esclarín de Ruz A. (Ed): Lesión medular, enfoque multidisciplinario. Editorial Médica Panamericana. Madrid, 2020, p. 235-241. Collazos-Castro JE. Biomaterial-based systems as biomimetic agents in the repair of the CNS. In: Salgado A. (Ed): Handbook of Innovations in Central Nervous System Regenerative Medicine. Elsevier, Amsterdam, 2020). En resumen, la LM interrumpe los axones (axotomía) que discurren por la zona

afectada, y también causa muerte de neuronas, células gliales, vasculares y meníngeas, y se acompaña de una serie de respuestas complejas que llevan a la cicatrización tisular sin que se restaure la anatomía funcional del SN.

- 5 En los humanos, la LM traumática suele producir defectos grandes en el tejido neural, que varían desde 1 a 10 cm de largo o incluso más. Tras la fase aguda, en la que la glía y las células inflamatorias fagocitan el tejido desvitalizado, se forman cavidades con un componente variable de tejido conectivo fibrótico. A este último contribuyen los pericitos, los fibroblastos perivascuales y meníngeos, otras células meníngeas, y
- 10 fibroblastos de los ligamentos espinales (Fernandez E, Pallini E. Connective tissue scarring in experimental spinal cord lesions: significance of dural continuity and role of epidural tissues. *Acta Neurochir. (Wien)* 1985; 76: 145-8; Göritz C, Dias DO, Tomilin N, Barbacid M, Shupliakov O, Frisén J. A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science* 2011; 333:238-42; Soderblom C, Luo X, Blumenthal E, Bray E, Lyapichev K,
- 15 Ramos J, Krishnan V, Lai-Hsu C, Park KK, Tsoulfas P, Lee JK. Perivascular fibroblasts form the fibrotic scar after contusive spinal cord injury. *J Neurosci.* 2013; 33:13882-7). Las cavidades y las cicatrices de tejido conectivo constituyen un impedimento mecánico y molecular para la regeneración axonal y la migración glial, e interfieren la presentación de señales topográficas y moleculares para el crecimiento de las células
- 20 neurales. La reparación neural se dificulta aún más por la expresión de inhibidores del crecimiento axonal en otros tipos de células además del tejido conectivo, así como por la existencia de limitaciones intrínsecas para la regeneración en las neuronas adultas del SNC (He Z, Jin Y. Intrinsic Control of Axon Regeneration. *Neuron* 2016; 90:438-51; O'Shea TM, Burda JE, Sofroniew MW. Cell biology of spinal cord injury and repair. *J*
- 25 *Clin Invest.* 2017; 127:3259-70).

- Estudios en ratones transgénicos demostraron que la cicatriz fibrótica que se forma tras la LM puede eliminarse por completo mediante manipulación génica, pero el resultado fue la creación de un defecto tisular sin ningún recrecimiento neural (Göritz
- 30 C, Dias DO, Tomilin N, Barbacid M, Shupliakov O, Frisén J. A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science* 2011; 333:238-42). No obstante, cuando solo se inhibió parcialmente la proliferación de las células fibróticas en lesiones medulares incompletas, se pudo aumentar la extensión y ramificación de los axones del tracto corticoespinal (Dias DO, Kim H, Holl D, Werne Solnestam B, Lundberg J, Carlén
 - 35 M, Göritz C, Frisén J. Reducing pericyte-derived scarring promotes recovery after

spinal cord injury. Cell 2018; 173:153-165).

Los microtúbulos son una diana relevante para intentar aumentar la regeneración axonal. La patente WO 2006/094811 reivindica el uso de fármacos estabilizadores de los microtúbulos, por ejemplo, el taxol, para la preparación de compuestos farmacéuticos que estimulen el crecimiento axonal tras lesiones del SNC. Puesto que una dinámica correcta de los microtúbulos también es indispensable para la migración y la división celular, los fármacos que estabilizan los microtúbulos afectan marcadamente estos procesos, y por consiguiente pueden reducir la fibrosis. La administración de taxol disminuyó la formación de tejido fibrótico y produjo cierto crecimiento axonal en ratas con LM (Hellal F, Hurtado A, Ruschel J, Flynn KC, Laskowski CJ, Umlauf M, Kapitein LC, Strikis D, Lemmon V, Bixby J, Hoogenraad CC, Bradke F. Microtubule stabilization reduces scarring and causes axon regeneration after spinal cord injury. Science 2011;331:928–931). Sin embargo, existe mucha duda entre los expertos respecto a la posible utilidad del taxol y fármacos relacionados para facilitar la reparación de las lesiones neurológicas, debido a su neurotoxicidad y a que bloquea la migración y división de las células gliales y de otras células reparativas, llevando a la formación de cavidades vacías en la médula espinal en vez de facilitar el cierre de la brecha tisular (Popovich PG, Tovar CA, Lemeshow S, Yin Q, Jakeman LB. Independent evaluation of the anatomical and behavioral effects of Taxol in rat models of spinal cord injury. Exp. Neurol. 2014;261: 97–108).

Mientras que el taxol estabiliza los microtúbulos, existen fármacos que tienen el efecto contrario, es decir, que aumentan la movilidad de los microtúbulos, por ejemplo, los inhibidores de las quinesinas. Estos últimos, y en particular los inhibidores de la quinesina Eg5, también incrementan el crecimiento axonal y se han propuesto para el tratamiento de las lesiones del sistema nervioso (Lin S, Liu M, Son YJ, Timothy Himes B, Snow DM, Yu W, Baas PW. Inhibition of Kinesin-5, a microtubule-based motor protein, as a strategy for enhancing regeneration of adult axons. Traffic. 2011; 12:269-86; Baas PW, Matamoros AJ. Inhibition of kinesin-5 improves regeneration of injured axons by a novel microtubule-based mechanism. Neural Regen Res. 2015;10:845-9). Un estudio preliminar evaluó la utilidad del monastrol, un inhibidor de Eg5 con baja afinidad, combinado con injertos de nervio periférico y condroitinasa ABC para aumentar la regeneración axonal en ratas con LM (Xu C, Klaw MC, Lemay MA, Baas PW, Tom VJ Pharmacologically inhibiting kinesin-5 activity with monastrol

promotes axonal regeneration following spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2015 Jan;263:172-6). El injerto de nervio periférico actuaba como sustrato y guía para el crecimiento axonal a través de la zona de lesión, y la condroitinasa ABC como degradadora de proteoglicanos inhibidores de la regeneración axonal. El monastrol, administrado en solución por 14 días a través de una sonda intratecal en la zona del implante, tuvo un efecto facilitador adicional del crecimiento axonal, aunque sin repercusión en la recuperación funcional.

Se han desarrollado diversos inhibidores de Eg5 con mucha mayor afinidad y selectividad que el monastrol (Myers SM, Collins I. Recent findings and future directions for interphase mitotic kinesin inhibitors in cancer therapy. *Future Med Chem.* 2016;8:463-89), lo que les confiere un mayor potencial terapéutico. Existen varias patentes que reivindican estos compuestos y su uso como antimitóticos para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, las patentes US8765817 y US20150352114.

No obstante, no se ha investigado la utilidad de los inhibidores de Eg5 para el tratamiento de la fibrosis en el SN o en otros órganos corporales.

Los fármacos inhibidores de receptores tirosina quinasa también pueden tener efectos beneficiosos tras una lesión neurológica, incluyendo una disminución de la fibrosis. Por ejemplo, los inhibidores de los receptores del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR), como el imatinib, reducen la fibrosis en diversos modelos animales de enfermedad cutánea, pulmonar y hepática (Distler JH, Jünhidrogel A, Huber LC, Schulze-Horsel U, Zwerina J, Gay RE, Michel BA, Hauser T, Schett G, Gay S, Distler O. Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2007;56:311-22; Rhee CK, Lee SH, Yoon HK, Kim SC, Lee SY, Kwon SS, Kim YK, Kim KH, Kim TJ, Kim JW. Effect of nilotinib on bleomycin-induced acute lung injury and pulmonary fibrosis in mice. *Respiration.* 2011;82:273-87; Pesce A, Ciurleo R, Bramanti A, Armeli Iapichino EC, Petralia MC, Magro GG, Fagone P, Bramanti P, Nicoletti F, Mangano K. Effects of Combined Administration of Imatinib and Sorafenib in a Murine Model of Liver Fibrosis. *Molecules.* 2020;25:4310). Estos compuestos también se han propuesto para el tratamiento de las lesiones neurológicas. Por ejemplo, se han informado efectos antiinflamatorios, neuroprotectores y antifibróticos para el imatinib en roedores con LM (Abrams MB, Nilsson I, Lewandowski SA, Kjell J, Codeluppi S, Olson L, Eriksson U.

Imatinib enhances functional outcome after spinal cord injury. PLoS One. 2012;7(6):e38760), pero investigadores independientes no obtuvieron los mismos resultados con este medicamento (Sharp KG, Yee KM, Steward O. A re-assessment of treatment with a tyrosine kinase inhibitor (imatinib) on tissue sparing and functional recovery after spinal cord injury. Exp Neurol. 2014 Apr;254:1-11). A pesar de que su utilidad es controvertida, actualmente se desarrollan ensayos clínicos que evalúan la seguridad de la administración de imatinib en personas con lesión medular cervical (Treatment of Cervical Spinal Cord Injury With Imatinib - a Safety and Feasibility Study. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02363361).

10

De todo lo anterior resulta evidente que el control de la fibrosis tras las lesiones del SN es un problema no resuelto que es necesario abordar para ayudar a la reparación neural. La inhibición completa de la fibrosis o la utilización de fármacos neurotóxicos o que estabilicen el citoesqueleto de forma inespecífica, como es el caso del taxol, puede causar una extensión del defecto tisular y un fallo completo de las respuestas reparativas. La utilidad de los nuevos inhibidores selectivos de Eg5 para disminuir la fibrosis y aumentar el crecimiento neural se desconoce, y para un experto en la técnica tampoco es obvia la forma en que estos fármacos podrían administrarse y combinarse para tener un efecto positivo en la reparación neural. Por otra parte, se cree que los inhibidores de Eg5 pueden afectar negativamente la memoria y el aprendizaje (Freund RK, Gibson ES, Potter H, Dell'Acqua ML. Inhibition of the Motor Protein Eg5/Kinesin-5 in Amyloid β -Mediated Impairment of Hippocampal Long-Term Potentiation and Dendritic Spine Loss. Mol Pharmacol. 2016;89:552-9), por lo que sería necesario administrarlos directamente en la zona de lesión para limitar los efectos no deseados. Otros fármacos, como el imatinib, parecen ser beneficiosos en la LM, pero existe mucha duda sobre tales efectos ya que no se reprodujeron al ser evaluados por investigadores independientes.

20

25

30

35

Por otro lado, otra herramienta multifuncional que puede ayudar a la reparación de diversos tejidos es la estimulación eléctrica, ya que se ha demostrado que aumenta la migración y la división celular, así como la secreción de factores tróficos (Rajendran SB, Challen K, Wright KL, Hardy JG. Electrical Stimulation to Enhance Wound Healing. J Funct Biomater. 2021;12:40).

- Aunque los intentos previos no han conseguido promover la regeneración axonal a través de una lesión del SNC mediante electroestimulación, sí han demostrado que puede inducir algunas respuestas de crecimiento axonal (Martin JH. Neuroplasticity of spinal cord injury and repair. *Handb Clin Neurol.* 2022;184:317-330). Por ejemplo, en
- 5 roedores, consigue aumentar la ramificación de axones intactos del tracto corticoespinal (Brus-Ramer M, Carmel JB, Chakrabarty S, Martin JH. Electrical stimulation of spared corticospinal axons augments connections with ipsilateral spinal motor circuits after injury. *J Neurosci.* 2007;27:13793-801). No obstante, existen evidencias de que también puede tener el efecto contrario, es decir, inhibir la
- 10 regeneración axonal (Enes J, Langwieser N, Ruschel J, Carballosa-Gonzalez MM, Klug A, Traut MH, Ylera B, Tahirovic S, Hofmann F, Stein V, Moosmang S, Hentall ID, Bradke F. Electrical activity suppresses axon growth through Ca(v)1.2 channels in adult primary sensory neurons. *Curr Biol.* 2010;20:1154-64).
- 15 Los estímulos eléctricos de baja frecuencia (20 Hz) aumentaron la velocidad de regeneración de axones motores en el SNP (Al-Majed AA, Neumann CM, Brushart TM, Gordon T. Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. *J Neurosci.* 2000;20:2602-8), pero no lo hicieron en la médula espinal, incluso cuando simultáneamente se implantaron fragmentos de nervio periférico en la
- 20 zona lesionada (Harvey PJ, Grochmal J, Tetzlaff W, Gordon T, Bennett DJ. An investigation into the potential for activity-dependent regeneration of the rubrospinal tract after spinal cord injury. *Eur J Neurosci.* 2005;22:3025-35).
- Una estrategia en exploración para la reparación neural consiste en aplicar los
- 25 estímulos eléctricos a través de materiales electroconductores implantados dentro de la zona de lesión, que simultáneamente proporcionen sustrato y guía para el crecimiento neural. *In vitro*, la glía y las neuronas crecen muy bien sobre electrodos metálicos o de carbono recubiertos de polímeros conductores y biofuncionalizados con moléculas que promueven la adherencia celular (Collazos-Castro JE, Hernández-
- 30 Labrado G, Polo JL, García-Rama C. N-Cadherin and L1-functionalised conducting polymers for synergistic stimulation and guidance of neural cell growth. *Biomaterials* 2013;34:3603-3617). La electroestimulación a través de estos sustratos celulares puede actuar directamente sobre las neuronas o la glía o influir indirectamente sobre ellas al modificar o electrosecretar las moléculas presentes en la interfase
- 35 electrodo/célula (Collazos-Castro JE, Polo JL, Hernández-Labrado G, Padial-Cañete

V, García-Rama C. Bioelectrochemical Control of Neural Cell Development on Conducting Polymers. *Biomaterials* 2010;31:9244–9255; Collazos-Castro JE, García-Rama C, Alves-Sampaio A. Glial progenitor cell migration promotes CNS axon growth on functionalized electroconducting microfibers. *Acta Biomater.* 2016;35:42-56).

5

En este sentido, patentes previas (P201231969, PCT/ES2013/070879) han descrito microfibras electroconductoras modificadas con moléculas que promueven el crecimiento axonal y la migración glial por distancias largas *in vitro*. Desde el punto de vista neurofisiológico, las microfibras permiten un registro ultrasensible de la actividad neuronal (Vara H, Collazos-Castro JE. Biofunctionalized Conducting Polymer/Carbon Microfiber Electrodes for Ultrasensitive Neural Recordings. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7:27016-26), y también una mejor activación eléctrica de los circuitos neurales espinales (Vara H, Collazos-Castro JE. Enhanced spinal cord microstimulation using conducting polymer-coated carbon microfibers. *Acta Biomater.* 2019;90:71-86). Estas microfibras, incorporadas en hidrogeles de alginato para su implante en roedores con LM, también disminuyeron parcialmente la fibrosis y sirvieron de andamio para el crecimiento celular en las cavidades formadas en el tejido neural, facilitando la regeneración axonal y la migración celular dirigida (Alves-Sampaio A, Garcia-Rama C, Collazos-Castro JE. Biofunctionalized PEDOT-coated microfibers for the treatment of spinal cord injury. *Biomaterials* 2016; 89:98-113). A pesar de estos efectos histológicos, el implante de microfibras en hidrogel de alginato también incrementó la brecha en el tejido neural. La respuesta regenerativa axonal y glial fue limitada, probablemente debido a las características del alginato y su degradación con liberación de calcio, y al control deficiente de la fibrosis en la zona de lesión. Estos resultados generaron la necesidad de investigar estrategias adicionales para reducir el daño tisular y la respuesta cicatricial asociada a las lesiones neurológicas y a los implantes electroactivos en el SN, así como para promover la regeneración axonal.

Teniendo en cuenta el estado de la técnica descrito, se ha detectado la necesidad de desarrollar tratamientos que disminuyan la fibrosis y simultáneamente reduzcan la cavitación y la extensión del daño neural.

Este problema se resuelve en la presente invención gracias a los compuestos, métodos y dispositivos descritos que consiguen reducir la fibrosis y simultáneamente disminuir la cavitación del sistema nervioso y estimular el crecimiento neural a través

de la zona de lesión. Estos efectos múltiples son indispensables para una reparación exitosa del tejido neural, y se han logrado por medio de un implante que libera fármacos y aplica estímulos eléctricos en la zona de lesión, y que además puede combinarse con la administración de otros compuestos por vía local o sistémica para
5 mejorar la restauración de la arquitectura tisular.

Además de la reparación neural, la invención también encuentra aplicación en general en el campo de las neuroprótesis, ya que disminuye las respuestas inflamatorias y fibróticas alrededor de los electrodos implantados, mejorando la detección, activación
10 o modulación de la actividad eléctrica neuronal.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se encuadra en el sector técnico del desarrollo de implantes liberadores de fármacos, sistemas para electroestimulación neural, y combinaciones
15 farmacológicas y neuroprotésicas; proporcionando compuestos, métodos y dispositivos para limitar la inflamación y controlar la fibrosis en las zonas dañadas del sistema nervioso, así como para facilitar, estimular y dirigir el crecimiento axonal y la adherencia, proliferación, migración y diferenciación de células gliales, neuronas,
20 células vasculares, células del tejido conectivo, y otros tipos de células que pueden contribuir a la reparación de las lesiones neurológicas.

Más específicamente, esta invención se refiere a implantes electroactivos liberadores de fármacos con actividad antifibrótica y facilitadora del crecimiento neural, y a su uso
25 combinado con protocolos de electroestimulación y con otros fármacos para promover la reparación del sistema nervioso *in vivo*. Esta invención también se refiere a los compuestos, métodos y procedimientos para preparar y ejecutar dichos implantes; y a sistemas de electroestimulación neural que incorporan los compuestos o se coadministran con los compuestos para prevenir la fibrosis e inducir el crecimiento
30 axonal o dendrítico sobre o alrededor de los electrodos implantados.

Por tanto, esta invención encuentra aplicación industrial en las áreas de biomedicina, biotecnología, y bioingeniería e ingeniería tisular. Más específicamente, la invención tiene aplicación en la industria de la medicina regenerativa para controlar la fibrosis y
35 promover la reparación del tejido neural y la restitución funcional tras lesiones del

sistema nervioso, y en la de las neuroprótesis eléctricas para estimular o registrar la actividad eléctrica neural y sustituir las funciones perdidas. La presente invención también tiene aplicación en la industria biotecnológica, particularmente en el diseño de dispositivos para inducir la proliferación, migración y selección de células gliales y progenitores neurales y el crecimiento axonal *in vitro*. Finalmente, las aplicaciones pueden extenderse a la ingeniería de tejidos y órganos diferentes al sistema nervioso.

Además, la estimulación eléctrica en esta invención puede combinarse con los fármacos antifibróticos con esta finalidad, proporcionando efectos terapéuticos sinérgicos que no pueden obtenerse por dichas intervenciones de forma separada.

La presente invención se refiere a un implante multifuncional que libera fármacos y permite la aplicación de estímulos eléctricos en los sitios lesionados del sistema nervioso, controlando la fibrosis y aumentando el crecimiento de las células neurales, así como de otras células reparativas del tejido neural. El implante comprende un hidrogel que rellena el defecto tisular y contiene compuestos farmacológicos para liberación local, y electrodos para la aplicación de los estímulos eléctricos. Los electrodos pueden incorporarse dentro del hidrogel, usualmente en forma de microfibras o microalambres para ejercer de sustrato de crecimiento celular electroactivo, o bien pueden posicionarse adyacentes al hidrogel para estimular eléctricamente las estructuras perilesionales y promover el crecimiento neural a través de la lesión. Los efectos sobre la reparación tisular se obtienen por la acción combinada del hidrogel que rellena la lesión y evita así la acumulación de sangre y restos celulares, y simultáneamente facilita el crecimiento tisular, los fármacos que disminuyen la fibrosis y aumentan la migración glial y la extensión y ramificación de los axones, las microfibras que guían a las células y axones a través de la lesión, y la estimulación eléctrica que incrementa las respuestas reparativas. Además, el implante puede combinarse con otros fármacos administrados por vía local o sistémica para potenciar sus efectos terapéuticos.

La presente invención presenta las siguientes ventajas que le confieren gran potencial de desarrollo industrial, entre ellas:

- 1) Identifica compuestos farmacológicos, dosis y formas de administración muy eficientes para disminuir la fibrosis inducida por las lesiones en el sistema nervioso. Los fármacos pueden aplicarse localmente en las zonas de lesión,

formulados en un hidrogel de reabsorción lenta, evitando así su toxicidad sistémica y sin necesidad de implantar bombas y sondas para su liberación continua en el tejido neural.

