



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 223**

51 Int. Cl.:  
**C12N 5/00** (2006.01)  
**A61L 15/00** (2006.01)  
**A61L 27/00** (2006.01)  
**C08L 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00901189 .1**  
96 Fecha de presentación : **21.01.2000**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1144592**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.10.2001**

54 Título: **Crecimiento celular.**

30 Prioridad: **21.01.1999 GB 9901272**  
**17.02.1999 GB 9903561**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.04.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2009**

73 Titular/es: **Advanced Medical Solutions Limited**  
**Road Three, Winsford Industrial Estate**  
**Winsford, Cheshire CW7 3PD, GB**

72 Inventor/es: **Hamilton, Douglas, William;**  
**Ives, Christopher, Louis;**  
**Middleton, Ian, Philip y**  
**Rossetto, Chiara**

74 Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

ES 2 315 223 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Crecimiento celular.

5 La presente invención se refiere a sustratos para su uso en crecimiento celular y a métodos para producir tales sustratos. La invención se refiere más particularmente a sustratos que tienen actividad promotora de la adhesión celular que pueden usarse en diversas aplicaciones de crecimiento celular, por ejemplo cicatrización de heridas e ingeniería de tejidos. La invención también se refiere a métodos para preparar tales sustratos y a su uso en diversas aplicaciones de crecimiento celular.

10 Todas las células eucariotas, de mamífero, dependen de un sustrato porque necesitan estar unidas a una superficie con el fin de poder crecer, secretar o dividirse. El fenotipo que expresan las células está determinado parcialmente por su interacción con el sustrato al que están unidas. El sustrato al que están unidas las células de mamífero es el colágeno. Todos los tejidos blandos (excluyendo la sangre) y duros del organismo están compuestos de células unidas  
15 a una estructura de colágeno. El colágeno es una proteína que forma fibras y las fibras forman matrices; estas matrices pueden formar cualquier configuración desde al azar hasta alineada.

20 Las propias fibras de colágeno están compuestas de fibrillas, de modo que una fibra de colágeno se parece a un cable de fibrillas alineadas. La química de la fibrilla de colágeno varía según el tipo de tejido y se ha identificado una gama de colágenos.

Los sustratos para la aumentación de tejidos o para actuar como soportes para transferencia de células cultivadas en el tratamiento de heridas normalmente están basados en colágeno. En esta situación, el sustrato de colágeno normalmente debe ser específico para el tipo de crecimiento celular requerido y el fenotipo y estado (secretor, replicatorio)  
25 hechos crecer sobre el sustrato pueden no resultar los requeridos.

El documento WO-A-9812228 da a conocer alginatos modificados que comprenden al menos una cadena de alginato a la que está unida covalentemente al menos una molécula útil para la interacción celular, por ejemplo una proteína de adhesión celular. Los materiales son útiles para proporcionar matrices poliméricas para aplicaciones de ingeniería de tejidos para sustitución de tejidos blandos o huesos.  
30

El documento US-A-5 610 148 (R. Brown) titulado "Macroscopically Orientated Cell Adhesion Protein" describe la producción de una fibra compuesta de fibrillas de una proteína de adhesión celular seleccionada de fibronectina (Fn), vitronectina y proteína de von Willebrand que se ha desnaturalizado y entonces las cadenas poliméricas se han alineado mediante cizalladura unidireccional permitiendo la agregación y precipitación. Estas fibras son de una construcción peroneal no diferente en algunos aspectos al colágeno. Las células sembradas sobre las fibras demuestran un crecimiento celular direccional como resultado de la orientación longitudinal del sitio de unión de adhesión celular. Sin embargo, tales estructuras de fibra requieren una alta concentración de fibronectina o fibrinógeno/fibronectina, son algo complicadas de producir y son de resistencia relativamente baja.  
35  
40

Es un objeto de la presente invención obviar o mitigar las desventajas mencionadas anteriormente.

Según la presente invención, se proporciona un sustrato para crecimiento celular que comprende un polisacárido y una proteína de adhesión celular proporcionada en la superficie del sustrato y asociada covalentemente con el mismo  
45 mediante puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o atrapamiento físico.