- 2) Desarrolla un nuevo implante para el sistema nervioso lesionado, en donde el hidrogel que libera los fármacos se combina con electrodos para aplicar estímulos eléctricos, induciendo una respuesta de crecimiento celular que facilita el cierre del defecto tisular y no puede obtenerse con los fármacos o la estimulación eléctrica por sí solas. Los electrodos pueden incorporarse dentro del hidrogel para servir además de soporte y guía del crecimiento neural, o pueden posicionarse adyacentes al hidrogel para estimular las células perilesionales. El implante no contiene células, y por tanto no presenta las limitaciones y potenciales complicaciones médicas de la terapia celular o de los injertos de nervio periférico.
 - 3) Desarrolla una metodología para la aplicación del implante en lesiones traumáticas del sistema nervioso humano. El implante es fácilmente configurable para lesiones de diferente forma y tamaño, y por consiguiente fácilmente trasladable a la práctica clínica.
 - 4) El implante puede combinarse con la administración de otros fármacos por vía local o sistémica para mejorar las repuestas de reparación tisular.
- El hidrogel empleado puede fabricarse a partir de diversos compuestos aprobados para uso clínico, por ejemplo, la fibrina, y su componente farmacológico principal es un compuesto que reduce la proliferación celular sin presentar actividad neurotóxica en concentración nanomolar, preferencialmente una molécula que inhibe o bloquea la función de las quinesinas, en particular de la quinesina-5, también denominada Eg5 o KIF11. Tal como se ejemplifica en la presente invención, Eg5 se expresa abundantemente en las células del tejido conectivo (fibroblastos, pericitos, células meníngicas) que proliferan y forman una cicatriz fibrótica que impide la reparación tisular tras una lesión medular, y los fármacos que la inhiben, por ejemplo, el compuesto SB743921, disminuyen e incluso eliminan la formación del tejido fibroso y aumentan el crecimiento axonal en la zona de lesión. En la presente invención, fármacos inhibidores de Eg5 se incorporan en hidrogeles de fibrina sin perder su actividad, y se liberan por periodos de tiempo suficientes para controlar la fibrosis y facilitar las respuestas reparativas del tejido neural. Sin embargo, sin estimulación eléctrica y elementos para la adherencia y guía celular, el cierre del defecto tisular y crecimiento neural que se produce tras el implante del hidrogel es incompleto y

desorganizado, resultando inefectivo para la reparación funcional.

Para organizar y mejorar el crecimiento neural en la zona de lesión, inducir la actividad neural, y conseguir una reparación tisular funcional, el implante objeto de esta invención incluye electrodos que pueden ser de dos tipos:

- Internos, es decir, localizados en el interior del hidrogel, en cuyo caso se prefieren estructuras electroconductoras biofuncionalizadas y alineadas, como por ejemplo microfibras o nanoestructuras de carbono o microalambres metálicos recubiertos de biomoléculas que promuevan la adherencia y el crecimiento celular dirigido.

- Externos, es decir, localizados fuera del hidrogel, usualmente adyacentes al hidrogel o sobre las capas de tejido conjuntivo que envuelven al tejido neural, es decir, sobre las meninges del sistema nervioso central, o sobre el epineurio o el perineurio en los nervios periféricos. Estos electrodos pueden tener cualquier tipo de morfología que se adapte a los tejidos sobre los que se colocan para aplicar los estímulos eléctricos.

Por otra parte, la complejidad de las lesiones neurológicas y de las respuestas inflamatorias y fibróticas que se producen ante cualquier implante en el sistema nervioso todavía hacen necesario combinar el implante objeto de esta invención con la administración de otros fármacos antiinflamatorios y antifibróticos, así como facilitadores del crecimiento neural, para obtener los efectos reparativos deseados. Como se muestra en los ejemplos posteriores, los fármacos inhibidores del PDGFR como el imatinib son muy útiles para potenciar los beneficios del implante sobre la reparación del tejido neural.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un implante electroactivo liberador de fármacos que comprende:

a) un hidrogel que se selecciona de entre polímeros naturales o sintéticos, incluyendo polipéptidos, polímeros de fibrina, polímeros de moléculas de la matriz extracelular tales como la fibronectina, el colágeno, los proteoglicanos, o los glicosaminoglicanos, alginato, quitosano, acrilamida, metacrilato, hidrogelatina, y derivados y combinaciones de estos materiales;

b) al menos un fármaco que se incorpora al hidrogel anterior para controlar la fibrosis y facilitar el crecimiento axonal y la migración glial a través del sitio de lesión, en donde uno de los fármacos se selecciona de entre compuestos que bloquean o inhiben la función de las quinesinas, o que reducen su expresión, incluyendo inhibidores de la

quinesina Eg5 derivados de las carbolinas, bifenilo, quinazolinas, tiazolopirimidinas, tiadiazoles, dihidropirazoles, isoquinolinas, imidazoles, benzimidazoles, benzopiranos, pirrolinas, dihidropiridinas, tritilcisteina y benzamidas, así como ácidos ribonucleicos de interferencia o de silenciamiento;

- 5 c) un sistema de electrodos para la aplicación de estímulos eléctricos al tejido lesionado, en donde al menos un electrodo se posiciona dentro del hidrogel o adyacente a él.

En una realización preferida, los electrodos están en el interior del hidrogel y sirven
10 adicionalmente como soporte, guía y estímulo para el crecimiento celular en la zona de lesión.

En otra realización preferida, los electrodos interiores del hidrogel se seleccionan de entre microfibras de carbono, nanoestructuras de carbono, o microalambres de acero,
15 oro, platino, platino/iridio, u otros metales y sus óxidos, composites y aleaciones, entendiéndose como composite una mezcla heterogénea de estos metales con otros componentes no metálicos sintéticos o naturales para formar un solo compuesto.

En otra realización preferida, los electrodos están recubiertos de polímeros
20 conductores.

En otra realización preferida, el polímero conductor que recubre los electrodos se selecciona de entre poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT), polipirrol o polianilina.

25 En otra realización preferida, la superficie del electrodo o del polímero conductor está biofuncionalizada, es decir, se le ha unido al menos una molécula con actividad biológica para ayudar a las respuestas de crecimiento neural sobre o alrededor del electrodo.

30 En otra realización preferida, la molécula con actividad biológica usada para la biofuncionalización de los electrodos se selecciona de entre moléculas de adhesión celular, moléculas de la matriz extracelular, factores de crecimiento, factores guía para los axones o dendritas tales como netrinas, efrinas, semaforinas, protocadherinas o las proteínas Slit ó Wnt, morfógenos como Sonic Hedgehog, proteoglicanos,
35 glicosaminoglicanos, gangliósidos, proteínas, péptidos o combinaciones de estas

moléculas.

Para la biofuncionalización de los electrodos se pueden utilizar moléculas puente y métodos descritos en la literatura y en otras patentes, algunas de las cuales se
5 incorporan aquí como referencia (PCT/ES2013/070879).

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al método utilizado para la preparación del implante, según lo descrito anteriormente, que comprende la preparación de un hidrogel de fibrina a partir de una mezcla de una solución que
10 contiene fibrinógeno humano en concentraciones de entre 0,5 y 100 mg/ml y factor XIII; y una segunda solución que contiene trombina y CaCl_2 , donde las concentraciones finales se ajustan con NaCl al 0,9% en agua.

La mezcla de las dos soluciones para la formación del hidrogel (gelificación) puede
15 realizarse tanto *in vitro*, es decir, en tubos, moldes, placas u otros materiales de laboratorio, como *in vivo*, es decir, directamente en la zona de daño tisular para que se ajuste con más precisión a la forma y el tamaño de la lesión.

En una realización preferida, al menos una de las soluciones precursoras del hidrogel
20 contiene al menos un fármaco con actividad antifibrótica y/o facilitadora del crecimiento neural, que se retiene tras la gelificación de la fibrina.

En otra realización preferida, el fármaco se encapsula previamente en partículas, vesículas, liposomas o similares, de tamaño nanométrico o micrométrico, con el fin de
25 incrementar su retención o mejorar su actividad, y luego se incorpora a las soluciones precursoras del hidrogel.

En otra realización preferida, se incorporan microfibras, microalambres u otros elementos electroconductores alineados en el hidrogel, durante el proceso de
30 gelificación *in vitro* o *in vivo*.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la reparación del sistema nervioso, que comprende las siguientes etapas:

a. limpiar de restos celulares, sangre y adherencias fibróticas la zona de lesión
35 neurológica;

- b. formar el hidrogel del implante de la invención, según se ha descrito anteriormente; e
- c. implantar el hidrogel en la zona de lesión neurológica limpia según la etapa a) durante la gelificación de la etapa b) cuando ésta se produce *in vivo*, o tras la gelificación de la etapa b) cuando ésta se produce *in vitro*.

En una realización preferida, adicionalmente la zona de lesión se lava en la etapa a) con una solución que contiene un compuesto farmacológico, y se deja la solución en contacto con el tejido por algunos minutos para impregnar la zona perilesional con el fármaco previamente a la formación del hidrogel.

En otra realización preferida, el hidrogel con el compuesto farmacológico se forma *in vitro* y posteriormente se implanta en la zona de lesión neurológica limpia según la etapa a).

En otra realización preferida, el hidrogel con el compuesto farmacológico se forma *in vitro*, dentro de un segundo material implantable, y el implante compuesto resultante se introduce en la región dañada del sistema nervioso limpio según la etapa a).

En una realización preferida el hidrogel se forma con el compuesto farmacológico *in vivo*, de manera que la gelificación transcurre directamente en la zona de lesión neurológica limpia según la etapa a).

En otra realización preferida, el sistema de electrodos se implanta en la zona de daño neurológico y posteriormente se forma el hidrogel con el compuesto farmacológico *in vivo*, es decir, dentro del tejido neural, rodeando los electrodos y rellenando el defecto tisular.

En otra realización preferida, el hidrogel se forma *in vitro* con el compuesto farmacológico y el sistema de electrodos, y posteriormente se implanta en la zona de lesión neurológica.

En otra realización preferida, el hidrogel con el compuesto farmacológico se gelifica *in vivo* dentro del defecto tisular, y el sistema de electrodos se posiciona adyacente al hidrogel, dentro del sistema nervioso o sobre las membranas que envuelven al tejido

nervioso (meninges, epineurio, perineurio).

Un cuarto aspecto de esta invención se refiere a la aplicación de estímulos eléctricos por el sistema de electrodos interno o externo del implante, con el fin de estimular o
5 dirigir las respuestas reparativas tisulares o activar las células neurales e inducir la descarga de potenciales de acción.

En una realización preferida, se aplican estímulos eléctricos bifásicos a través de los electrodos del implante.

10

En otra realización preferida, se aplican estímulos eléctricos monofásicos a través de los electrodos del implante.

En otra realización preferida, los estímulos eléctricos empiezan o consisten en una corriente eléctrica de polaridad negativa.

15

En otra realización preferida, los estímulos eléctricos empiezan o consisten en una corriente eléctrica de polaridad positiva.

En otra realización preferida, la intensidad de la corriente eléctrica aplicada, en valor absoluto, está comprendida entre 1 nanoamperio y 20 miliamperios.

20

En otra realización preferida, la frecuencia de los estímulos eléctricos está comprendida entre 0,00001 Hz y 100000 Hz.

25

Un último aspecto se refiere al uso del implante electroactivo en combinación con compuestos farmacológicos administrados por vía local o sistémica, que faciliten la integración del implante y la reparación neural.

En una realización preferida, el implante electroactivo se combina con la administración adicional de al menos un fármaco antiinflamatorio, antifibrótico, antibiótico, neuroprotector, o facilitador del crecimiento neural.

30

En otra realización preferida, el implante se combina con la administración de un inhibidor de receptores tirosina quinasa que se selecciona de entre el imatinib,

35

sunitinib, sorafenib, masitinib, dasatinib, nilotinib, gefitinib, erlotinib, lapatinib, y tofacitinib.

5 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10 Igualmente, a lo largo de esta memoria de la invención se citan numerosos documentos que se incorporan aquí como referencia.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 **Fig. 1** ilustra el desarrollo del tejido conectivo fibrótico después de una transección de la médula espinal en ratas.

A) Vista dorsal del procedimiento quirúrgico llevado a cabo en la medula de rata con escisión de 2 mm de tejido neural y posterior sutura de la duramadre. **B)** Desarrollo de la proliferación y migración de células fibróticas positivas para PDGFR (verde) en la zona de lesión. A los 6 días post-lesión (DPL), se ha formado una densa cicatriz fibrótica que bloquea cualquier posibilidad de reconexión del sistema nervioso. **C)** La gran mayoría de las células cicatriciales que se interponen al crecimiento axonal y la migración de los astrocitos (GFAP, rojo) también expresan la quinesina EG5 (verde). En el panel derecho inferior se muestra un control negativo de tinción para EG5, omitiendo el anticuerpo primario. Las secciones de tejido tienen 10 µm de grosor. Barras de escala: B, 500 µm; C, izquierda, 200 µm; C derecha, 50 µm.

Fig. 2 demuestra la reducción de la proliferación de fibroblastos meníngeos tras su exposición al compuesto SB743921, un inhibidor de la quinesina EG5.

30 **A)** Aumento del número total de células a lo largo de 48 horas en cultivos no tratados (negro) o tratados con SB743921 (gris). Sin tratamiento, el número inicial de células se multiplicó por 4-5 veces, mientras que con el tratamiento el número de células permaneció constante. **B)** Cuantificación de las células que incorporaron EdU, un indicador de síntesis de ADN para la mitosis. Sin el fármaco (negro), el 90 % de las células entraron en mitosis a lo largo de las 48 horas de seguimiento; mientras que

solo el 20 % lo hicieron en presencia del fármaco (gris). **C)** Aspecto de las células sin tratamiento (fila superior) y tratadas con SB743921 (fila inferior), procesadas para inmunocitoquímica a las 48 horas de cultivo. Las células tratadas seguían vivas, pero mostraban alteraciones en el citoesqueleto (tubulina, rojo).

5 **Fig. 3** ejemplifica la reducción de la fibrosis tras una lesión medular y administración sistémica (subcutánea) de SB743921 en ratas.

A, B, C), Aspecto de la zona de lesión a 7 DPL en cortes histológicos de 10 µm de espesor, procesados para los marcadores que se indican. Se observó una reducción parcial de la fibrosis (PDGFR, verde) tras la administración de SB743921, que además
10 era más laxa y permitía el crecimiento de numerosos axones positivos para neurofilamento (NF, rojo). Como consecuencia, los muñones se acercaron y la brecha del tejido neural se redujo a menos de 500 µm, tal como se detectó con el marcaje para GFAP (rojo en **E** y **F**) y MAP2 (rojo en **H** e **I**). Los axones serotoninérgicos (verde en **D** y **F**) y noradrenérgicos (TH, verde en **G** e **I**) entraron a la zona cicatricial,
15 aproximándose al muñón caudal. Barras de escala: **A, B**, 200 µm; **C – I**, 100 µm.

Fig. 4 ilustra la reducción de la fibrosis tras una lesión medular y administración sistémica de imatinib, un inhibidor del receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR), a los 6 DPL en ratas.

A) Ejemplo de la fibrosis (PDGFR, verde) en la médula de un animal control sin
20 tratamiento farmacológico, sacrificado a los 6 DPL. **B)** Reducción marcada de la fibrosis tras la administración de Imatinib, en un animal sacrificado también a los 6 DPL. El tratamiento permitió que la brecha tisular se cerrara y los muñones de la médula entraran en contacto, tal como se observa con la tinción para neurofilamento (rojo en **C**) y astrocitos (GFAP, rojo en **D**). Algunos axones serotoninérgicos (verde en
25 **D**) cruzaron la lesión y entraron en el muñón caudal (flecha en **D**). Barra de escala: 500 µm.

Fig. 5 ejemplifica la reducción de la fibrosis tras una lesión medular y administración de un tratamiento combinado con SB743921 e imatinib por vía subcutánea en ratas.

A, B) Aspecto de la médula espinal en un animal control sin tratamiento. Una densa cicatriz positiva para PDGFR separa los muñones rostral y caudal, creando una brecha neural de aproximadamente 2 mm de largo. Ni los axones, (NF, serotonina) ni los astrocitos (GFAP) se extendieron en el interior de la cicatriz. **C, D)** Aspecto de la médula en un animal tratado con SB743921 e imatinib. La combinación de fármacos eliminó por completo la fibrosis (**C**) aproximando parcialmente los muñones de la
35 médula, pero sin completarse el cierre del defecto tisular. Las regiones delimitadas por

rectángulos en C y D se magnifican en la parte inferior (c, d), para ilustrar la abundante ramificación axonal tanto en el muñón caudal (c) como en el muñón rostral (d). Ante la ausencia de un sustrato para su crecimiento a través de la brecha tisular, los axones se acumularon en el borde de los muñones. Barras de escala: A-D, 500 μm ; b y d, 100 μm .

Fig. 6 ejemplifica el implante de microfibras electroconductoras (MFs) en hidrogel de fibrina, formado *in vitro* o *in vivo*, en el sitio de transección de la médula espinal en ratas.

A) Ejemplo de la brecha tisular de 2 mm creada en la médula espinal. B) Inserción de las MFs directamente en la brecha tisular, con posterior gelificación *in vivo* del hidrogel de fibrina. C) Implante de un hidrogel formado *in vitro* de fibrina con MFs que se introduce en la zona de lesión. D) Aspecto de la médula espinal, representativo para ambas metodologías de implante. Ninguno de los dos procedimientos aumentó el daño tisular, pero tampoco evitó la formación de la cicatriz fibrótica positiva para PDGFR que bloqueó el crecimiento neural a través de la zona de lesión. Barra de escala en D, 500 μm .

Fig. 7 ilustra la cavitación tisular y la fibrosis en ratas con transección de la médula espinal y electroestimulación en el sitio de lesión, sin implante de hidrogel ni administración de fármacos.

Se aplicaron pulsos eléctricos bifásicos durante 10 días en la zona de lesión, implantando los electrodos y utilizando el protocolo de estimulación con los métodos descritos pormenorizadamente en el ejemplo 7. Las médulas se extrajeron a los 14 DPL, se cortaron a 10 μm de grosor y se procesaron para los marcadores indicados en cada panel de la figura. La electroestimulación no modificó significativamente la fibrosis (PDGFR) que selló los muñones, y llevó a la formación de cavidades en la medula. Las células neurales (astrocitos, GFAP), neuronas (MAP2) quedaron separados por las cavidades y el tejido fibrótico, que tampoco permitió que los axones (serotoninérgicos, SER; noradrenérgicos, TH) atravesaran de un lado al otro. Barras de escala: 500 μm .

Fig. 8 ejemplifica el implante de hidrogel formado *in vitro* con fibrina, SB743921, microfibras electroconductoras, y microalambre para estimulación eléctrica en el sitio de transección de la médula espinal en ratas.

A) El implante de hidrogel de fibrina/ SB743921 con microfibras se introdujo en la brecha tisular de 2 mm; posteriormente se posicionó un microalambre de acero inoxidable (50.8 μm de diámetro, con aislamiento de teflón que se remueve de la

punta, dejando 1 mm expuesto, flecha amarilla) rostral y dorsal con relación al implante. Finalmente se suturó la duramadre con un hilo 10-0. El contraelectrodo se colocó ventral, en el tejido abdominal subcutáneo. Los cables del electrodo de estimulación y del contraelectrodo terminaban en pines de oro que salían por la piel dorso-caudal del animal. **B)** un tren de 15 pulsos eléctricos bifásicos, con una duración total de 45 ms, se aplicó cada 2 s durante 90 minutos por 10 días, comenzando el cuarto día post-lesión.

Fig. 9 ilustra la reducción de la cavitación, promoción del crecimiento neural y cierre de la brecha medular en ratas, tras el implante del hidrogel formado *in vitro* con fibrina/SB743921/microfibras y electroestimulación.

A los 14 DPL, se extrajeron las médulas espinales y se cortaron en secciones de 10 µm de grosor, y se procesaron con inmunohistoquímica para los marcadores que se especifican. En la **izquierda** se ilustra el estado de la médula en los animales que no recibieron electroestimulación, en los que se produjo una cavidad vacía de células en la zona de la lesión. En la **derecha** se muestra la respuesta tisular a la electroestimulación, que cerró el defecto tisular y produjo el crecimiento de numerosos axones (NF) en la zona de lesión, acompañado de migración de astrocitos (GFAP) a partir de los bordes de la lesión. Barra de escala: 250 µm.

Fig. 10 ejemplifica la sinergia terapéutica entre el implante electroactivo que libera SB743921 y la administración sistémica de imatinib en ratas con transección de la médula espinal.

Se muestran secciones histológicas del centro de la lesión, procesadas para inmunohistoquímica de GFAP y serotonina a los 14 DPL. Todos los animales recibieron el implante y la estimulación eléctrica como se ilustró en las figuras 8 y 9, reduciendo sustancialmente la brecha de tejido neural de 2 mm a aproximadamente 500 µm. En la **derecha** se muestra que, en los animales tratados adicionalmente con imatinib, se produjo una mayor ramificación y crecimiento axonal, en comparación con aquellos a los que no se les administró el fármaco (**izquierda**). Los axones adelantaron al frente de crecimiento astrocitario (GFAP), adentrándose en la lesión. Los axones noradrenérgicos y en general los marcados para neurofilamento (no mostrados) también aumentaron su crecimiento en respuesta al imatinib. Barra de escala: 200 µm.

Fig. 11 ejemplifica el implante de hidrogeles formados *in vitro* de fibrina/microfibras electroconductoras, tras una contusión de la médula espinal en cerdos.

Fotografías intraoperatorias donde se muestra la reintervención que se realizó 24

horas después de la contusión, con apertura de las meninges (A, B) y eliminación del tejido desvitalizado (C), creando una cavidad en la cual se introdujeron los implantes de hidrogeles de fibrina/microfibras (D, E). Finalmente, se suturó la duramadre (F).

Fig. 12 muestra la mejoría del crecimiento neural en cerdos con contusión/compresión medular que recibieron el implante de fibrina con microfibras electroconductoras formado *in vitro*.

A) Secciones de la médula espinal de 10 μm de grosor, procesadas con inmunohistoquímica para PDGFR y NF, 1 mes después de la lesión. En el caso de los animales que solo recibieron la contusión (control) se formaron cavidades y una zona de cicatriz fibrótica densa, positiva para PDGFR, con restos de axones fragmentados (ampliación a la derecha). En los animales con mielotomía sin implante se redujo la cavitación, pero la cicatriz fibrótica impidió la entrada de axones a la zona de lesión. En los animales con mielotomía e implante de fibrina/microfibras se encontraron numerosos axones creciendo asociados a las células positivas para PDGFR (ampliación a la derecha), a pesar de cierto incremento en el daño neural. **B)** Cuantificación del volumen y ocupación de la lesión por tejido en los distintos grupos de tratamiento. **C)** Volumen de la lesión ocupado por axones en general (NF), astrocitos (GFAP), y axones serotoninérgicos (Ser). El implante de los hidrogeles de fibrina/microfibras incrementó el volumen y la celularidad de la lesión, así como el tejido regenerativo con axones (NF) y astrocitos dentro de la lesión. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en estos parámetros, entre el grupo con implante versus los grupos control y mielotomía. Barras de escala: A izquierda 500 μm ; A derecha, 100 μm

Fig. 13 ejemplifica la gelificación *in vivo* de fibrina/SB743921 en la zona de contusión de la médula espinal en cerdos.

Para la gelificación de fibrina con SB743921 *in vivo* en la zona de lesión, la médula contusionada **(A)** se expuso quirúrgicamente de nuevo, 24 horas después de la contusión **(B)**, y se realizó una incisión longitudinal en las meninges, incluyendo la pia, tras la cual una parte del tejido desvitalizado se evacuó espontáneamente **(C)**. La zona lesionada se lavó suavemente con solución salina y posteriormente con una solución 5 μM de SB743921 **(D)**. Tras limpiar la cavidad, se llenó con las soluciones para formar el hidrogel *in situ* **(E)**. Finalmente, se suturó la duramadre **(F)**.

Fig. 14 ilustra la reparación neural en cerdos con contusión medular y gelificación *in vivo* de fibrina/SB743921.

Las médulas espinales se extrajeron a los 2 meses post-lesión, se cortaron en

secciones de 10 µm de grosor, y se procesaron para inmunohistoquímica de PDGFR, NF, y axones noradrenérgicos (TH). **A)** Histología de la médula en los animales control, que sufrieron la contusión sin tratamiento, mostrando una cavidad con fragmentos axonales, y una cicatriz PDGFR laxa (**a**) que en cualquier caso resultó

5 inhibitoria para la regeneración axonal (**D**). **B)** Aspecto de la médula en los animales con contusión más mielotomía 24 horas después. El lavado limpió eficientemente la zona de lesión, que terminó en una cavidad sin apenas tejido (**b**) y al igual que en los animales control, el crecimiento axonal se limitó a los bordes de la lesión (**E**). **C)** Reparación tisular en los animales con gelificación de fibrina/SB743921 en la zona de

10 lesión. La brecha tisular se cerró parcialmente, con abundante crecimiento axonal (NF) asociado a células PDGFR (**c**). Los axones TH se ramificaron copiosamente y crecieron dentro de la zona de lesión (**F**). Barras de escala: A-C, 500 µm; a-F, 100 µm. **Fig. 15** muestra el efecto antifibrótico y facilitador del crecimiento neural del hidrogel de fibrina/SB743921, formado *in vitro* e implantado con un material adicional de soporte, en

15 una hemisección medular cervical con una brecha de 1 cm en el tejido neural en cerdos. Se implantó un hidrogel de fibrina formado *in vitro* con SB743921 (**SB**) o sin SB (**No SB**) dentro de un tubo de silicona para darle soporte mecánico en la zona de lesión. Las médulas espinales se extrajeron a los 30 días post-lesión para evaluar las respuestas celulares, y se seccionaron a 50 µm de grosor para la tinción de eriocromo-cianina (arriba

20 a la izquierda), o a 10 µm de grosor para tinciones inmunohistoquímicas de PDGFR (verde) y NF (rojo) (arriba a la derecha y ampliaciones abajo). El hidrogel se degradó solo parcialmente en ambos casos, quedando restos contenidos en el tubo de silicona (estrellas). Se desarrolló una extensa fibrosis dentro y alrededor del tubo en ausencia de SB (flecha), pero la fibrosis se suprimió casi por completo cuando los implantes contenían

25 SB (flecha). Sin el fármaco, la fibrosis fue impenetrable para los axones, encontrándose bulbos degenerativos axonales justo en la interfaz con el tejido fibrótico (flecha en el panel inferior izquierdo); mientras que, con el fármaco, se observaron numerosos axones creciendo hasta el borde de la lesión, incluso cuando existía algún remante de fibrosis (flecha en el panel inferior derecho). Barra de escala, 5 mm.

30 **Fig. 16** ilustra el implante de hidrogel de fibrina formado *in vitro* con SB743921 y un ensamblaje de microfibras electroconductoras interconectadas, y electrodos epidurales, en una hemisección medular con escisión de tejido en cerdos.

A-D) Electrodeposición del polímero conductor PEDOT:PSS-co-MA sobre un ensamblaje de microfibras de carbono (20 MFs de 12 mm de longitud), interconectadas por un

35 microalambre de 35N LT de 12.8 µm de diámetro. **A)** Voltaje registrado durante la

electrodeposición, indicativo de la oxidación del EDOT. **B)** Aspecto del ensamblaje recubierto con polímero. **C-D)** Corriente eléctrica registrada durante la aplicación de pulsos de 0.3 V / 100 ms, antes (**C**) y después (**D**) de la electrodeposición, mostrando el incremento de corriente debido al recubrimiento polimérico. **E)** Implante del hidrogel de fibrina (estrella) que contiene el ensamblaje de microfibras interconectado eléctricamente, en la lesión de la médula espinal porcina. **F)** Sutura de la duramadre y fijación epidural de electrodos metálicos auxiliares (contraelectrodo y electrodo de referencia), a 5 mm de los bordes de la lesión. La flecha señala el microalambre de 35N LT que termina en el conector.

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1: Desarrollo del tejido conectivo fibrótico después de una transección de la médula espinal en ratas.

Se utilizó un modelo de transección medular en rata macho Wistar adulta. Los protocolos experimentales siguieron las normativas de la Comisión Europea y la legislación española para la protección de los animales de experimentación (86/609/CEE, 32/2007 y 223/1988) y fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo, España. En resumen, los animales se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal (IP) de pentobarbital (50 mg/Kg) y xilacina (10 mg/Kg), proporcionando dosis suplementarias del 30 % hora y media después según la necesidad. También se administró atropina (0.04 mg/Kg, IP) para disminuir las secreciones bronquiales, marbofloxacino como antibiótico profiláctico, y un ungüento oftálmico para prevenir la abrasión de la córnea. Se realizó una laminectomía dorsal de las vértebras T9-T10, bajo las cuales se encuentran los segmentos medulares T10 y T11, respectivamente. Se hizo un pequeño corte diagonal en la duramadre, seguido de una transección completa de la médula espinal. Tras un segundo corte más rostral, se extrajo el tejido entre medias dejando una brecha de tejido neural de aproximadamente 2 mm (Fig. 1A). El sangrado se controló introduciendo un fragmento de Espongostan® en la cavidad, que se retiró una vez conseguida la hemostasia. Posteriormente se realizó una durorrafia con puntos simples empleando un hilo de 10-0; y finalmente, se suturaron por planos los

músculos y la piel.

Se utilizaron 18 animales que se distribuyeron en 6 grupos de supervivencia de 2 a 7 días tras la lesión. Los animales fueron anestesiados y perfundidos por vía transcardiaca con solución salina y paraformaldehído al 4 %. Se extrajeron las
5 médulas espinales y se sumergieron en sacarosa al 30 % por 3 días, y luego se cortaron en secciones de 10 micras para proceder a las tinciones histológicas e inmunohistoquímicas. El desarrollo del tejido conectivo fibrótico se evaluó mediante tinción inmunohistoquímica para el receptor del factor de crecimiento derivado de las
10 plaquetas (PDGFR), que es expresado por pericitos y fibroblastos. El anticuerpo monoclonal utilizado (Abcam [Y92] - C-terminal ab32570) fue hecho en conejo contra un péptido sintético que está dentro del PDGFR humano, entre el aminoácido 1050 y el carboxilo terminal (Database link: P09619). Además, se evaluó la expresión de la quinesina Eg5 en el tejido fibrótico (anticuerpo policlonal GTX30692), y la presencia de
15 astrocitos, identificados por su expresión de proteína ácida fibrilar glial (GFAP, anticuerpo BD Biosciences 556327).

Para las tinciones inmunohistoquímicas, las secciones de tejido se bloquearon por 1 hora a temperatura ambiente en tampón fosfato salino (PBS) que contenía tritón al 0.3
20 % y suero de cabra al 2 %, y después de lavarse se incubaron con los anticuerpos primarios durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se trataron por 2 horas con anticuerpos secundarios fluorescentes (marcados con Alexa-488 o Alexa-594), disueltos en PBS. En todos los casos se incluyeron secciones control sin anticuerpos primarios para evaluar la confiabilidad de la tinción. Los núcleos celulares se tiñeron
25 con bisbencimida (Hoechst 33342, Molecular Probes, 1.5 mg/ml en PBS por 15 minutos).

La Fig. 1B ilustra la proliferación y migración de células fibróticas a partir de las meninges y del espacio perivascular (fibroblastos y pericitos), que se tiñeron muy
30 eficientemente mediante inmunohistoquímica para el PDGFR en la zona de lesión. La invasión de la cavidad medular por dichas células cicatriciales comenzó el día 2 y se había completado el día 6 post-lesión, creando un tejido fibrótico denso. En casos excepcionales, entre el día 4 y el día 6 post-lesión tuvo lugar cierta contracción de la cicatriz, aproximando parcialmente los muñones rostral y caudal de la médula espinal
35 a una distancia menor de 1 mm (Fig. 1B). Sin embargo, en la mayoría de los casos la

cicatriz fibrótica se extendió por 1 a 3 mm en el sentido longitudinal de la médula. Los axones siempre se detenían o se desviaban en el borde de lesión, siendo incapaces de atravesar la cicatriz. Los astrocitos también permanecieron confinados al borde de la lesión (Fig. 1C). La inmensa mayoría de las células del tejido fibrótico expresaban Eg5 (Fig. 1C).

Ejemplo 2: Reducción de la proliferación de fibroblastos meníngeos tras su exposición al compuesto SB743921, un inhibidor de la quinesina Eg5.

Tras comprobar que Eg5 se expresa en el tejido conectivo fibrótico cicatricial que se forma en la médula y que se genera en gran parte de las meninges, se investigó el efecto del compuesto SB743921 sobre la proliferación de los fibroblastos meníngeos *in vitro*. Este compuesto es un inhibidor muy potente ($K_i = 0.1$ nM) de Eg5 (Myers SM, Collins I. Recent findings and future directions for interpolar mitotic kinesin inhibitors in cancer therapy. *Future Med Chem.* 2016;8:463-89).

Los fibroblastos meníngeos se cultivaron a partir de la duramadre y la aracnoides de rata adulta en presencia de suero fetal bovino, siguiendo los procedimientos publicados (Collazos-Castro JE, Polo JL, Hernández-Labrado G, Padial-Cañete V, García-Rama C. Bioelectrochemical Control of Neural Cell Development on Conducting Polymers. *Biomaterials* 2010;31:9244–9255). A las 24 horas de sembrar las células, se adicionó SB743921 en concentración final de 10 nanomolar (nM). El comportamiento de las células vivas se estudió mediante videomicroscopía, capturando imágenes cada 30 minutos por 48 horas. En cultivos independientes se estudió también la proliferación celular mediante la incorporación de 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU). Las células se cultivaron sin o con SB743921 en concentración 10 nM, y se fijaron con paraformaldehído a las 48 h, tras lo cual se procesaron para revelar fluorescentemente la EdU, y visualizar las células y sus núcleos utilizando inmunohistoquímica para tubulina y Hoechst, respectivamente.

Los estudios de videomicroscopía revelaron que los fibroblastos meníngeos tratados con SB743921 detenían su división, pasando un periodo prolongado de tiempo en forma esférica sin terminar la mitosis, y posteriormente adquirían una morfología aberrante heterogénea caracterizada por incremento del tamaño celular, acompañado de ensanchamiento y deformación del núcleo, así como aplanamiento de su citoplasma. Sin embargo, no se observó un efecto citotóxico directo del fármaco. Las

células tratadas con SB743921 vivieron las 48 horas, pero mantuvieron su número original, mientras las células sin tratamiento se multiplicaron entre 4 y 5 veces ($P < 0.001$; Fig. 2A). Además, a las 48 horas casi el 90 % de las células control había incorporado EdU, es decir, habían sintetizado DNA para dividirse, en comparación con el 20 % de las tratadas con el fármaco ($P < 0.001$; Fig. 2B y C).

Ejemplo 3: Reducción de la fibrosis tras una lesión medular y administración sistémica de SB743921 en ratas.

Habiendo demostrado que el SB743921 inhibe muy eficientemente la proliferación de los fibroblastos menígeos *in vitro*, se procedió a investigar su toxicidad *in vivo* y su efecto sobre la fibrosis tras una lesión medular en ratas. Se utilizó el mismo modelo de transección de la médula espinal descrito en el ejemplo 1, es decir, se creó una brecha neural de 2 mm y se suturó la duramadre sin otros tratamientos en el sitio lesionado. El fármaco se disolvió en agua a 0.8 mg/ml y se administró por vía sistémica (subcutánea, SC).

Para este ensayo se utilizaron en total 30 animales distribuidos en 5 grupos con pautas diferentes de tratamiento con SB743921:

- a) 1 mg/kg subcutáneo, una dosis cada 24 horas por 2, 4 o 6 días, comenzando a las 12 horas post-lesión.
- b) 1 mg/kg, 5 dosis en total, cada 12 horas, comenzando a las 12 horas post-lesión.
- c) 1 mg/kg, 4 dosis en total, cada 12 horas, empezando a las 24 horas post-lesión.
- d) 1 mg/kg, 4 dosis en total, cada 12 horas, empezando a las 12 horas post-lesión.
- e) 1.125 mg/kg, 4 dosis en total, cada 12 horas, comenzando a las 12h post-lesión.

La médula se extrajo a los 7 DPL para su estudio histológico, ya que para ese momento el tejido conectivo fibrótico había sellado los muñones en los animales que no recibieron ningún tratamiento (ejemplo 1 y Fig. 1).

El daño neural, el desarrollo de la fibrosis, la inflamación y las respuestas reparativas (crecimiento axonal, migración glial, crecimiento de vasos sanguíneos) fueron evaluadas mediante tinciones inmunohistoquímicas para axones (neurofilamento, NF, Sigma-Aldrich N0142; serotonina, ImmunoSolution IG1112; tirosina hidroxilasa, TH, Sigma AB152), somas neuronales y sus dendritas (proteína asociada a los microtúbulos, MAP2, Sigma M1406), astrogliá (proteína ácida fibrilar glial, GFAP, BD Biosciences 556327); pericitos y fibroblastos (PDGFR, Abcam AB32570; colágeno tipo

IV, Meridian, T40251R), macrófagos y microglía (ED1; Chemicon MAB 1435; isolectina B4, Fisher I21411), y células endoteliales (RECA1, Bio-Rad, MCA970R). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 1.

- 5 Tabla 1. Efecto de la administración sistémica de SB743921 en ratas con transección de la médula espinal

Pauta del fármaco	Efectos adversos sistémicos	Reducción de la fibrosis	Daño del tejido neural
a	No se detectan en el período de supervivencia (7 días post-lesión, DPL).	Leve reducción a partir de la 4ª dosis.	Atrofia medular severa con 6 dosis.
b	Mortalidad > 50 % a 7 DPL. Diarrea, peritonitis.	Parcial.	Microhemorragias leves.
c	Diarrea, peritonitis, mucositis.	Inconsistente.	Se incrementa por inflamación.
d	Diarrea. Mucositis.	Inconsistente.	Se incrementa por inflamación.
e	Mortalidad > 90 % a 7 DPL. Diarrea, peritonitis.	Inconsistente.	Inconsistente.

Como se indica en la tabla 1, el esquema de tratamiento más efectivo fue el "b", que redujo parcialmente la fibrosis. Generalmente se formó un remanente cicatricial de 300 a 500 micras en el sentido rostrocaudal de la médula espinal, aproximando sustancialmente los muñones y acompañado de crecimiento y ramificación axonal (Fig. 3). Axones marcados para neurofilamento, serotonina, o tirosina hidroxilasa ingresaron al tejido fibrótico y prácticamente alcanzaron el muñón caudal a los 7 DPL. No hubo signos evidentes de neurotoxicidad en el tejido perilesional, aunque se detectó daño tisular por microhemorragias, con alteraciones vasculares debidas a la inhibición de la proliferación celular. 4 de los 7 animales que recibieron la pauta "b" habían muerto a los 7 DPL con signos de enterocolitis y traslocación bacteriana o perforación intestinal, y los supervivientes ya mostraban signos de afectación intestinal.

20

En conclusión, el SB743921 fue un fármaco parcialmente efectivo para reducir la fibrosis y aumentar el crecimiento axonal cuando se administró por vía sistémica, pero tuvo una elevada mortalidad en las ratas con transección de la médula espinal,

haciendo necesaria la búsqueda de esquemas terapéuticos más seguros a la vez que efectivos para esta finalidad.

Ejemplo 4: Reducción de fibrosis tras una lesión medular y administración sistémica de imatinib, un inhibidor del receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR), en ratas.

Debido a la alta toxicidad del SB743921 administrado por vía sistémica, se investigó la posibilidad de reducir la fibrosis con imatinib, un inhibidor del PDGFR. Este receptor participa en la migración y proliferación de fibroblastos y pericitos durante la cicatrización de otros órganos (Rajkumar VS. Platelet-derived growth factor β -receptor activation is essential for fibroblast and pericyte recruitment during cutaneous wound healing. Am J Pathol 2006; 169:2254-65) y, como se mostró en el ejemplo 1, se expresa abundantemente en el tejido fibrótico que se forma tras la lesión medular.

Se utilizó el mismo modelo de transección de la médula espinal y los métodos de evaluación histológica descritos en los ejemplos 1 y 3. El fármaco se disolvió en agua a 100 mg/ml y luego en solución salina 0.9 % y se administró por vía subcutánea (SC) o intraperitoneal (IP). Para este ensayo se utilizó un total de 30 ratas distribuidas en 5 grupos con pautas diferentes de imatinib:

- a) 5 dosis SC de 50 mg/kg, cada 24 horas, comenzando 1 hora post-lesión.
- b) 5 dosis IP de 50 mg/kg, cada 24 horas, comenzando 1 hora post-lesión.
- c) 6 dosis IP incrementales de 50/50/80/80/110/110 mg/kg, cada 24 horas, comenzando 1 hora post-lesión.
- d) 6 dosis SC incrementales de 50/50/100/100/150/150 mg/kg, cada 24 horas, comenzando 1 hora post-lesión.
- e) 6 dosis IP incrementales de 50/50/100/100/150/150 mg/kg, cada 24 horas, comenzando 1 hora post-lesión.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Efecto de la administración sistémica de imatinib en ratas con transección de la médula espinal

Pauta del fármaco	Efectos adversos	Reducción de la fibrosis	Daño del tejido neural
a	Epidermólisis en el sitio de inyección.	Insignificante	No detectado.
b	Tumefacción e inflamación de la pared abdominal.	Insignificante	No detectado.
c	Necrosis pared abdominal. Diarrea, peritonitis.	Insignificante	No detectado.
d	Epidermólisis severa, no se pudo completar la pauta.	Inconsistente.	Inconsistente
e	Muerte de los animales 4 a 12 DPL. Diarrea, peritonitis.	Muy efectiva	Severo por hemorragia peri-lesional.