Los sustratos según la invención tienen la ventaja (con respecto a los sustratos compuestos de fibrillas de fibronectina u otra proteína de adhesión celular) de tener una resistencia superior que un sustrato compuesto sustancialmente del 100% de proteína y son también más fáciles de fabricar. Los sustratos de la invención pueden usarse en una amplia gama de aplicaciones de crecimiento celular, por ejemplo reparación de heridas, reparación o aumentación de tejidos o para el crecimiento de células en cultivo celular habitual *in vitro*, en cultivo celular a gran escala, biorreactores o cultivo de órganos.  
50

En los sustratos de la invención, la orientación de la proteína de adhesión celular no es necesariamente significativa y se logra el guiado de las células durante el crecimiento de las mismas mediante la forma física del sustrato. Por tanto, por ejemplo, en el caso de una fibra (véase más adelante) puede producirse el crecimiento celular a lo largo y/o alrededor de la fibra, tal como se determina mediante la presencia de la proteína de adhesión celular. Sin embargo, no se excluye la posibilidad de que la proteína de adhesión celular tenga al menos algún grado de alineamiento.  
55

La proteína de adhesión celular incorpora preferiblemente el sitio de unión RGD (arginina, glicina, ácido aspártico). Se prefiere particularmente que la proteína de adhesión celular sea fibronectina, vitronectina o proteína de von Willebrand o un fragmento de tales proteínas que incorpora este sitio de unión RGD.  
60

La proteína de adhesión celular preferida es fibronectina, que puede usarse en la forma aislada habitualmente del plasma sanguíneo, por ejemplo mediante crioprecipitación. La fibronectina puede contener fibrinógeno y albúmina.  
65

El polisacárido y la proteína de adhesión celular pueden distribuirse uniformemente por todo el sustrato de modo que la proteína de adhesión celular esté presente en la superficie como resultado de esta distribución.

## ES 2 315 223 T3

El sustrato puede comprender una capa basal de polisacárido que tiene una capa superficial de una proteína de adhesión celular.

5 La capa basal de polisacárido tendrá preferentemente un espesor de al menos el 60%, más preferiblemente de al menos el 80% y de manera ideal de al menos el 90% de la profundidad combinada de la capa basal y la capa de proteína de adhesión celular.

10 La proteína de adhesión celular proporcionada como una capa superficial para la capa basal de polisacárido puede ser una capa integrada o puede ser una capa molecular absorbida sobre la superficie. La capa superficial de la proteína de adhesión celular puede tener, dependiendo del método mediante el que se produce, sólo varias moléculas de espesor o puede tener un espesor algo mayor de modo que forma una capa externa diferenciada. Por tanto, la capa de proteína puede ser cualquiera desde 3-5 moléculas de "profundidad" en el caso de adsorción superficial hasta, por ejemplo, 20  $\mu\text{m}$  (por ejemplo, 1-20  $\mu\text{m}$ ) cuando se forma como un "recubrimiento". Esta capa de proteína puede ser una red esencialmente amorfa, tener algo de cristalinidad o incluso poca o nada estructura de fibrilla. La capa de proteína puede estabilizarse y unirse a la capa basal (de polisacárido) mediante puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o atrapamiento físico. El grado de estabilidad de la capa de proteína puede usarse como un mecanismo para dirigir ciertas respuestas celulares. Por tanto, el sustrato puede "adaptarse" para garantizar el crecimiento de un tipo de célula particular y/o para proporcionar un grado conocido de crecimiento celular en un tiempo predeterminado.

20 La capa de polisacárido comprenderá preferentemente al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 60%, incluso más preferiblemente al menos el 80% y de manera ideal al menos el 90% de polisacárido. La capa de proteína de adhesión celular comprenderá preferiblemente al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 60%, incluso más preferiblemente al menos el 80% y de manera ideal al menos el 90% de proteína de adhesión celular.