Como se indica en la tabla 2, el único esquema de tratamiento efectivo con imatinib fue el "e", que redujo marcadamente la fibrosis y aumentó el crecimiento axonal (Fig. 4). Los efectos sobre el tejido neural tuvieron ciertas diferencias con los obtenidos al administrar la pauta "b" de SB743921, ya que el tratamiento con las dosis efectivas de imatinib permitió un mayor cierre del defecto tisular. Los bordes de la médula estaban en contacto al sexto día post-lesión, y algunos axones marcados para neurofilamento, e incluso axones serotoninérgicos y noradrenérgicos habían entrado en el muñón caudal. Por otra parte, el daño tisular perilesional también se incrementó con esta pauta de imatinib, debido a la presencia de hemorragias mayores que las que ocurrieron con SB743921. En cualquier caso, los animales tratados con la pauta "e" de imatinib murieron invariablemente entre los 4 y los 12 DPL, con signos de enterocolitis y traslocación bacteriana o perforación intestinal.

Ejemplo 5: Reducción de la fibrosis tras una lesión medular y administración de un tratamiento combinado con SB743921 e imatinib por vía subcutánea en ratas.

Se estudio la posibilidad de disminuir la fibrosis administrando una combinación de SB743921 e imatinib por vía sistémica. Las dosis de ambos fármacos se disminuyeron progresivamente para limitar sus efectos adversos a la vez que conocer la dosis máxima tolerada y su efectividad. Se utilizó el mismo modelo de transección de la médula espinal y los métodos de evaluación histológica descritos en los ejemplos 1, 3 y 4. Ambos fármacos se administraron por inyección subcutánea, cada 12 horas,

comenzando a las 12 horas post-lesión. Para este ensayo se utilizó un total de 15 ratas distribuidas en 5 grupos con las siguientes pautas farmacológicas:

- a) 4 dosis de SB743921, 0.8 mg/kg, más 5 dosis de imatinib, 25 mg/kg.
- b) 4 dosis de SB743921, 0.5 mg/kg, más 5 dosis de imatinib, 25 mg/kg.
- 5 c) 4 dosis de SB743921, 0.8 mg/kg, más 5 dosis de imatinib, 12.5 mg/kg.
- d) 4 dosis de SB743921, 0.8 mg/kg, más 5 dosis de imatinib, 6.25 mg/kg.
- e) 4 dosis de SB743921, 0.65 mg/kg, más 4 dosis de imatinib, 5 mg/kg.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3.

10

Tabla 3. Efecto de la administración combinada subcutánea de SB743921 e imatinib en ratas con transección de la médula espinal

Pauta del fármaco	Efectos adversos	Reducción de la fibrosis	Daño del tejido neural
a	Muerte 6 a 9 días post-lesión. Enterocolitis, peritonitis.	Eliminación casi completa.	Mínimo.
b	Muerte 4 a 8 días post-lesión. Enterocolitis, peritonitis.	Reducción parcial.	Mínimo.
c	Muerte 5 a 8 días post-lesión. Enterocolitis, peritonitis.	Reducción parcial.	Mínimo.
d	Muerte 5 a 8 días post-lesión. Enterocolitis, peritonitis.	Inconsistente.	No detectado.
e	50% de mortalidad a 9 días post-lesión. Peritonitis, mucositis.	Inconsistente.	No detectado.

Como se indica en la tabla 3, la pauta "a" fue muy efectiva, reduciendo de forma marcada e incluso eliminando por completo el tejido conectivo fibrótico, a la vez que generando abundantes ramificaciones axonales que crecían sobre los astrocitos en el borde de la lesión (Fig. 5). Los muñones de la médula no llegaron a fusionarse, quedando una cavidad de 1 a 1.5 mm de longitud, de manera que los axones no tuvieron posibilidad de cruzar de un lado al otro de la médula. No obstante, el daño tisular fue mínimo, excepto por la presencia de microhemorragias aisladas.

15

20

A pesar de producir muy buenos resultados histológicos, la pauta combinada "a" todavía fue mortal en el 100 % de los casos entre los 6 y 9 días post-lesión, y los animales igualmente presentaron enterocolitis, peritonitis y mucositis. La mayoría de

las otras pautas combinadas también causaron 100 % de mortalidad, y además fueron mucho menos efectivas. Solo la pauta "e" permitió la supervivencia de la mitad de los animales más allá del día 9 post-lesión, pero los efectos antifibróticos fueron muy inconsistentes, en algunos casos notándose una leve reducción y en otros
5 aumentándose la inflamación y la fibrosis en la médula.

En conjunto, los ejemplos 3, 4 y 5 indicaron que no es posible obtener una pauta segura y eficaz para tratar la fibrosis provocada por la lesión medular mediante la administración sistémica de SB743921 y/o imatinib. Además, con las pautas más
10 efectivas quedaron cavidades residuales en la zona de lesión, indicando que en cualquier caso será necesario proporcionar un sustrato para el crecimiento y guía celular a través de la misma.

Ejemplo 6: Implante de microfibras electroconductoras en hidrogel de fibrina, gelificación *in vitro* o *in vivo*, en el sitio de transección de la médula espinal en ratas.
15

El implante de microfibras electroconductoras embebidas en hidrogel de alginato ayudó al crecimiento axonal guiado a través de las cavidades creadas tras la transección medular en rata, pero también aumentó considerablemente el daño tisular
20 y la separación de los muñones (Alves-Sampaio A, García-Rama C, Collazos-Castro JE. Biofunctionalized PEDOT-coated microfibers for the treatment of spinal cord injury. Biomaterials 2016; 89:98-113).

En un intento por mejorar la integración de las microfibras en la zona de lesión sin
25 aumentar el daño tisular y la brecha neural, para el desarrollo de la presente invención se reemplazó el hidrogel de alginato por hidrogel de fibrina.

Las microfibras de carbono recubiertas de polímero conductor se prepararon y se biofuncionalizaron con moléculas de adhesión celular utilizando los protocolos
30 descritos pormenorizadamente en patentes y publicaciones previas (P201231969, PCT/ES2013/070879; Collazos-Castro JE, García-Rama C, Alves-Sampaio A. Glial progenitor cell migration promotes CNS axon growth on functionalized electroconducting microfibers. Acta Biomater. 2016;35:42-56).

35 En resumen, se utilizaron microfibras de carbono de 7- μ m de diámetro, sobre las que

se electrosintetizó (1 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$ por 32 minutos) poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) dopado con poli[(ácido 4-estireno sulfónico)-co-(ácido maleico)] (PSS-co-MA), resultando un recubrimiento de PEDOT:PSS-co-MA. Los grupos carboxílicos del PSS-co-MA se hicieron reaccionar con EDC/NHS, y luego con los grupos amino de la poli-L-lisina (PLL). Sobre la capa de PLL se adicionó heparina, factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), y fibronectina.

Para la preparación del hidrogel de fibrina, se mezcló en proporción 2:1 una solución que contenía fibrinógeno humano (Sigma F4883) y factor XIII (cluvot, CSL Behring 78779), con una solución que contenía trombina (Sigma-Aldrich T7009) y CaCl_2 (2.6 mM, Sigma-Aldrich) en agua con NaCl 0.9%.

Se investigaron dos métodos para preparar el hidrogel de fibrina con microfibras de hidrogel:

- 15 a) Gelificación *in vivo*. En este caso, 15 a 20 microfibras individuales se introdujeron directamente en la brecha del tejido neural, y la fibrina se gelificó *in situ* dentro de la brecha, rodeando las microfibras (Fig. 6B). En este caso, las concentraciones finales del fibrinógeno, la trombina y el factor XIII fueron aproximadamente 22.2 mg/ml, 11.1 U/ml y 11.1 U/ml, respectivamente.
- 20 b) Gelificación *in vitro*. El hidrogel con microfibras se preparó *in vitro* en tubos de 2 mm de diámetro, adicionando las microfibras por capas, y luego se introdujo en la zona de lesión (Fig. 6C). Las concentraciones finales del fibrinógeno, la trombina y el factor XIII se pudieron controlar con precisión y fueron 80 mg/ml, 33.3 U/ml y 33.3 U/ml, respectivamente.

25

En ambos casos, se realizó una durorrafia con hilo de sutura 10-0 tras introducir el hidrogel en la lesión.

En el modelo de transección medular de rata, no se detectaron diferencias notorias en los resultados histológicos de los animales con implante respecto a los animales no tratados, ni tampoco en relación con el método de preparación del implante. La menor concentración del fibrinógeno para la gelificación *in vivo* permitió la formación de un hidrogel mucho menos rígido que relleno completamente la zona de lesión. Sin embargo, en ambos casos, la fibrina se había degradado en el momento del sacrificio de los animales para el análisis histológico (7 DPL). A diferencia del implante de

hidrogel de alginato publicado previamente, no se observó daño neural adicional atribuible al hidrogel de fibrina. Como en los animales sin implante, los muñones se aproximaron parcialmente al contraerse la cicatriz de tejido fibrótico denso, usualmente con extensión de 1 a 2 mm, que se formó transversalmente en la médula (Fig. 6D). En esta situación, no pudo verificarse un efecto positivo de la presencia de las microfibras, ya que la fibrosis selló los muñones e inhibió por completo el crecimiento neural.

Ejemplo 7: Cavitación tisular y fibrosis en ratas con lesión medular y electroestimulación en el sitio de lesión, sin implante de hidrogel ni administración de fármacos.

Para conocer el efecto de la electroestimulación por sí misma sobre la reparación tisular, se aplicó el protocolo de estimulación en ausencia de otros tratamientos farmacológicos o de implantes en la zona de lesión. Se realizó la transección de la médula espinal, creando la brecha de 2 mm como se describió en los ejemplos anteriores, y se implantó un electrodo para administrar pulsos eléctricos en la zona de lesión. El electrodo consistió en un microalambre de acero inoxidable (50.8 μm de diámetro) con aislamiento de teflón (A-M Systems) que se removió en la punta, dejando 1 mm de metal expuesto. La punta de metal se introdujo en el espacio subaracnoideo y se fijó dorsalmente sobre el borde rostral de la lesión. Posteriormente se suturó la duramadre. Otro electrodo del mismo material, pero con mayor área metálica sin aislamiento eléctrico, se colocó en el tejido subcutáneo del vientre del animal y se usó como contraelectrodo. Los extremos de los cables tenían pines de oro que salían a través de la piel dorsal del animal para conexión al generador de pulsos eléctricos (potenciostato / galvanostato Biologic VSP).

La estimulación comenzó a los 4 días post-lesión y se extendió por 10 días, de manera que los animales se perfundieron a los 14 DPL para extraer la médula y realizar el análisis histológico como en los ejemplos anteriores. Se utilizó el protocolo de pulsos eléctricos que induce arborización de los axones sanos del tracto corticoespinal cuando se estimula la corteza cerebral (Brus-Ramer M, Carmel JB, Chakrabarty S, Martin JH. Electrical stimulation of spared corticospinal axons augments connections with ipsilateral spinal motor circuits after injury. J Neurosci. 2007;27:13793-801), pero estimulando hora y media diaria en vez de 6 horas para prevenir reacciones locales que pudiesen incrementar el daño tisular. En resumen, se aplicaron pulsos bifásicos de 200 μs /fase, empezando por la fase catódica, en ráfagas de 45 ms a 333 Hz,

repetidas cada 2 s, hora y media diaria por 10 días. La intensidad de la corriente se mantuvo en el umbral que indujo contracción visible de los músculos paraespinales o torácicos y que era bien tolerado sin signos de dolor por los animales, siendo generalmente 350 μ A a 650 μ A. La aplicación de estímulos de 150 μ A por encima del umbral motor usualmente produjo molestias y estrés a los animales, por lo cual siempre se mantuvo la corriente dentro de este límite, con un máximo de 750 μ A. Para pulsos bifásicos de 500 μ A, la caída óhmica entre los electrodos fue alrededor de -4/+2 V el primer día y -7/+4 V después de los 10 días. Se observó contracción muscular en el periodo completo de estimulación, confirmando la funcionalidad de los electrodos.

El protocolo de estimulación fue bien tolerado y no se detectaron eventos adversos sistémicos. El estado típico de la médula espinal tras los 10 días de electroestimulación se muestra en la Fig. 7. Como puede observarse, este tratamiento por sí solo fue insuficiente para promover la reparación medular. Una cicatriz fibrótica de aproximadamente 1 mm de espesor selló los muñones impidiendo el crecimiento de los tractos axonales ascendentes y descendentes y la migración astrogial a través de la zona de lesión. También se formaron cavidades en la médula que no se observaron en los animales que no recibieron ningún tratamiento (compárese la Fig. 7 con la 1B).

Ejemplo 8: Implante de hidrogel formado *in vitro* de fibrina/SB743921/microfibras electroconductoras, con electrodos para estimulación del sitio de lesión, en ratas con transección de la médula espinal.

En los ejemplos 3 a 7 se concluyó que los tratamientos sistémicos con SB743921 y/o imatinib, el implante de fibrina con microfibras en la zona de lesión, o la electroestimulación, realizadas de forma aislada, no proporcionaron un tratamiento seguro y eficaz para reducir la fibrosis y la brecha del tejido neural después de la transección de la médula espinal en ratas.

Con el fin de evitar la toxicidad sistémica de los compuestos antifibróticos, se formó el hidrogel de fibrina con microfibras y SB743921 *in vitro* y se introdujo en la zona de lesión (Fig. 8A). El hidrogel se preparó siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 6, utilizando 8 μ l de solución con SB743921 en concentración final de 0.6 mM. Se implantó un microalambre para estimulación eléctrica tal como se describió en el ejemplo 7. El microalambre se posicionó dorsal, sobre el borde rostral de la lesión y el inicio del hidrogel, asegurando así la distribución de la corriente a través del hidrogel y

las microfibras. La duramadre y los músculos se suturaron y los terminales de los cables con pines de oro se extrajeron por la piel dorsal del animal (Fig. 8A). Los electrodos se conectaron diariamente al potencióstato/ galvanostato para la aplicación de los pulsos eléctricos (Fig. 8B).

5

Ejemplo 9: Reducción de la cavitación, promoción del crecimiento neural y cierre de la brecha tisular en ratas con transección medular e implante formado *in vitro* de fibrina/SB743921/microfibras y electroestimulación.

20 ratas recibieron transección e implante del hidrogel de fibrina con microfibras electroconductoras, SB743921, y electrodos como en el ejemplo 8, y en la mitad de ellas se aplicó estimulación eléctrica para conocer el valor específico de la electroterapia en el contexto de inhibición de la fibrosis. Los animales se sacrificaron a los 14 días post-lesión para extraer la médula y realizar los análisis histológicos siguiendo los procedimientos descritos anteriormente.

15

A diferencia del implante de fibrina sola (ejemplo 6), el implante con SB743921 permitió un buen control local de la fibrosis con excelente supervivencia de los animales, pero en ausencia de estimulación eléctrica no se obtuvo ninguna respuesta reparativa. La fibrina se degradó y el fármaco liberado inhibió la fibrosis, pero al no haber estímulo para el crecimiento neural, produjo una cavidad vacía con extensión muy parecida a la original (aprox. 2 mm, Fig. 9, izquierda). Sin embargo, tras los 10 días de electroestimulación la cavidad desapareció y la brecha neural se redujo considerablemente (Fig. 9, derecha), observándose el crecimiento de múltiples tipos celulares, incluidas las células neurales. Numerosos axones positivos para neurofilamento se originaron en ambos muñones de la médula e ingresaron al centro de la lesión. Los astrocitos de ambos muñones también se alinearon y migraron en la brecha tisular, quedando solo aproximadamente a 600 μm de separación (Fig. 9, derecha). No obstante, todavía se encontraron células de tejido conectivo PDGFR+ en la zona de lesión, aunque en menor número que en ausencia de tratamiento, orientadas más longitudinalmente en la médula, y acompañadas de vasos sanguíneos. Aparentemente, este tejido fibrótico secundario aún era parcialmente inhibitorio para la regeneración axonal, impidiendo que los axones serotoninérgicos alcanzaran el muñón caudal de la médula espinal, al menos en el momento en que se sacrificaron los animales (14 DPL).

35

En resumen, los resultados de este ejemplo demostraron que la utilización de un implante electroactivo liberador de fármacos (SB743921) puede reducir la fibrosis a la vez que promover el cierre de la brecha tisular y el crecimiento neural, sin producir toxicidad sistémica u otros efectos adversos relevantes, después de la transección de la médula espinal en ratas adultas.

Ejemplo 10: Sinergia terapéutica entre el implante electroactivo liberador de fármacos y la administración sistémica de imatinib en ratas con transección de la médula espinal.

A continuación, se procedió a evaluar la seguridad y utilidad de administrar el implante electroactivo liberador de fármacos (fibrina/SB743921/microfibras + electroestimulación en la zona de lesión), juntamente con imatinib por vía sistémica. Se utilizó la misma metodología descrita en el ejemplo 9, sacrificando los animales a los 14 DPL para el estudio histológico.

El imatinib se disolvió en agua a 100 mg/ml y luego en solución salina 0.9 % y se inyectó subcutáneamente. Después de haber realizado los ensayos 4 y 5 para conocer la toxicidad de los fármacos, para este ensayo solo se utilizaron 10 ratas distribuidas en 2 grupos con las siguientes pautas de imatinib:

- a) 4 dosis de 5 mg/kg, cada 12 horas, comenzando 12 horas post-lesión.
- b) La pauta "a" y adicionalmente 5 mg/kg cada día hasta la finalización del protocolo de electroestimulación.

La pauta "a" fue completamente segura para los animales al utilizarse con el implante, sin ninguna muerte asociada ni aparición de efectos adversos. Además, histológicamente pudo constatarse una menor presencia de células inflamatorias en los segmentos medulares perilesionales, aunque no se detectaron efectos significativos en cuanto al cierre de la brecha neural o al crecimiento axonal y la migración glial.

Por otra parte, la pauta "b" prácticamente eliminó el tejido fibrótico residual PDGFR+ de la zona de lesión, llevando de nuevo a la separación de los muñones de la médula en dos tercios de los casos. Sin embargo, en el tercio de animales restante se pudo verificar un cierre adicional de la brecha tisular con migración astrocitaria y crecimiento axonal. A los 14 DPL, la distancia entre el frente de astrocitos de los muñones se redujo a aproximadamente 400 µm (Fig. 10), e incluso en algunos puntos la brecha se eliminó por

completo y tanto los astrocitos migratorios como los axones en crecimiento cruzaron por completo la lesión y alcanzaron el muñón caudal. Además, el tratamiento con imatinib y el implante electroactivo liberador de SB743921 tuvieron una clara sinergia sobre el crecimiento axonal, aumentando de forma muy notoria la extensión y la ramificación axonal (Fig. 10).

Ejemplo 11: Metodología del implante de hidrogeles de fibrina formados *in vitro* con microfibras electroconductoras tras una contusión de la médula espinal en cerdos.

La evaluación de las estrategias para la reparación neural en grandes animales es fundamental para definir su utilidad terapéutica en humanos. La factibilidad de la aplicación clínica de la presente invención se validó en dos modelos porcinos de lesión medular, como fueron la lesión por contusión/compresión en la región torácica, y la hemisección cervical. Estos dos tipos de lesiones representan la patología y la localización de la mayoría de las lesiones traumáticas que se presentan en los humanos. La contusión reproduce los patrones de pérdida neuronal y cavitación tisular encontradas en más del 60 % de pacientes con lesión medular (Collazos-Castro JE, Soto VM, Gutiérrez-Dávila M, Nieto-Sampedro M. Motoneuron loss associated with chronic locomotion impairments after spinal cord contusion in the rat. J. Neurotrauma 2005; 22:544-558). La hemisección medular cervical, aunque menos frecuente en la práctica clínica, modela el daño por laceración del tejido neural y además la localización más frecuente de las lesiones medulares. Cuando la hemisección se combina con extracción de tejido neural, se reproduce también el proceso patológico de cavitación tisular (Cerro PD, Barriga-Martín A, Vara H, Romero-Muñoz LM, Rodríguez-De-Lope Á, Collazos-Castro JE. Neuropathological and motor impairments after incomplete cervical spinal cord injury in pigs. J Neurotrauma. 2021; 38:2956-2977).

En este ejemplo se describe la metodología para producir lesiones por contusión/compresión medular en cerdos, y para implantar en ellas hidrogeles de fibrina preparados *in vitro* con microfibras electroconductoras. En los experimentos presentados no se utilizaron compuestos antifibróticos ni electroestimulación.

Para este ensayo se utilizaron 14 cerdos de la raza gran cerdo blanco inglés (*Sus scrofa domesticus*), hembras de 2 meses de edad y 12 a 15 kilogramos. Los sujetos experimentales se distribuyeron en tres grupos experimentales:

- 1) contusión medular sin tratamiento (n = 5).
- 2) contusión más mielotomía a las 24 horas post-lesión (n = 4).
- 3) contusión más mielotomía a las 24 horas post-lesión e implante de hidrogel de fibrina con microfibras electroconductoras biofuncionalizadas (n = 5).

5

Los animales se compraron a la empresa Granja Agropardal, especializada en la crianza de cerdos para investigación. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación, el Órgano Habilitado de Toledo, y la Consejería de Agricultura y Medio Ambiente de la JCCM.

10

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo anestesia inhalatoria inducida con una inyección intramuscular (IM) de ketamina (10 mg/kg), midazolam (0.1 mg/kg) y medetomidina (0.02 mg/kg); seguido por la administración intravenosa (IV) de propofol (3 mg/kg). Después, se colocó a los animales un tubo endotraqueal y se mantuvo la anestesia con sevoflurano (1.7 % - 2 %) junto con remifentanilo (26 mg/kg/h IV) y rocuronio (1.2 mg/kg/h IV). La ventilación mecánica (Fabius Tiro, Drager) fue configurada a 12-14 respiraciones/minuto con un volumen tidal de 10-15 ml/kg. Además, se monitorizaron el ritmo cardíaco, la presión sanguínea, el dióxido de carbono exhalado, la saturación de oxígeno en sangre y los niveles de sevoflurano inspirados y exhalados durante todo el procedimiento para un mayor control del estado del animal (Drager infinity Delta). Con el animal anestesiado se procedió a rasurar la zona quirúrgica y aplicar clorhexidina 2 % como desinfectante. Todo el material requerido fue esterilizado y las intervenciones se realizaron en condiciones asépticas.

15

20

25

La lesión medular se realizó en la unión toracolumbar para que los animales preservaran un mejor control del tronco y se desplazaran con mayor facilidad. Después de una incisión en la línea media dorsal, se separaron los músculos hasta llegar a las apófisis espinosas de las vértebras torácicas T14-T15, que recibieron una laminectomía dorsal completa dejando la duramadre intacta. Se utilizó un sistema automatizado para la contusión, compuesto por un marco de fijación vertebral y un dispositivo de impacto motorizado de bucle cerrado con salida analógica para la posición y fuerza ejercida en el elemento que golpea la duramadre, que permitió controlar la velocidad, fuerza y duración del impacto. La superficie de contacto con la médula fue plana y circular, con diámetro de 8 milímetros. La fuerza pico del impacto se fijó en 25 N seguidos por 5 minutos de compresión a 10 N, con el fin de producir una lesión medular severa con paraplejia

30

35

permanente. Tras la contusión, los músculos se suturaron por capas y con proximidad para evitar la formación de seromas, y por último se cerró la piel. Se colocó una sonda vesical para evacuar y cuantificar la orina producida hasta que se recuperara la micción espontánea.

5

24 horas después de la contusión, los animales se anestesiaron de nuevo y se realizó una mielotomía en el sitio de la lesión, que se identificó fácilmente por su apariencia hemorrágica. Tras la apertura de las meninges se retiró el tejido desvitalizado y los coágulos de la zona (Fig. 11A), dejando una cavidad en la cual se acomodó el implante.

10

La pia se dejó abierta para evitar la compresión del tejido perilesional, suturándose solamente la duramadre (Fig. 11A). Finalmente, se cerraron los planos musculares y la piel.

15

En cumplimiento de las pautas del comité ético de experimentación animal, todos los animales recibieron tratamiento para reducir el dolor y la inflamación postoperatorios de los tejidos blandos y osteoarticulares con meperidina (4 mg/kg SC) cada 12 horas durante dos días, y meloxicam (0.2 mg/kg SC) durante 7 días. Además, se les administró marbofloxacino (2 mg/kg IM) como antibiótico, también por 7 días. Los primeros días tras la lesión, se acostaron sobre un colchón suave y se les ayudó a alimentarse y beber.

20

Las microfibras electroconductoras biofuncionalizadas y los hidrogeles de fibrina con microfibras se prepararon *in vitro* siguiendo los procedimientos descritos en el ejemplo 6. Puesto que la contusión medular produjo lesiones con forma irregular, similares a las que se encuentran en los humanos, se encontró conveniente la fabricación de cilindros de fibrina de alrededor de 1 mm de diámetro que contenían haces de microfibras de longitud
25
variada para acomodarse en diferentes partes del defecto tisular (Fig. 11A). La incorporación de las microfibras durante la formación del hidrogel *in vitro* hizo muy fácil su implante. El hidrogel, además de facilitar el implante de múltiples microfibras alineadas, relleno el defecto tisular y previno parcialmente la acumulación de líquido sanguinolento,
30
así como el sellado de la lesión por las meninges.

35

La intervención quirúrgica para realizar el implante a las 24 horas post-lesión fue exitosa en la totalidad de los casos y no se registraron muertes ni complicaciones postoperatorias asociadas al procedimiento.

Ejemplo 12: Mejoría del crecimiento neural en cerdos con contusión medular que recibieron el implante de fibrina con microfibras electroconductoras preparado *in vitro*.

En este ejemplo se reseñan las consecuencias histológicas de la metodología de implante descrita en el ejemplo 11. Un mes después de la lesión, los animales recibieron anestesia inhalatoria para exponer quirúrgicamente el segmento medular lesionado y los segmentos adyacentes rostral y caudalmente. Posteriormente, se les aplicó una dosis letal de pentobarbital (120 mg/kg IV) y se les extrajeron los segmentos medulares T13 a L3. El tejido se fijó por inmersión en paraformaldehído al 4% en PBS 0.1 M durante 3 días. Los segmentos medulares se disecaron y se sumergieron por separado en PBS con sacarosa al 30 % por 4 días y posteriormente se embebieron en OCT® y se guardaron a -20 °C hasta el momento de su procesamiento. El tejido se cortó en un criostato en secciones horizontales de 10 µm para las tinciones inmunohistoquímicas, y de 50 µm para las tinciones de eriocromo cianina y violeta de cresilo. Se realizaron estudios histológicos con el fin de evaluar el daño neural, la cavitación tisular, el crecimiento axonal y glial, y la invasión de la lesión por células de tejido conectivo fibrótico. Para la inmunohistoquímica, se utilizaron los mismos procedimientos y anticuerpos descritos en los ejemplos 1 y 3.

La lesión se extendió por aproximadamente 1 cm en la zona de máximo daño longitudinal, y abarcó la mayoría de la médula en el plano dorsoventral, aunque frecuentemente dejó sana una porción de la sustancia blanca en la región ventrolateral de un lado de la médula. Como se indicó en el ejemplo anterior, el sitio de la contusión tenía hemorragia y abundantes restos celulares 24 horas tras la lesión. En los animales control con lesión sin otras intervenciones, el tejido necrótico se había reabsorbido parcialmente al mes post-lesión y la zona mostraba una mezcla de cavidades y fibrosis (Fig. 11B). En las zonas donde la lesión abarcó la totalidad de la sustancia blanca, una masa cicatricial fibrótica originada en las meninges o los ligamentos espinales invadía la cavidad y formaba una barrera transversal impenetrable para los axones y astrocitos de la médula espinal. En esta zona, también se observaron células inflamatorias entrando a la lesión a partir de las meninges. En la parte más interior de la lesión la fibrosis era más laxa y estaba formada por células intensamente positivas para PDGFR con orientación variable, que formaban trabéculas dentro de la zona cavitada. En esta región interior, los animales sin tratamiento mostraban numerosos restos de axones fragmentados que todavía no habían sido eliminados (Fig. 12A).

La mielotomía eliminó la gran mayoría del tejido desvitalizado y prácticamente no se observaron restos de axones fragmentados en la zona al mes post-lesión. Tomando en conjunto el grupo de animales, la mielotomía no aumentó el daño neural, medido como el volumen de la lesión (Fig. 12B), indicando que el procedimiento fue seguro desde el punto de vista biomédico. Sin embargo, por sí misma no produjo cambios significativos en el volumen de la lesión ni en las respuestas de crecimiento neural (Fig. 12).

El implante del hidrogel de fibrina/microfibras tuvo efectos histológicos positivos y también negativos. Por una parte, incrementó el número y el alineamiento longitudinal de diversos tipos de células, así como el crecimiento axonal, en la zona de lesión. A diferencia de la contusión sin tratamiento, o con solo mielotomía, en los animales que recibieron el implante se encontraron numerosos axones, originados en la médula espinal, creciendo de forma alineada en la región más interna de la lesión y penetrando el tejido fibrótico laxo (Fig. 12A). Además de axones, se detectó una mayor migración de astroglia (células positivas para GFAP) a la zona dañada (Fig. 12C). No obstante, estas respuestas de crecimiento neural fueron limitadas por los efectos negativos del implante, que también incrementó el volumen de la lesión (Fig. 12B) y la fibrosis. Al no contener compuestos antifibróticos, el implante generalmente aumentó el ingreso de células del tejido conectivo y células inflamatorias a partir de las meninges, en la parte periférica de la lesión, y la masa de tejido fibrótico denso invadió una mayor parte de la zona interior de la lesión (Fig. 12A). Al igual que para los axones, las microfibras biofuncionalizadas también proporcionaron sustrato y guía para células inflamatorias y cicatriciales, que finalmente impidieron la regeneración efectiva de axones serotoninérgicos y de otros tractos axonales supraespinales a través de la lesión.

En conclusión, la metodología presentada en este ensayo demostró la viabilidad de la mielotomía como estrategia para introducir el implante de fibrina con microfibras tras una contusión medular, y permitió obtener algunas respuestas beneficiosas para la reparación tisular en un modelo porcino de gran valor traslacional. No obstante, también reforzó la necesidad de optimizar la metodología del implante y su composición para que la intervención no incremente el daño tisular y la fibrosis, y que el efecto final sea la regeneración de los sistemas axonales supraespinales y la reconexión funcional.

Ejemplo 13: Gelificación *in vivo* de fibrina/SB743921 en la zona de contusión de la médula espinal en cerdos.

Después de los estudios realizados en los ejemplos 11 y 12, se investigó si la incorporación de compuestos antifibróticos (SB743921) en el hidrogel de fibrina mejoraba las respuestas reparativas tras la contusión medular en cerdos. Con este objetivo,
5 primero se optimizó la metodología de la contusión y del implante en el modelo porcino, como se describe a continuación y se ilustra en la Fig. 13. Las respuestas tisulares al implante de fibrina/SB743921 se presentan en el ejemplo 14.

10 En primer lugar, se hipotetizó que la masa de tejido fibrótico denso que se observó en los ejemplos 11 y 12 se debía, al menos en parte, a la fase compresiva de la lesión (10 N por 5 minutos) que desgarraba parcialmente las meninges. Por consiguiente, se eliminó dicho componente compresivo y se incrementó la fuerza pico de la contusión a 30 N para producir una lesión medular severa equivalente a la de los ejemplos anteriores.

15 En segundo lugar, se consideraron varios factores que podrían haber incrementado el daño neural tras el implante del hidrogel en los ejemplos 11 y 12, tales como la debridación excesiva del tejido dañado y los coágulos utilizando instrumentos quirúrgicos metálicos, y la posible compresión del tejido perilesional debido tanto a la dureza del
20 hidrogel como al implante de un número de cilindros de hidrogel mayor al debido. Tras la durorrafia, el tejido neural alrededor del implante podría haber sido sometido a un exceso de presión.

Por consiguiente, en este ejemplo se presenta una metodología adicional para la
25 realización del implante tal como se ilustra en la Fig. 13. Se modificó el procedimiento descrito utilizando una técnica mucho menos agresiva para la retirada del tejido desvitalizado, y además se hidrogelificó el hidrogel de fibrina *in vivo* dentro de la zona de lesión, usando una concentración menor de fibrinógeno para producir un hidrogel menos rígido que el preparado *in vitro*. Las concentraciones de los compuestos se han descrito
30 en el ejemplo 6). Además, se incorporó SB743921 en forma de solución para lavado e impregnación de la zona perilesional y también dentro de la fibrina para liberación prolongada local.

Para este ensayo se utilizaron 9 cerdos que se distribuyeron en tres grupos
35 experimentales:

- 1) contusión medular sin tratamiento (n = 3).
- 2) contusión más mielotomía a las 24 horas post-lesión (n = 3).
- 3) contusión más mielotomía a las 24 horas post-lesión y gelificación de fibrina/SB743921 en el defecto tisular (n = 3).

5

A las 24 horas post-lesión, los animales recibieron anestesia inhalatoria como se describió en el ejemplo 11, y se accedió a la zona lesionada. Tras la incisión de la duramadre y la pia, parte del tejido desvitalizado se evacuó de forma espontánea al encontrarse a presión por el edema en la zona de contusión (Fig. 13C). A continuación,

10 se irrigó la zona lesionada muy suavemente con solución salina utilizando una cánula fina, y se repitió el proceso varias veces hasta extraer la mayoría de los restos celulares y dejar lo más limpia posible la zona de lesión (Fig. 13D). Seguidamente, se lavó el tejido con una solución de SB743921 a concentración 5 μ M en solución salina, que se dejó actuar aproximadamente 10 minutos para impregnar la zona perilesional. Seguidamente

15 se procedió a la gelificación de la fibrina/SB743921 en el defecto tisular, utilizando las soluciones y concentraciones descritas para gelificación *in vivo* en el ejemplo 6, pero utilizando fibrinógeno estéril para uso médico (RiaSTAP CSL Behring) y adicionando SB743921 hasta una concentración en el hidrogel de aproximadamente 0.6 mM. Una vez formado el hidrogel en la brecha tisular (Fig. 13E), se suturó la duramadre, los músculos

20 y la piel, y se realizaron los cuidados postquirúrgicos detallados en el ejemplo 11.

La metodología fue viable y exitosa en todos los casos, formándose el hidrogel dentro de la cavidad tisular sin complicaciones adicionales. No se evidenciaron eventos adversos postoperatorios atribuibles a la intervención.

25

Ejemplo 14: Mejoría de la reparación neural en cerdos con contusión medular y gelificación *in vivo* de fibrina/SB743921.

En este ejemplo se reseñan las consecuencias histológicas de la metodología de implante descrita en el ejemplo 13. Dos meses después de la lesión, los animales

30 recibieron anestesia inhalatoria para exponer quirúrgicamente el segmento medular lesionado y los segmentos adyacentes rostrales y caudales. Posteriormente, se les aplicó una dosis letal de pentobarbital (120 mg/kg IV) y se les extrajeron los segmentos medulares T13 a L3, que se fijaron y se procesaron para su estudio histológico siguiendo los procedimientos descritos en el ejemplo 12, con la diferencia que el corte del tejido se

35 hizo en el plano sagital para visualizar mejor la relación de la fibrosis con la apertura de

las meninges en la zona dorsal.

En los controles sin reintervención, la lesión se extendió aproximadamente 1 cm en la zona de máximo daño longitudinal y abarcó la mayoría de la médula en el plano dorsoventral, aunque frecuentemente dejó sana una porción pequeña de la sustancia blanca en la región ventrolateral de uno o ambos lados de la médula. En el momento del sacrificio a los dos meses post-lesión, la zona de la contusión se había cavitado y contenía células del tipo macrófago/microglía, así como abundantes restos axonales sin eliminar, sin signos de regeneración axonal o migración astrogial a través de la brecha tisular (Fig. 14A). Aunque se encontró algún tejido fibrótico laxo en la cavidad, la fibrosis se acumuló principalmente en las meninges, indicando que el ambiente de la lesión tampoco fue muy favorable para la migración de los fibroblastos, pericitos y células meníngeas. En los animales con mielotomía, el lavado de la zona de la contusión con solución salina sin fármacos retiró muy eficientemente los restos celulares hemorrágicos y no incrementó el daño del tejido neural. A los dos meses existía una cavidad en su mayor parte vacía, con muy pocas células inflamatorias y cicatriciales (Fig. 14B). Excepto en los bordes de la sutura de la duramadre, tampoco se aumentó la fibrosis. Se encontraron algunos tabiques en la cavidad, compuestos por células de tejido conectivo y axones que crecían asociados a ellas, usualmente orientados transversalmente en la médula y por consiguiente sin impacto en la reparación tisular. La migración astrogial y el crecimiento de los axones supraespinales serotoninérgicos o noradrenérgicos (TH) se limitó a los bordes de la lesión y a la porción rostral del tejido fibrótico laxo (Fig. 14E).

A diferencia de los cerdos que sufrieron la contusión sin tratamiento o con mielotomía solamente, aquellos tratados con gelificación de fibrina/SB743921 en la zona de lesión mostraron una respuesta clara de crecimiento axonal y migración glial a través del defecto tisular (Fig. 14C,F). En estos animales se cerró parcialmente la brecha neural y una gran cantidad de axones penetraron en la cavidad residual. Sin embargo, en ausencia de microfibras para la guía tisular, los axones crecieron de forma desorganizada y muchas veces giraban transversalmente y terminaban en la fibrosis densa de las meninges, aunque en algunas ocasiones conseguían cruzar casi completamente la lesión y alcanzar el otro borde del parénquima medular. Los astrocitos migraron aproximadamente 3 mm a partir de ambos bordes, y junto con ellos se extendieron los axones serotoninérgicos desde el borde rostral. Estos últimos no penetraron más allá del sitio de migración de los astrocitos, pero los axones noradrenérgicos, marcados para TH,

crecieron por varios milímetros dentro de la lesión (Fig. 14F). No obstante, también se encontró una cantidad variable de tejido fibrótico en la cavidad tisular residual.

En resumen, este ejemplo confirmó que la mielotomía con evacuación del tejido desvitalizado es un procedimiento seguro que no produce daño adicional, y que puede utilizarse para gelificar *in vivo* la fibrina con fármacos de forma diferida en las zonas de contusión medular, tal como se tendría que implementar en la práctica clínica. Además, se confirmó que la gelificación de fibrina con SB743921 directamente en la zona de lesión incrementa las respuestas de reparación neural, incluyendo la migración astrogial y el crecimiento axonal.

Ejemplo 15: Efecto antifibrótico y facilitador del crecimiento neural del implante fabricado *in vitro* de fibrina/SB743921 con otro material de soporte, en una hemisección medular cervical con escisión de tejido neural en cerdos.

En las zonas muy dañadas del sistema nervioso, por ejemplo, en las soluciones de continuidad grandes del tejido neural por laceración, abrasión o compresión masiva, puede ser necesario utilizar materiales adicionales de soporte para el hidrogel electroactivo liberador de fármacos con el fin de reforzar su fortaleza mecánica o proporcionar guía adicional para el crecimiento tisular, o sitios para anclar el implante a las estructuras del huésped.

En este ejemplo se demuestra que el hidrogel de fibrina/SB743921 formado *in vitro* dentro de un segundo material, en este caso un tubo de silicona, e implantado con él, resulta útil para limitar la fibrosis y el daño tisular secundario, e iniciar respuestas de crecimiento axonal tras una lesión abierta de la médula espinal porcina, similar a una laceración con pérdida de tejido neural.

Se utilizó un modelo de hemisección medular cervical porcina con retirada de 1 cm de tejido neural del segmento espinal cervical C6, descrito recientemente (Cerro PD, Barriga-Martín A, Vara H, Romero-Muñoz LM, Rodríguez-De-Lope Á, Collazos-Castro JE. Neuropathological and motor impairments after incomplete cervical spinal cord injury in pigs. J Neurotrauma. 2021; 38:2956-2977).

Para este ensayo se utilizaron 6 cerdos que se distribuyeron en dos grupos experimentales:

- 1) Lesión medular e implante del tubo de silicona con hidrogel de fibrina sin fármaco (n = 3).
- 2) Lesión medular e implante del tubo de silicona con hidrogel de fibrina formado con SB743921 (n = 3).

5

La fibrina con SB743921 se gelificó *in vitro* dentro de un tubo con morfología similar a la hemi-médula del segmento C6, cuya pared era una membrana flexible de silicona de uso médico de aproximadamente 100 µm de espesor. Para el hidrogel y el fármaco se utilizaron las concentraciones de los compuestos enunciadas en los ejemplos 6 y 11, y

10

El implante se introdujo inmediatamente después de crear la cavidad en la médula espinal, y posteriormente se suturó la duramadre para mantenerlo en su sitio. Un mes después de la lesión, los animales recibieron anestesia inhalatoria para exponer quirúrgicamente la médula cervical. Posteriormente, se les aplicó una dosis letal de pentobarbital (120 mg/kg IV) y se les extrajeron los segmentos medulares C1 a T2. El tejido se fijó y se procesó siguiendo la metodología descrita en el ejemplo 12. Se realizaron estudios histológicos con el fin de evaluar el daño neural, la cavitación tisular, el crecimiento axonal y glial, y la invasión de la lesión por células de tejido conectivo fibrótico. Para la inmunohistoquímica, se utilizaron los mismos procedimientos y anticuerpos descritos en los ejemplos 1, 3 y 12.

15

20

25

30

Como se ilustra en la Fig. 15, el implante se mantuvo en su sitio y el hidrogel dentro del tubo de silicona solo se degradó parcialmente en ambos grupos. El implante que no contenía el fármaco produjo daño tisular y una marcada fibrosis impenetrable para los axones en regeneración. Haces de tejido fibrótico denso de 1 a 2 mm de espesor, originados mayoritariamente en las meninges, se formaron transversalmente en los muñones de la médula y también se extendieron alrededor y dentro del tubo de silicona, bloqueando cualquier posibilidad de crecimiento neural. En algunos casos, la contracción de la cicatriz fibrótica aparentemente ensanchó el tubo de silicona, causando compresión del tejido neural y daño adicional.

35

La respuesta tisular fue mucho mejor en los animales que recibieron el implante liberador de SB743921. En este caso, la fibrosis se redujo de forma muy acusada, eliminándose en algunos puntos, y en otros mostrando un grosor residual de aproximadamente el 20 %

del observado en los animales con implante sin fármaco. Además, los axones fueron capaces de llegar hasta el borde del tejido y empezaron a crecer en la porción más periférica del hidrogel (Fig. 15). La cicatriz fibrótica reducida no se contrajo, de manera que tampoco se presentó compresión y daño tisular por la deformación del tubo de
5 silicona.