25 La capa de proteína de adhesión celular puede incorporar proteínas diferentes de las proteínas de adhesión celular.

30 Los sustratos de crecimiento celular según la invención pueden incorporar, por ejemplo en la capa de polisacárido, un principio activo para su administración durante la aplicación de crecimiento celular. Este principio puede administrarse, por ejemplo, mediante difusión y puede ser por ejemplo un fármaco. Ejemplos adicionales de principios activos incluyen factores de crecimiento, agentes quimiotácticos, etc. Los principios activos pueden estar libres o encapsulados, por ejemplo en gotitas de tipo lipídicas. El principio activo puede disponerse de manera continua o discontinua a lo largo, a través y/o alrededor del sustrato de crecimiento celular y puede proporcionarse en diferentes cantidades en diferentes regiones del sustrato de modo que se establece un gradiente de concentración.

35 Pueden producirse sustratos según la invención mediante varios métodos. En un método de este tipo, se extruye una disolución que contiene polisacárido y proteína de adhesión celular disueltos (conteniendo la disolución menos de la proteína que del polisacárido) en un baño de coagulación. Se cree que, en un método de este tipo, existe una deposición preferente de la proteína de adhesión celular. El baño de coagulación puede incorporar, por ejemplo, cationes divalentes o superiores (por ejemplo,  $\text{Ca}^{2+}$ ) que sirven para efectuar la precipitación y también estabilizan la capa de proteína mediante puentes iónicos.

40 En un método adicional, el polisacárido se extruye en un baño de coagulación que incorpora proteína (que contiene la proteína de adhesión celular) como coagulante. El coagulante de proteína puede ser por ejemplo un plasma sanguíneo enriquecido (que contiene una proteína de adhesión celular). De nuevo otra vez, se cree que existe una deposición preferente de la proteína de adhesión celular en la superficie del sustrato. Este procedimiento es particularmente eficaz cuando el polisacárido es quitosano.

50 En un método alternativo de producción del sustrato, puede aplicarse una capa superficial de una proteína de adhesión celular a un polisacárido preformado. La aplicación de la capa de proteína puede efectuarse, por ejemplo, en un baño de recubrimiento que contiene una disolución de proteína o mediante una técnica tal como pulverización.

55 Ejemplos de polisacáridos que pueden usarse para el sustrato incluyen alginatos, quitosano, almidones catiónicos, derivados catiónicos de otros hidrocoloides, pectina baja en metoxilo, carragenanos, condroitina sulfato, ácido hialurónico, carboximetilcelulosa, carboximetilalmidón, carboximetilguar, celulosa sulfato, dextran sulfato, goma gellan, goma xantana y derivados aniónicos de otros hidrocoloides. Se prefiere particularmente que el polisacárido esté compuesto de un material de alginato reticulado con iones calcio como otro catión divalente o superior que puede reticular alginatos.

60 Ejemplos particularmente preferidos de sustratos de crecimiento celular según la invención están en forma de fibras que tienen un núcleo (que proporciona la capa basal) que consiste en, o es rica en, el material de polisacárido y una superficie en la que se proporciona la proteína de adhesión celular.

65 Las fibras según la invención pueden tener un diámetro de 10-1000  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente de 40-150  $\mu\text{m}$ , incluso más preferiblemente de 40-100  $\mu\text{m}$  y de manera ideal de 50-80  $\mu\text{m}$ . Las fibras pueden ser de cualquier longitud apropiada.

Tales fibras pueden producirse hilando una masa hilable compuesta por una disolución del polisacárido en un baño de coagulación que provoca la precipitación de las fibras. La masa hilable también puede contener proteína de adhesión

## ES 2 315 223 T3

5 disuelta que va a formar la capa superficial, siendo tal la técnica de hilatura que hay una precipitación inicial preferente de polisacárido en el baño de coagulación seguida por una precipitación posterior de la proteína de adhesión celular que forma así una capa externa rica en proteína de la fibra (siendo esta capa solidaria con el núcleo). La masa hilable para su uso en este procedimiento puede comprender, por ejemplo (basándose en el peso total del polisacárido y la proteína de adhesión celular) el 60-95% (preferiblemente de manera aproximada el 90%) en peso del polisacárido y el 5-40% (preferiblemente de manera aproximada el 10%) en peso de la proteína de adhesión celular. La fibra producida mediante un procedimiento de este tipo puede tener un núcleo compuesto por el 50-80% en peso del polisacárido y una capa externa compuesta por el 50-80% en peso de la proteína de adhesión celular y el 20-50% en peso del polisacárido.

10 En un método de hilatura alternativo, las fibras pueden formarse mediante una técnica de extrusión coaxial en la que se extruye una disolución de la proteína de adhesión de manera coaxial alrededor de una disolución (separada) del polisacárido, hilándose ambas disoluciones en el mismo baño de coagulación, mediante lo cual se forma una fibra que tiene un núcleo de polisacárido y una capa superficial de la proteína de adhesión celular.

15 En un procedimiento alternativo para producir las fibras, puede hilarse una masa hilable compuesta por una disolución del polisacárido (pero no de la proteína de adhesión celular) en un baño de coagulación y la fibra así formada se trata con la proteína de adhesión celular. Este tratamiento puede efectuarse, por ejemplo, proporcionando la proteína de adhesión celular en el baño de coagulación de modo que la proteína se adsorba como una capa superficial sobre la capa basal de polisacárido. Sin embargo, es más preferible que la proteína de adhesión celular se aplique en un baño posterior al baño de coagulación. Las condiciones en el baño de proteína pueden ser tales como para garantizar que se obtenga la formación de un recubrimiento estabilizado de la capa de proteína.

25 Además, para todas las realizaciones de la formación de fibras, la proteína de adhesión celular debe concentrarse en la superficie de las fibras. Si la fibra se produce mediante hilatura conjunta de una disolución del polisacárido y la proteína de adhesión celular, puede usarse la combinación de tamaño molecular relativo, equilibrio hidrófilo/hidrófobo y estabilidad relativa para provocar una precipitación preferente. Si la fibra se produce mediante un procedimiento de dos fases, entonces puede lograrse la concentración de la proteína en la superficie mediante el uso de la concentración del polisacárido y la proteína en cada fase, mezclándose en la primera fase el polisacárido y la proteína, en la segunda fase predominantemente la proteína más agentes tensioactivos y/o estabilizadores.

30 Cualquiera que sea el método usado, la proteína debe estabilizarse en la superficie y, de hecho, cuanto menor sea la cantidad de proteína más importante es la estabilización. La estabilización puede efectuarse garantizando que las partes de la cadena molecular de la proteína estén embebidas en el polisacárido a granel. En el caso en el que el polisacárido se ha reticulado mediante cationes divalentes, la estabilización de la proteína puede ser mediante puentes catiónicos divalentes. Cuando se usa quitosano para formar el núcleo, sólo se producirán puentes catiónicos de soporte dentro de las especies proteicas que ayudarán a estabilizar la proteína en la superficie.

Se describen a continuación realizaciones más específicas de la producción de fibras según la invención.

40 En una realización de este tipo, se produce una fibra expeliendo una disolución acuosa de alginato de sodio a través de una hilera en un baño de coagulación que contiene iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Entonces se hace pasar la fibra a través de una disolución de fibronectina (o disolución de proteína mixta) en un baño de recubrimiento (posterior al baño de coagulación) que está a un pH que proporcionará a la fibronectina una carga neta positiva provocando que pueda interaccionar con el ácido algínico. La fibronectina puede unirse además al alginato haciendo pasar la fibra a través de un baño de coagulación/estabilización a un pH que favorece que la fibronectina se cargue negativamente, favoreciendo así los puentes catiónicos divalentes de modo que se estabiliza la fibronectina sobre el polisacárido. El baño de coagulación/estabilización puede contener agentes que modifican o bien directamente la interacción de la fibra con las células (por ejemplo a través de la naturaleza de un contraión, por ejemplo Zn, Ag, Mn, Ce) o bien indirectamente influyendo en el entorno circundante mediante la difusión de una especie molecular activa, tal como factores de crecimiento, agentes de agregación, quimioatrayentes, tensioactivos, etc.