Ejemplo 16: Implante de fibrina con SB743921, microfibras recubiertas de polímero conductor y electrodos epidurales en una hemisección medular con escisión de tejido neural en cerdos.

10 Finalmente, se utilizaron 4 cerdos que sufrieron una hemisección medular cervical y escisión de 1 cm de tejido neural utilizando la metodología descrita en el ejemplo anterior. Estos animales sirvieron para poner a punto los procedimientos quirúrgicos que permiten realizar el implante electroactivo en situaciones de complejidad similar al caso humano con defectos tisulares grandes. En esta configuración avanzada, el hidrogel de fibrina se
15 preparó *in vitro* con SB743921, y durante la gelificación se le introdujo un ensamblaje de microfibras electroconductoras interconectadas. Adicionalmente, se suturaron a la duramadre, adyacentes al sitio de la lesión, electrodos para completar el circuito de la electroestimulación y para la medición de los parámetros eléctricos resultantes.

20 Utilizando la metodología descrita en el ejemplo 6, se depositó y se funcionalizó el polímero conductor PEDOT:PSS-co-MA sobre un ensamblaje de microfibras de carbono interconectado a través de un microalambre metálico de 12.8 μm de diámetro (AXON' Cable SAS, Francia). El microalambre se aisló con silicona una vez unidas las microfibras de carbono. Las microfibras se recortaron a una longitud final de 12 mm
25 previamente a la electrodeposición del polímero. Se evaluó la funcionalidad eléctrica del ensamblaje antes y después de la electrodeposición (Fig. 16A-D), así como después de incluirlo en el hidrogel de fibrina, confirmando el aumento de la transferencia de carga debido al recubrimiento polimérico de las microfibras.

30 Previamente a la introducción del implante en el defecto tisular, se lavó la zona con una solución de SB743921 a concentración 5 μM en solución salina, que se dejó actuar aproximadamente 10 minutos. A estos cerdos también se les administraron 4 dosis subcutáneas de imatinib (1.4 mg/Kg), cada 12 horas empezando 8-12 horas después de la lesión.

35

El hidrogel preformado de fibrina/SB743921/ensamblaje de microfibras se implantó de forma exitosa en el defecto tisular (Fig. 16E), sin perder las interconexiones eléctricas. Una vez realizado el implante y cerrada la duramadre, se suturaron electrodos de acero inoxidable (discos de 3 mm de diámetro) sobre la duramadre, aproximadamente
5 5 mm rostral y caudal a los bordes de la lesión (Fig. 16F). No se observaron efectos adversos debidos al implante. Se verificó una inhibición completa de la fibrosis alrededor del ensamblaje de microfibras interconectadas, así como el cierre parcial de la brecha tisular un mes después de la lesión.

REIVINDICACIONES

1. Un implante electroactivo liberador de fármacos que comprende:
 - 5 a) un hidrogel de polímeros naturales o sintéticos, seleccionado de la lista que comprende: polipéptidos, fibrina, fibronectina, colágeno, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, alginato, quitosano, acrilamida, metacrilato, hidrogelatina, derivados y combinaciones de estos materiales, donde dicho hidrogel está configurado para el relleno de un defecto tisular o tejido lesionado,
 - 10 b) al menos un fármaco incorporado en el hidrogel anterior en donde dicho fármaco es un inhibidor de la quinesina Eg5,
 - c) un sistema de electrodos para la aplicación de estímulos eléctricos al tejido lesionado, en donde al menos un electrodo está posicionado dentro del hidrogel o adyacente a él.
- 15 2. Implante, según la reivindicación 1, donde el inhibidor de la quinesina Eg5 es el fármaco SB743921.
3. Implante, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 2, donde el sistema de electrodos c) se encuentra en el interior del hidrogel.
- 20 4. Implante, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los electrodos interiores del hidrogel se seleccionan de entre microfibras de carbono, nanoestructuras de carbono, o microalambres de acero, oro, platino, platino/iridio, u otros metales y sus óxidos, composites y aleaciones.
- 25 5. Implante, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los electrodos están recubiertos de polímeros conductores.
6. Implante, según la reivindicación anterior, donde el polímero conductor que recubre los electrodos se selecciona de entre poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT), polipirrol o polianilina.
- 30 7. Implante, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la superficie del electrodo está funcionalizada con al menos una molécula con actividad biológica para ayudar a las respuestas de crecimiento neural sobre o alrededor del electrodo.
- 35

8. Implante, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polímero conductor está funcionalizado con al menos una molécula con actividad biológica para ayudar a las respuestas de crecimiento neural sobre o alrededor del electrodo.
- 5
9. Implante, según cualquiera de las reivindicaciones 7 o 8, donde la molécula con actividad biológica usada para la funcionalización de los electrodo o del polímero conductor se selecciona de entre moléculas de adhesión celular, moléculas de la matriz extracelular, factores de crecimiento, factores guía para los axones o dendritas tales como netrinas, efrinas, semaforinas, protocadherinas o las proteínas Slit ó Wnt, morfógenos como Sonic Hedgehog, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, gangliósidos, proteínas, péptidos o combinaciones de las mismas.
- 10
10. Un método para la preparación de un implante, según se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la preparación de un hidrogel de fibrina a partir de una mezcla de una solución que contiene fibrinógeno humano en concentraciones de entre 0,5 y 100 mg/ml y factor XIII; y una segunda solución que contiene trombina y CaCl₂, donde las concentraciones finales se ajustan con NaCl al 0,9% en agua.
- 15
- 20
11. Método, según la reivindicación anterior, donde la mezcla de las soluciones precursoras del hidrogel se realiza *in vitro*.
12. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, donde al menos una de las soluciones precursoras del hidrogel contiene al menos un fármaco con actividad antifibrótica y/o facilitadora del crecimiento neural, que se retiene tras la gelificación de la fibrina.
- 25
13. Método, según la reivindicación anterior, donde el fármaco se encapsula previamente en partículas, vesículas, liposomas o similares, de tamaño nanométrico o micrométrico, con el fin de incrementar su retención o mejorar su actividad, y luego se incorpora a las soluciones precursoras del hidrogel.
- 30
14. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde adicionalmente se incorporan microfibras, microalambres u otros elementos electroconductores alineados en el hidrogel, durante el proceso de gelificación.
- 35

15. Implante para su uso en la reparación del sistema nervioso mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:
- a) limpiar de restos celulares, sangre y adherencias fibróticas la zona de lesión neurológica;
 - b) formar el hidrogel del implante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; e
 - c) implantar el hidrogel en la zona de lesión neurológica limpia según la etapa a) durante la gelificación de la etapa b) cuando ésta se produce *in vivo*, o tras la gelificación de la etapa b) cuando ésta se produce *in vitro*.
 - d) suministrar estímulos eléctricos por los electrodos internos o externos del implante, con el fin de estimular o dirigir las respuestas reparativas tisulares o activar las células neurales e inducir la descarga de potenciales de acción.
16. Implante para su uso, según reivindicación anterior, donde la zona de lesión se lava e impregna adicionalmente a la etapa a), con una solución que contiene al menos un compuesto farmacológico antifibrótico y/o facilitador del crecimiento neural, previamente a la formación del hidrogel en la etapa b).
17. Implante para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16 donde el hidrogel se forma con el compuesto farmacológico *in vitro* y posteriormente se implanta en la zona de lesión neurológica limpia según la etapa a).
18. Implante para su uso, según la reivindicación anterior, donde el hidrogel con el compuesto farmacológico se prepara dentro de un segundo material implantable, y el implante compuesto resultante se introduce en la región dañada del sistema nervioso limpio según la etapa a).
19. Implante para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, donde el hidrogel se forma con el compuesto farmacológico *in vivo*, de manera que la gelificación transcurre directamente en la zona de lesión neurológica limpia según la etapa a).
20. Implante para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 donde el hidrogel se prepara *in vitro* con el compuesto farmacológico, y adicionalmente se le introduce el sistema de electrodos durante la gelificación, y posteriormente se implanta en la zona de lesión neurológica limpia según en la etapa a).

21. Implante para su uso, según la reivindicación 15, donde el sistema de electrodos se implanta en la zona de daño neurológico acondicionada en la etapa a), y posteriormente se forma el hidrogel con el compuesto farmacológico *in vivo* según la etapa c), rodeando los electrodos implantados.
5
22. Implante para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, donde el hidrogel con el compuesto farmacológico se forma *in vivo* dentro del defecto tisular según la etapa c), y el sistema de electrodos se posiciona adyacentemente a dicho hidrogel, dentro del sistema nervioso o sobre las membranas que envuelven al tejido nervioso.
10
23. Implante para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22, donde se aplican estímulos eléctricos bifásicos a través de los electrodos del implante.
15
24. Implante para su uso, según la reivindicación 23 donde se aplican estímulos eléctricos monofásicos a través de los electrodos del implante.
25. Implante para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 24 donde los estímulos eléctricos empiezan o consisten en una corriente eléctrica de polaridad positiva.
20
26. Implante para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 25 donde la intensidad de la corriente eléctrica aplicada, en valor absoluto, está comprendida entre 1 nanoamperio y 20 miliamperios.
25
27. Implante para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 26 donde la frecuencia de los estímulos eléctricos está comprendida entre 0,00001 Hz y 100000 Hz.
30
28. Implante para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 27, en combinación con compuestos farmacológicos administrados por vía local o sistémica que faciliten la integración del implante y la reparación neural.
- 35 29. Implante para su uso, según la reivindicación anterior, donde el compuesto farmacológico se selecciona de entre un fármaco antiinflamatorio, antifibrótico, antibiótico, neuroprotector, y un facilitador del crecimiento neural.

30. Implante para su uso, según la reivindicación anterior, donde el compuesto farmacológico es un inhibidor de receptores tirosina quinasa que se selecciona de entre el imatinib, sunitinib, sorafenib, masitinib, dasatinib, nilotinib, gefitinib, erlotinib, lapatinib, y tofacitinib.
- 5

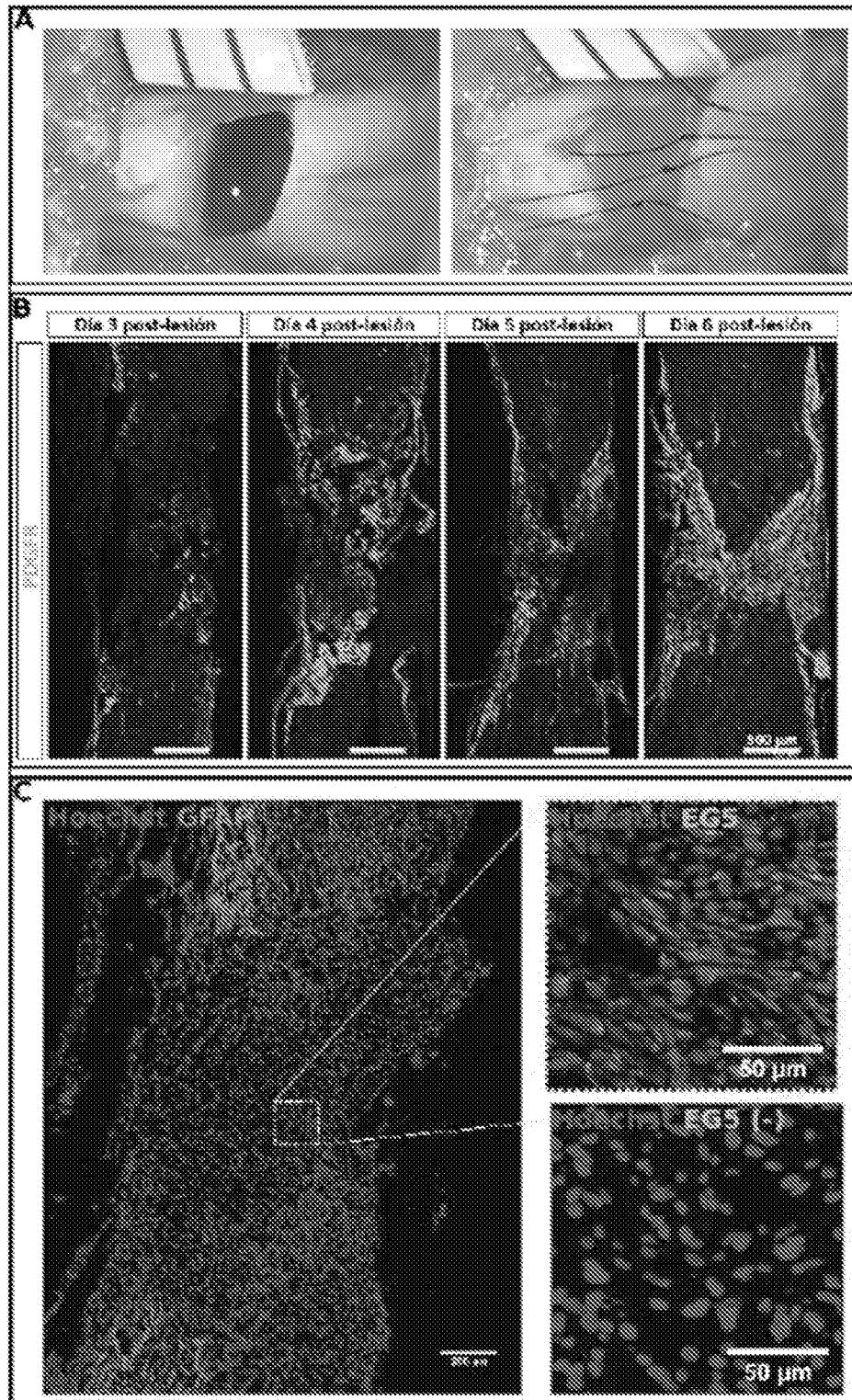


Fig. 1

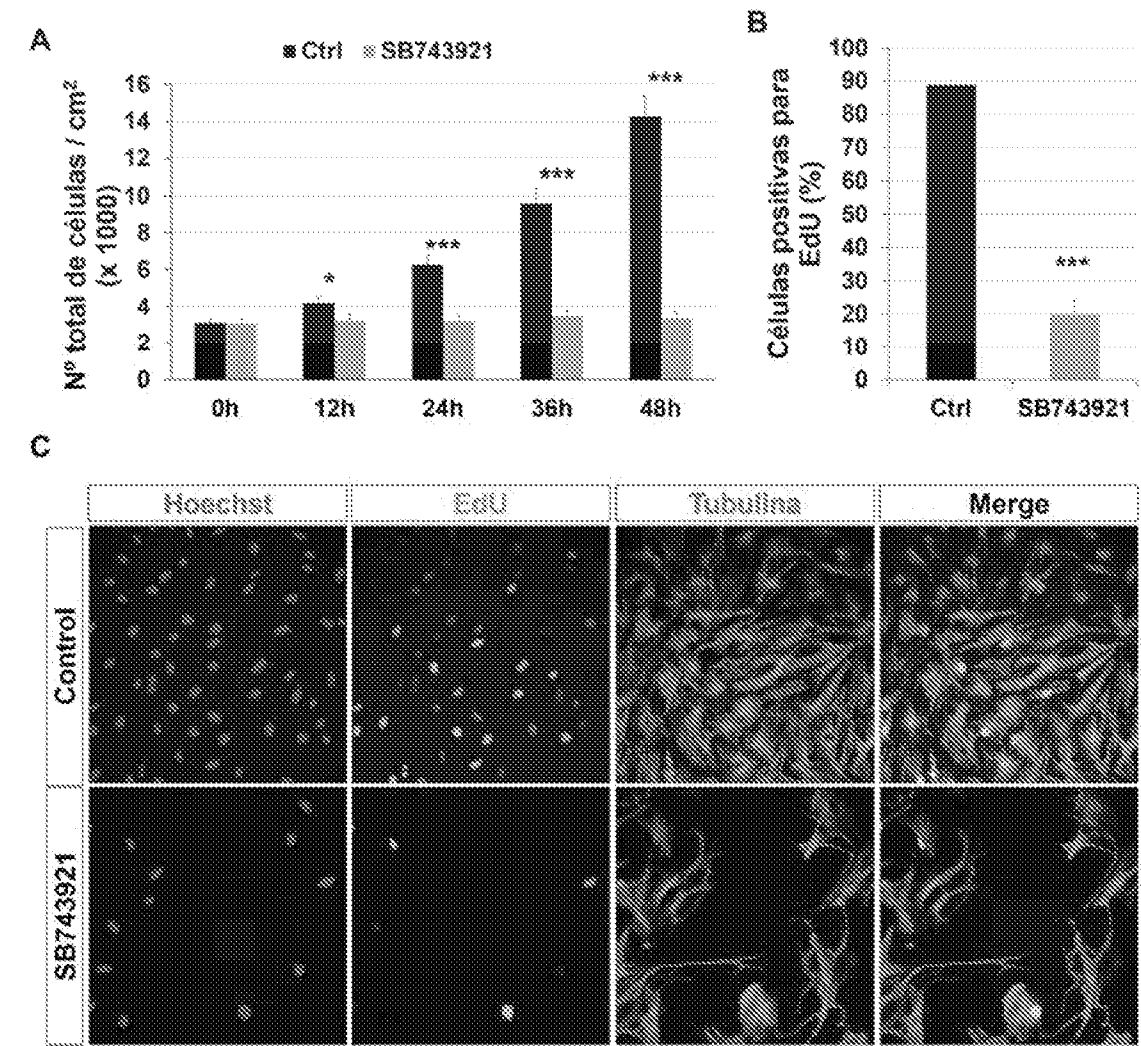


Fig. 2

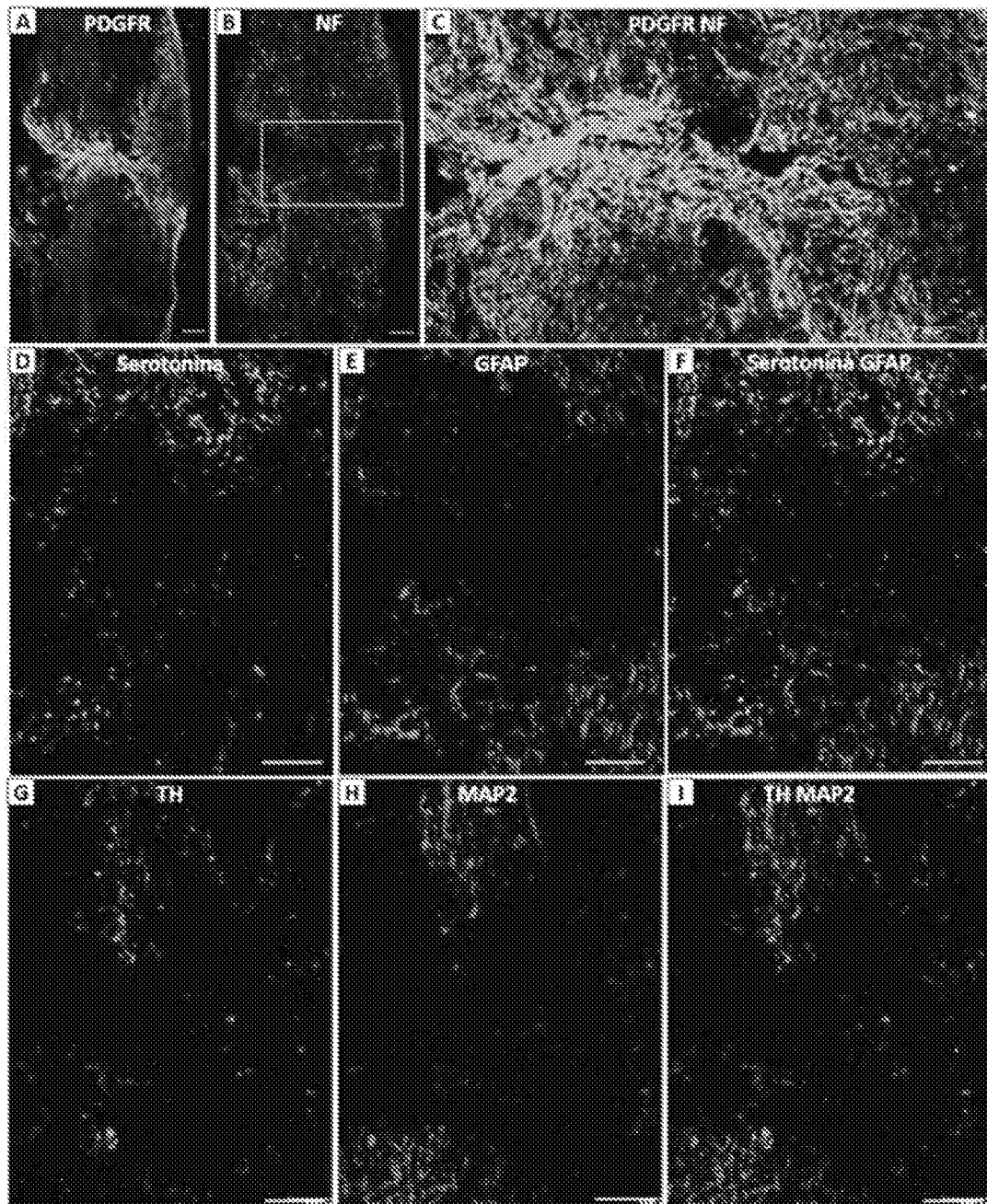


Fig. 3

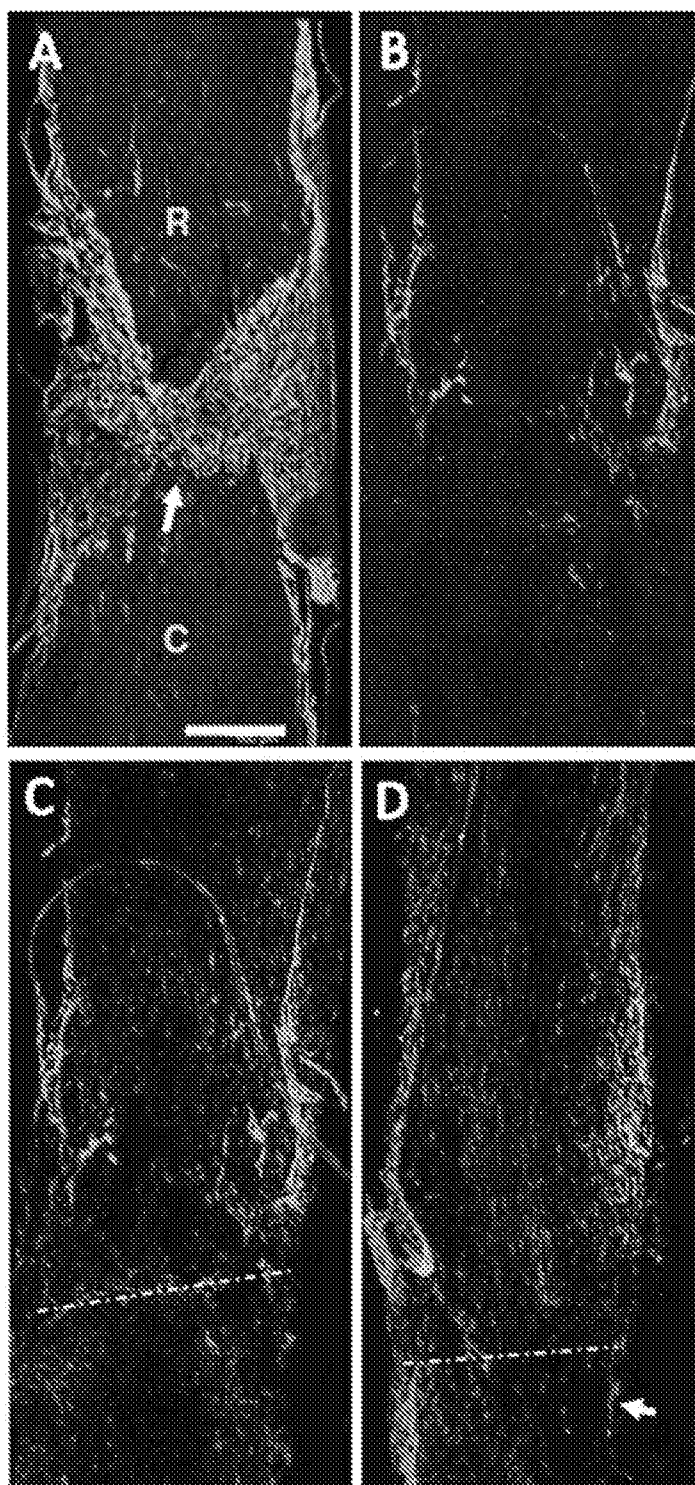


Fig. 4

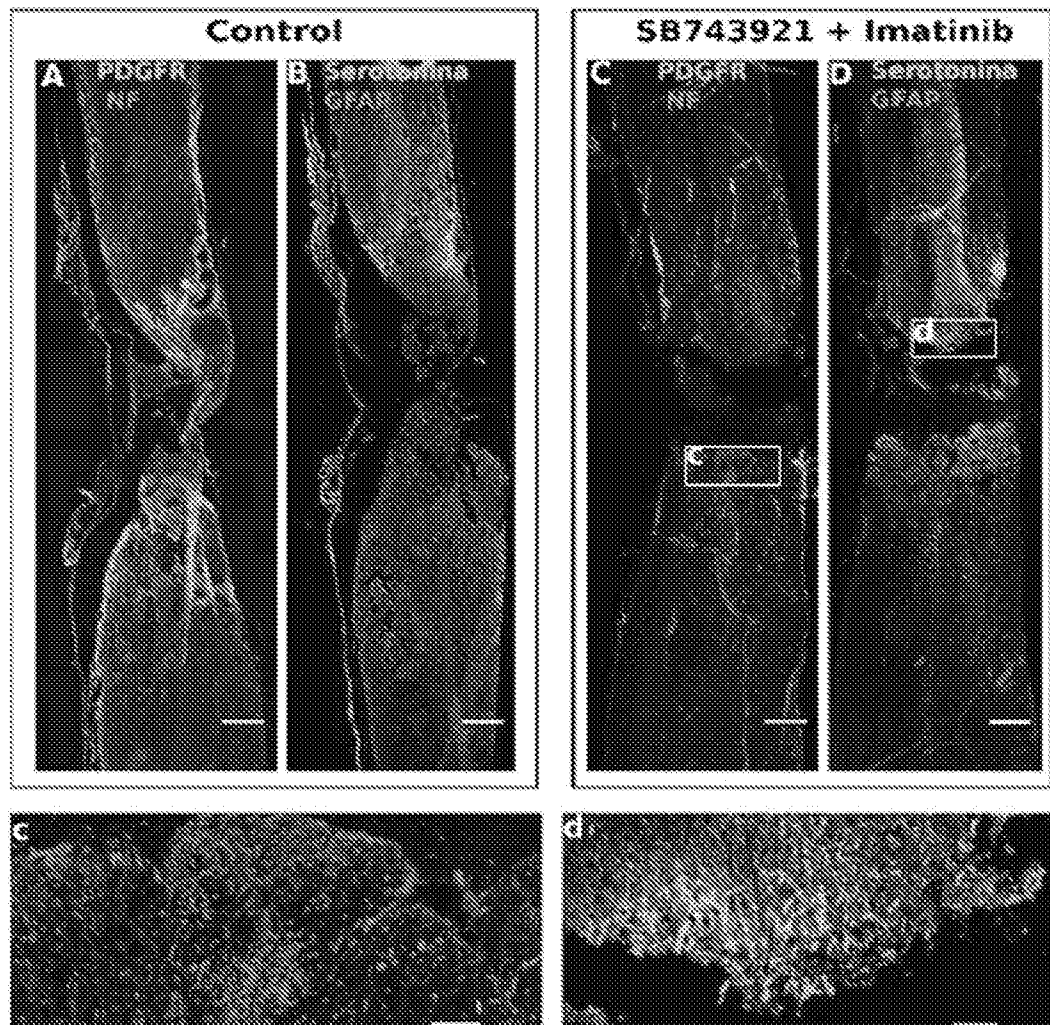


Fig. 5

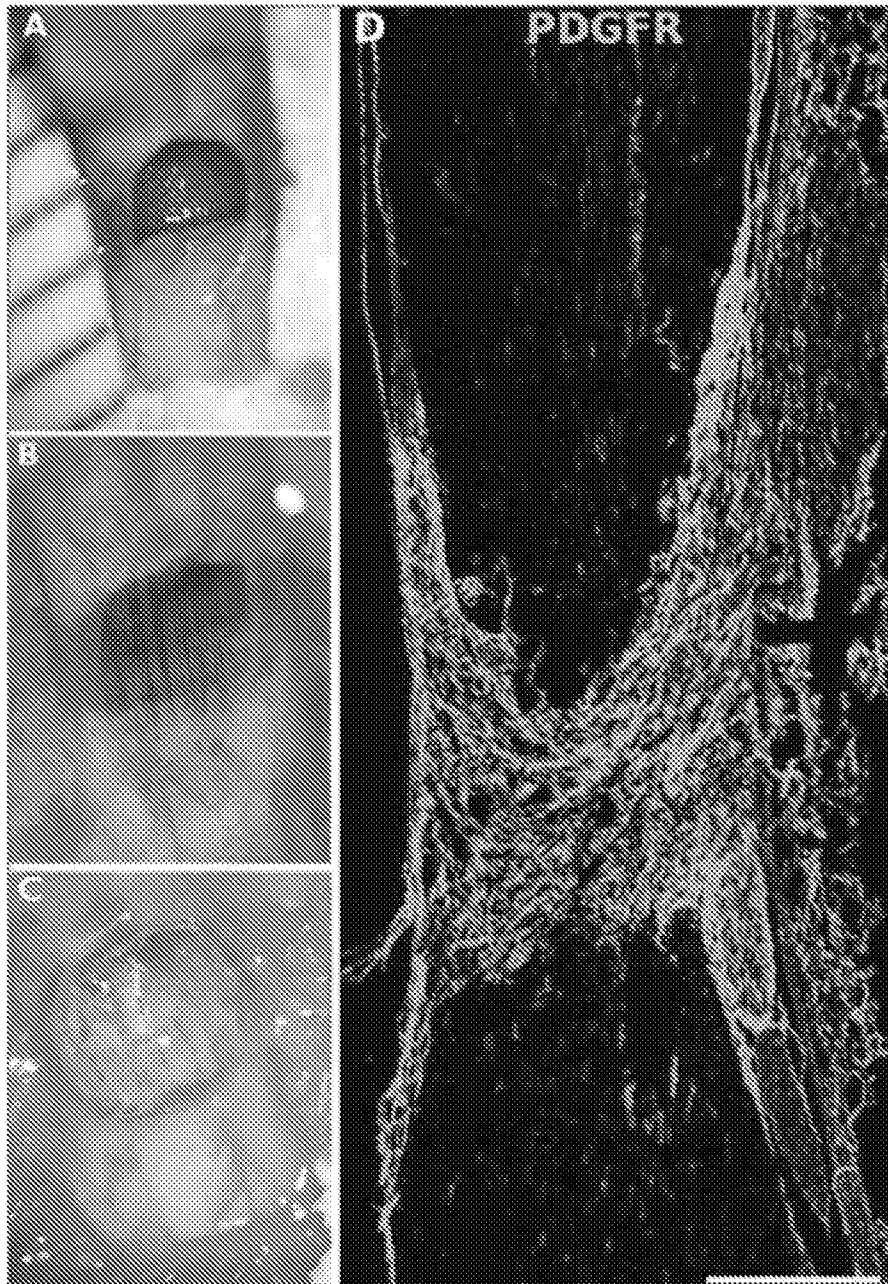


Fig. 6

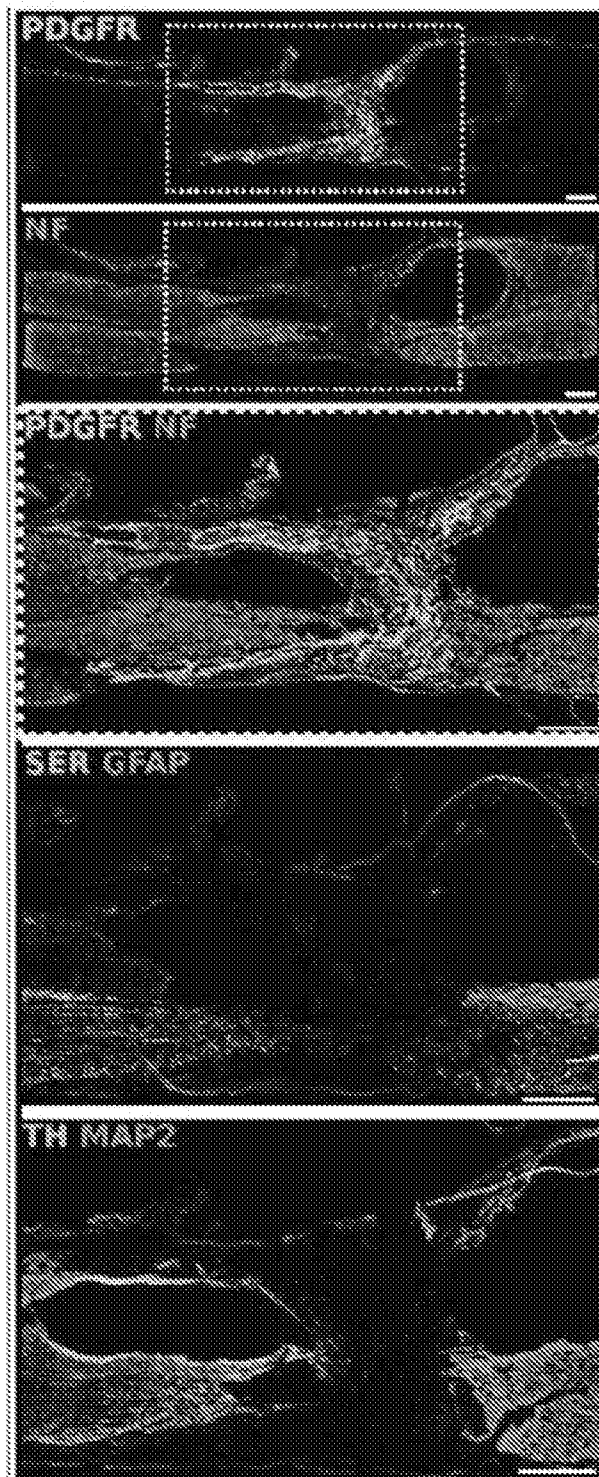


Fig. 7

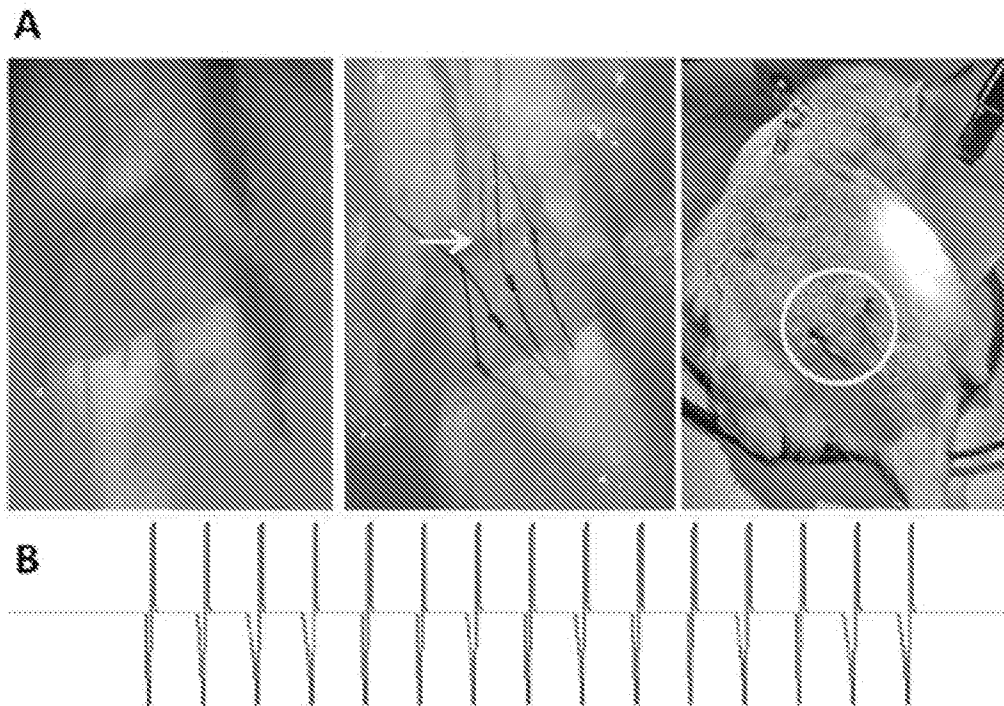


Fig. 8