55 Como alternativa a aplicar la fibronectina en un baño de recubrimiento, es posible aplicar un recubrimiento de fibronectina pulverizando una disolución de fibronectina sobre la fibra. La pulverización proporciona un medio de recubrimiento fino (es decir, sólo varias moléculas de espesor) y también un método de recubrimiento que producirá potencialmente una forma fibrilar del recubrimiento si las condiciones de cizalladura, etc. se fijan correctamente. Estas condiciones también pueden ajustarse para dar orientación a la fibrilla formada en relación con el sustrato.

60 En una realización adicional de la producción de fibras, pueden encontrarse fibras en un procedimiento de una única fase hilando una masa hilable que contiene alginato de sodio disuelto y fibronectina en una disolución de calcio u otros iones divalentes (que proporcionan la fuerza de transmisión para la precipitación). La masa hilable se formula de modo que la fibronectina precipita preferentemente en la superficie de la fibra. Las cantidades relativas del alginato de calcio con respecto a la fibronectina en la masa hilable serán preferiblemente del orden de al menos 80 partes en peso de alginato y como máximo 20 partes de fibronectina.

65 En el procedimiento descrito en el párrafo anterior, la fibra se producirá en condiciones que estimulan la naturaleza globular de la proteína. Esto puede lograrse mediante el uso de un pH o una temperatura (para el baño de coagulación) que provoque que las cadenas de la molécula de proteína se “enrollen” sobre sí mismas con una tendencia a embeber los extremos de la cadena en la estructura de la fibra.

## ES 2 315 223 T3

En un procedimiento de producción de fibras alternativo, se mezclará un polielectrolito tal como quitosano con la disolución de fibronectina y precipitará una fibra mediante hilatura en un baño de hidróxido de sodio. El peso molecular del quitosano se elegirá para estimular la formación de fibras.

5 Como una alternativa al procedimiento descrito en el párrafo anterior, es posible hilar una masa hilable que comprende una disolución de quitosano (como el polisacárido) para formar una fibra que puede recubrirse posteriormente con fibronectina. Este recubrimiento (de fibronectina) se formará mediante interacción de cargas directamente entre las cadenas laterales cargadas del quitosano y los grupos de aminoácidos de la fibronectina así como mediante puentes catiónicos.

10 Para todos los métodos de producción de fibras, puede ser apropiado someter las fibras hiladas a estiramiento, lavado y/u operaciones de secado. En el caso en el que se aplica un tratamiento superficial (separado) de la proteína de adhesión celular tras la formación de la capa basal de polisacárido, puede ser apropiado efectuar un estiramiento y/o lavado antes del tratamiento con la proteína de adhesión celular.

15 Aunque las fibras son la forma preferida del sustrato de crecimiento celular según la invención, son posibles otras formas. Los ejemplos incluyen láminas y tiras que pueden producirse conformando (mediante un método de cuchilla sobre rodillo o recubrimiento por transferencia o boquilla de ranura) una película fina de una disolución del polisacárido que entonces se precipita en un baño de coagulación. Como en el caso de la formación de fibras, la disolución también puede incorporar la proteína de adhesión celular que va a depositarse preferentemente al coagularse en la superficie del polisacárido. Alternativamente, la disolución que va a precipitarse en el baño de coagulación no necesita incluir la proteína de adhesión celular que entonces puede aplicarse posteriormente a la lámina o tira mediante pulverización con una disolución de la proteína. En este caso, la naturaleza del recubrimiento se determina mediante la concentración de la proteína en disolución, la velocidad, orificio, tamaño y dirección de la pulverización en relación con la superficie. El ajuste acertado de estos parámetros debe producir moléculas no desnaturalizadas pero alineadas de la proteína activa. La capa superficial de la proteína de adhesión celular puede aplicarse a la lámina mediante pulverización con una disolución de la proteína. Pulverizando a alta concentración y velocidad de flujo a través de un orificio pequeño, pueden obtenerse la desnaturalización de la proteína, la formación de fibrillas y el alineamiento y si esto se dirige en paralelo a una superficie, entonces este alineamiento se mantendrá en el recubrimiento superficial obtenido; el alineamiento molecular de la proteína se reflejará entonces en el alineamiento de las especies celulares que han crecido sobre el sustrato.