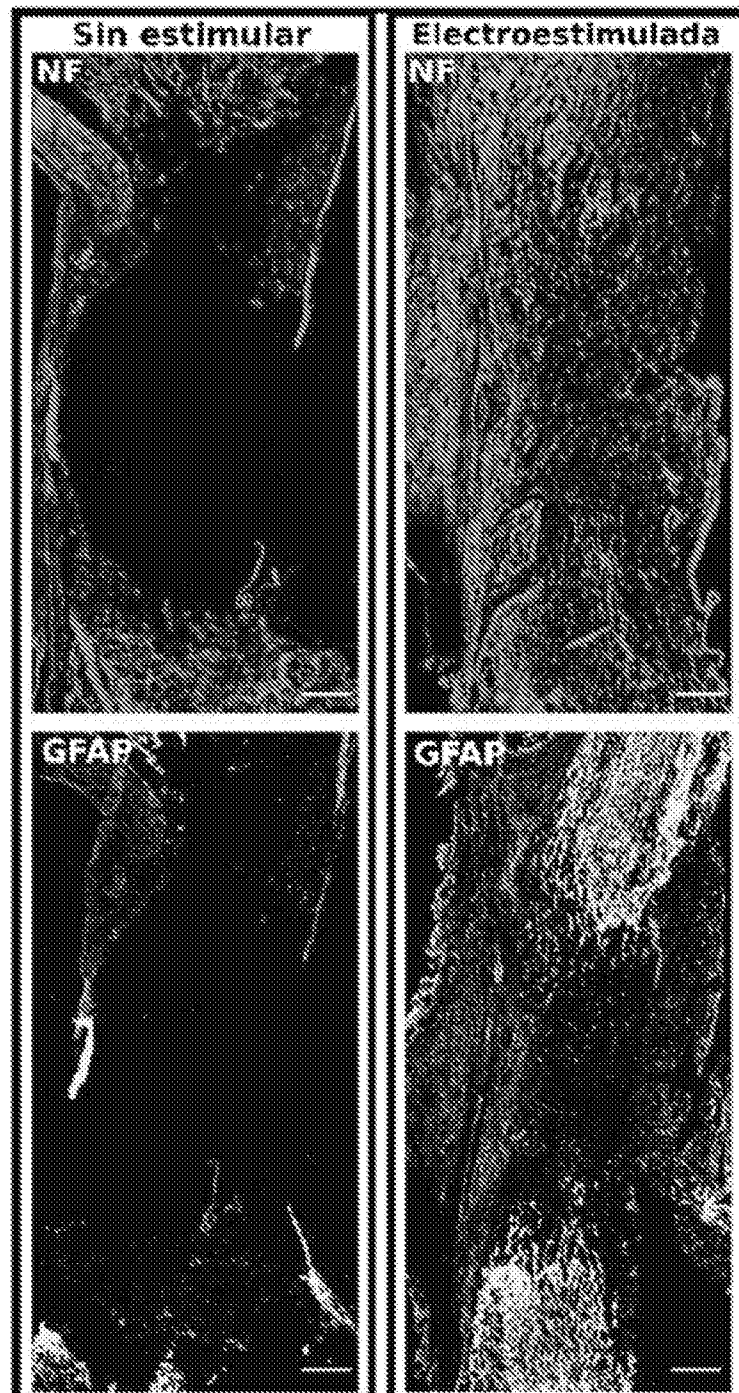


Fig. 9

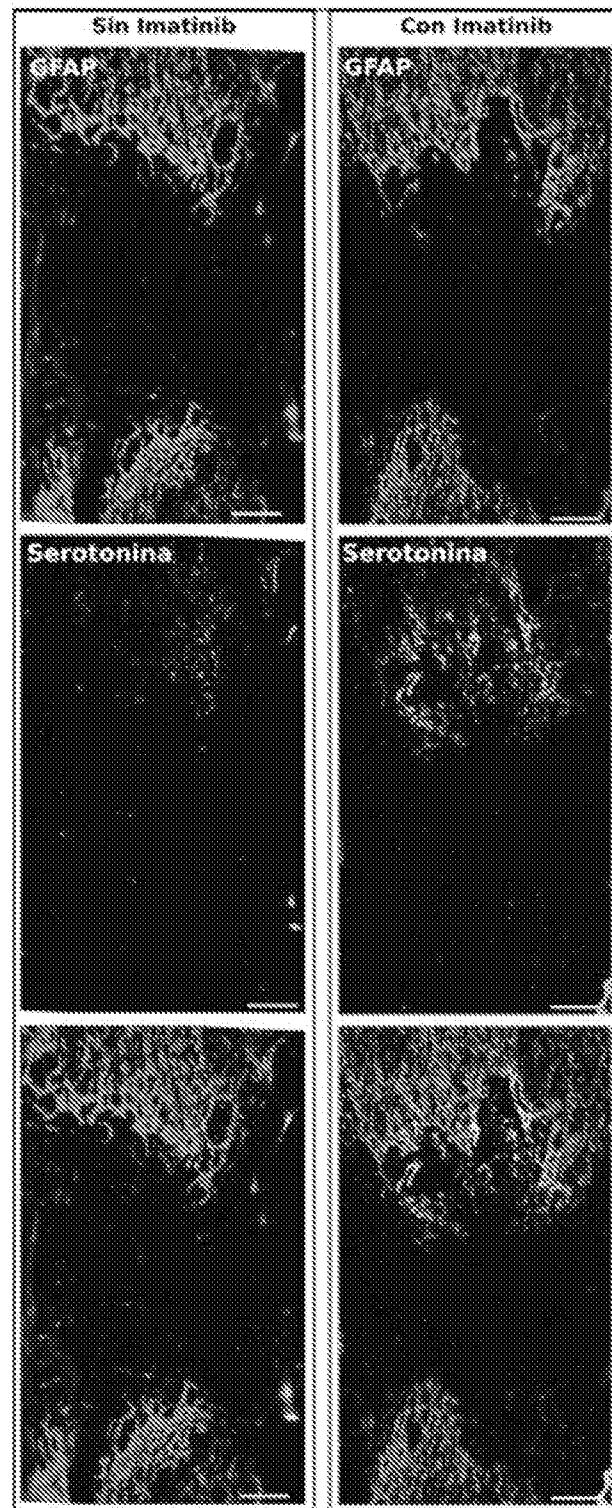


Fig. 10

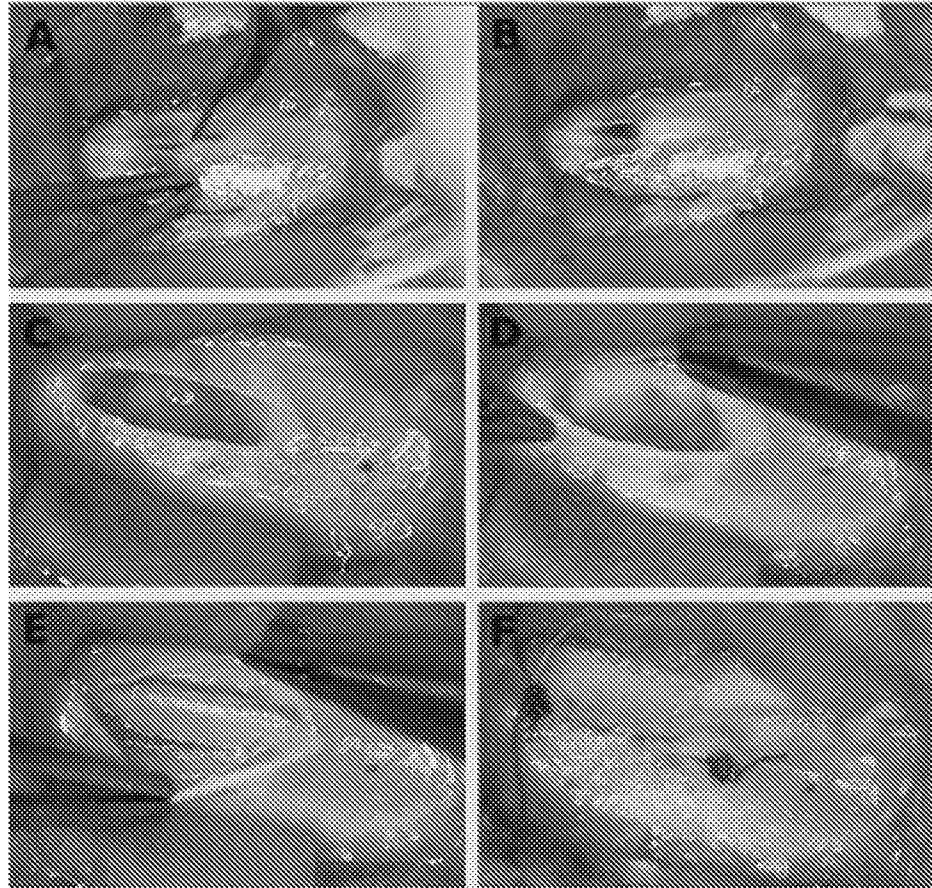
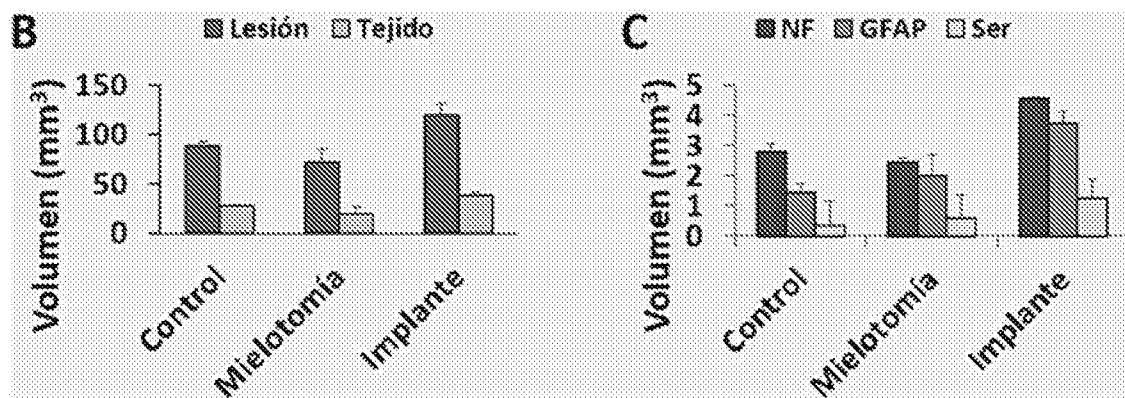
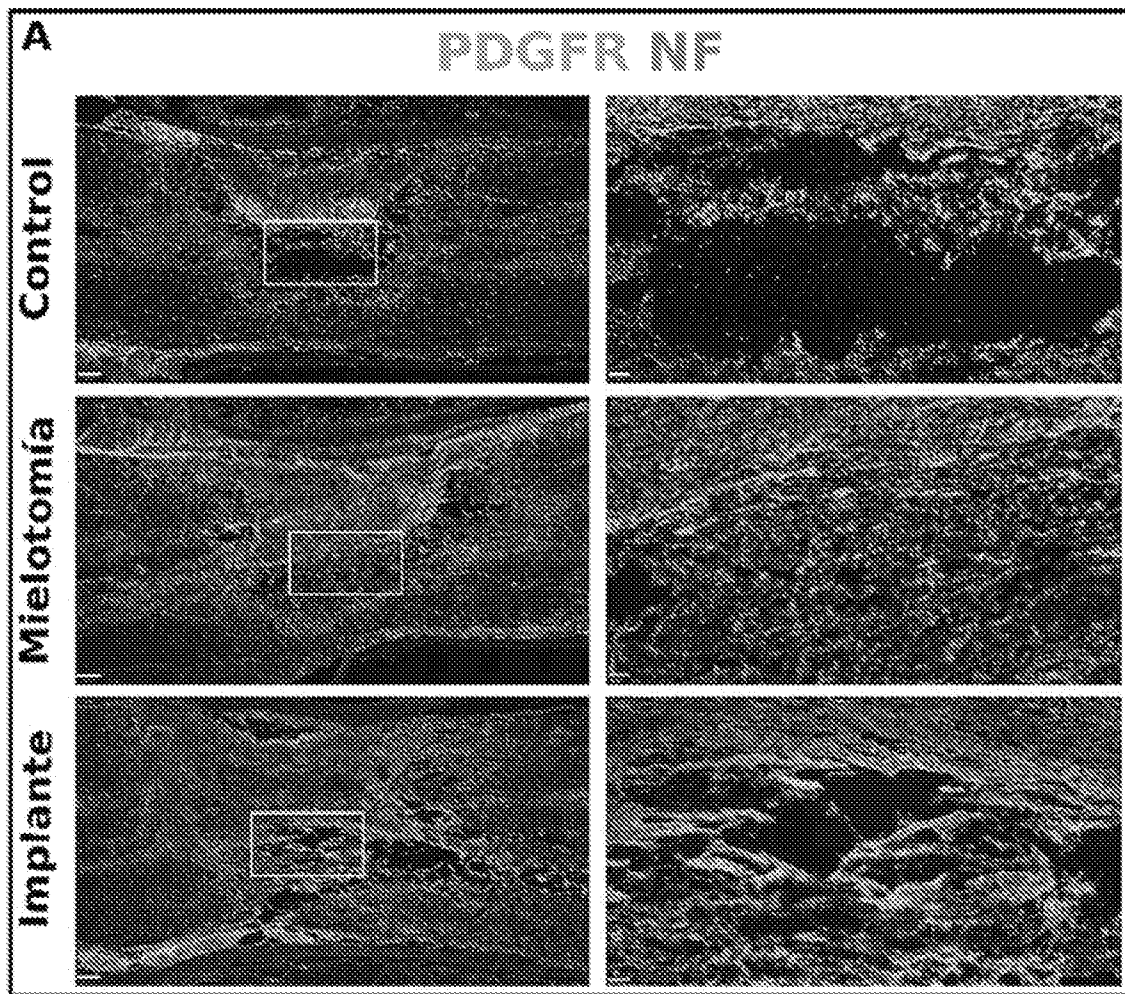


Fig. 11



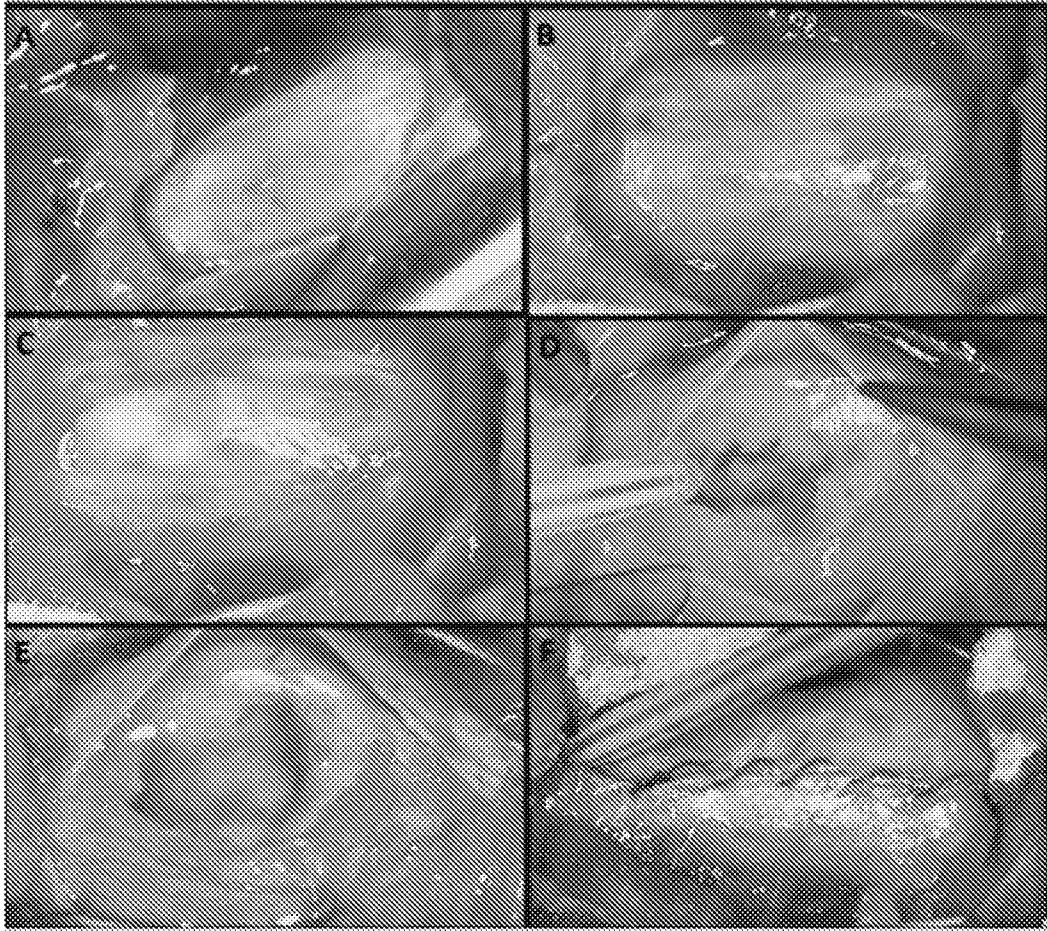


Fig. 13

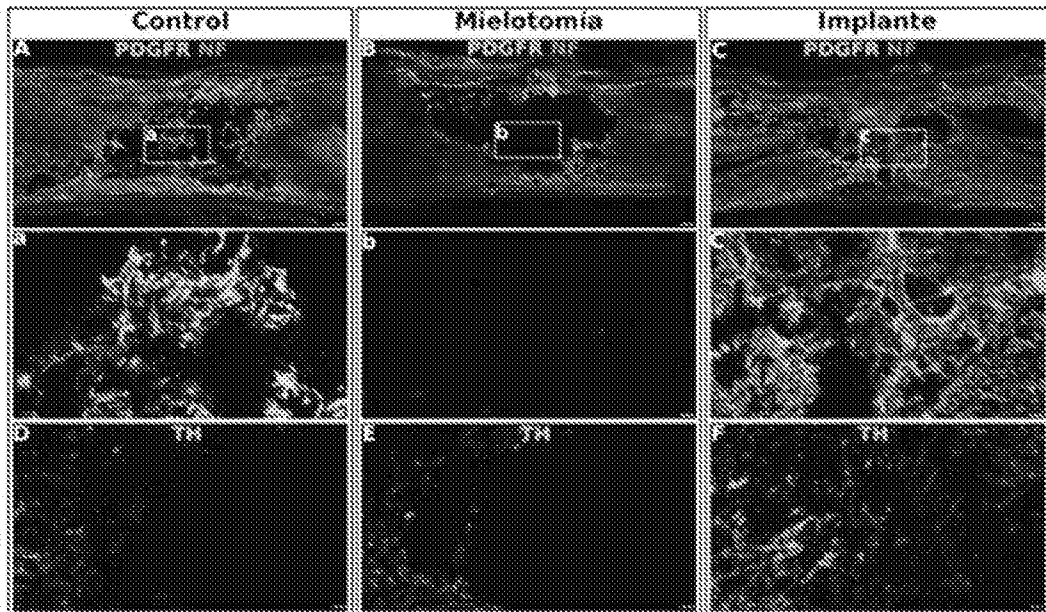


Fig. 14

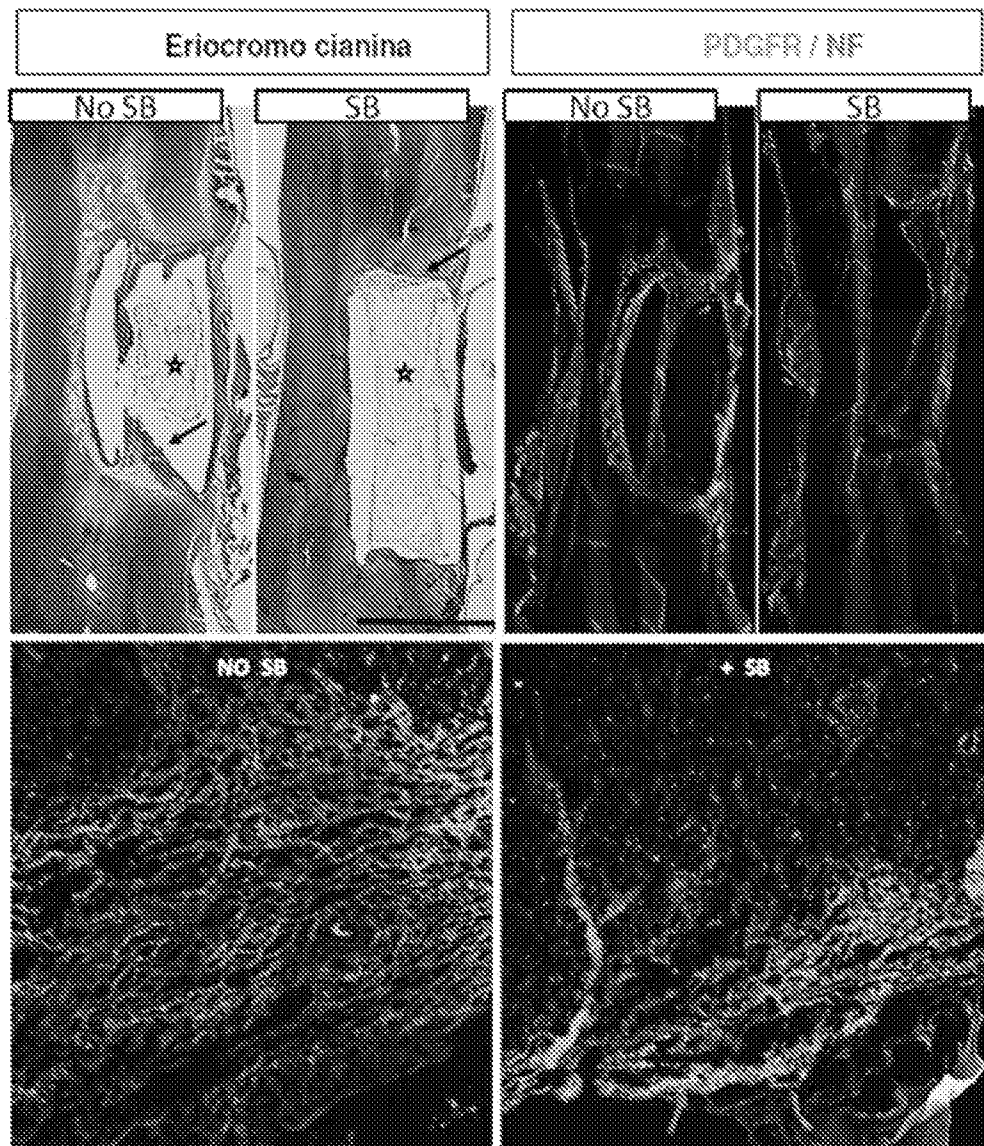


Fig. 15

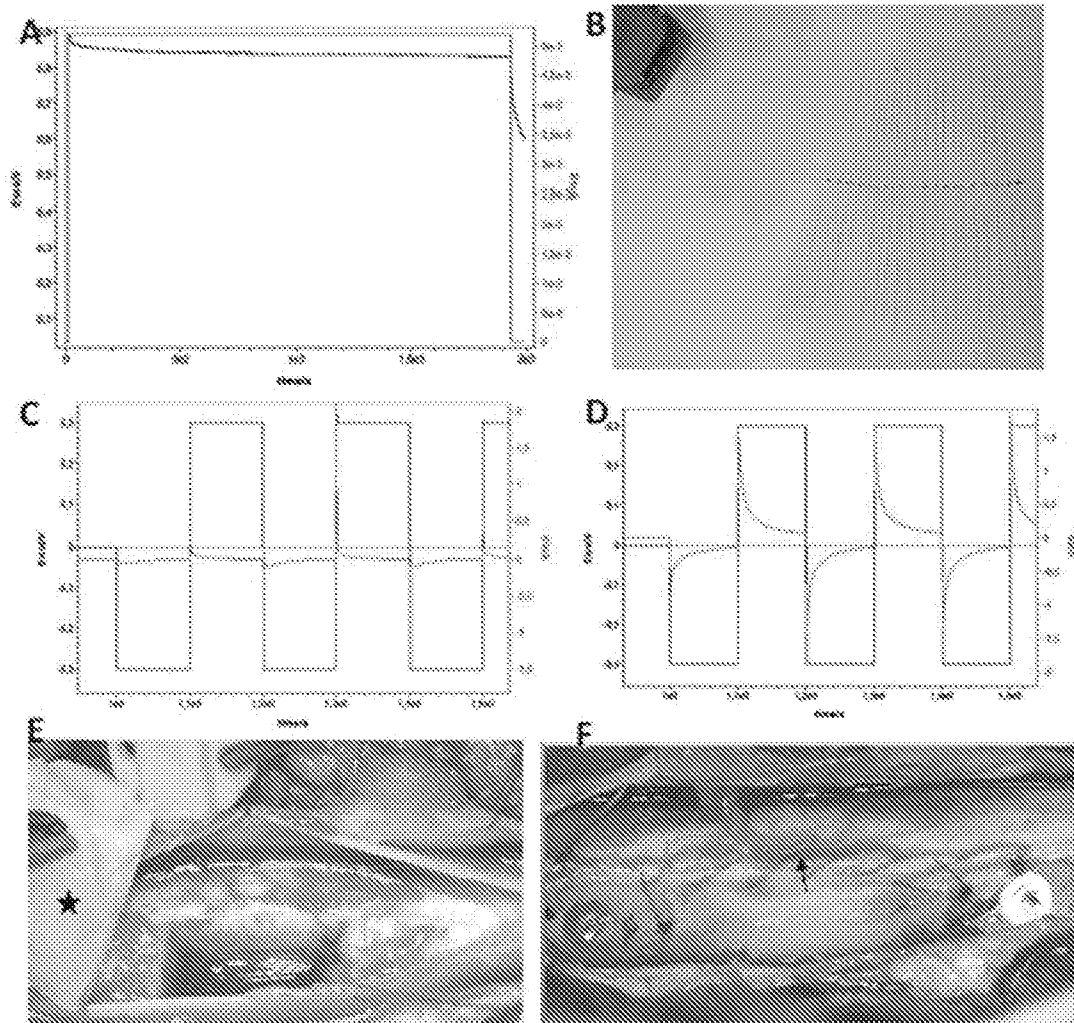


Fig. 16