30 Independientemente de la forma física (fibra, lámina, etc) del sustrato de crecimiento celular de la invención y también independientemente de la manera en la que la capa superficial de proteína de adhesión celular se incorpora al mismo, se prefiere que la capa basal de polisacárido se forme hilando o extruyendo una disolución de alginato de sodio en un baño que contiene iones calcio. El alginato de sodio preferido para su uso en una técnica de este tipo tiene un contenido en ácido gulurónico (G) de al menos el 35% en peso y un contenido en ácido manurónico (M) de como máximo el 65% en peso. Preferiblemente, el contenido en G es del 35-70% en peso y el contenido en M es del 65-30% en peso. También preferiblemente, el alginato de sodio tiene una viscosidad para una disolución al 1% (en agua) del alginato de sodio de 30-300 cP, más preferiblemente 40-100 cP. La disolución de alginato que va a hilarse o extruirse en el baño de coagulación debe tener generalmente un contenido en sólidos disueltos total inferior al 10% en peso, más preferiblemente en el intervalo del 5-7%. La cantidad del catión (por ejemplo calcio) presente en el baño de coagulación (para efectuar la precipitación del alginato) es preferiblemente inferior al 1% en peso.

45 Para productos según la invención producidos mediante coagulación de una disolución de un alginato, es posible que la disolución de alginato (que va a coagularse) contenga al menos un polisacárido adicional para modificar las propiedades del alginato. El polisacárido adicional puede ser, por ejemplo, uno que tenga grupos  $\text{COO}^-$  a lo largo de las cadenas de polisacárido, por ejemplo pectina, carboximetilcelulosa N-, O-carboximetilquitosano, carragenanos, goma xantana o goma gellan. Alternativa o adicionalmente, el polisacárido que va a coagularse con el alginato puede ser uno que tiene grupos  $\text{SO}_4^{2-}$  proporcionados a lo largo de la cadena de polisacárido, por ejemplo condroitina sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato o heparán. Pueden usarse polisacáridos no cargados junto con el alginato, por ejemplo acemanano. El polisacárido adicional puede ser uno que mejore la absorbencia de agua del alginato. Se facilita una descripción adicional de productos obtenidos mediante coagulación de una disolución de alginato que contiene al menos otro polisacárido en el documento WO-A-9610106 (Innovative Technologies Ltd), cuya descripción se incorpora al presente documento como referencia.

50 Para todos los sustratos de crecimiento celular según la invención, la capa superficial de la proteína de adhesión celular puede ser continua o discontinua. Por tanto, por ejemplo, en el caso de una fibra, la proteína puede proporcionarse de manera continua a lo largo y alrededor de la longitud de la fibra o como repeticiones periódicas (por ejemplo, de longitud predeterminada) a lo largo de la longitud de la fibra y al menos parcialmente alrededor de la circunferencia de la fibra, o como una "raya" que no se extiende completamente alrededor de la circunferencia y que se extiende de manera continua o discontinua a lo largo de la longitud de la fibra. Si la capa de proteína de adhesión celular es discontinua, partes de la superficie del sustrato de crecimiento celular pueden ser (cuando se usan para crecimiento celular) interactivas de manera positiva ("parlantes") y otras partes pasivas ("silenciosas") y otras partes interactivas de manera negativa ("desestimulantes"). En términos celulares, esto significa que una superficie positiva estimula la propagación de la adhesión celular, la motilidad y el crecimiento, mientras que una superficie pasiva ("silenciosa") puede tener un bajo nivel de interacción.

## ES 2 315 223 T3

Los sustratos de crecimiento celular según la invención pueden usarse en varias formas para diversas aplicaciones de crecimiento celular. Meramente a modo de ejemplo, los sustratos en forma de fibras pueden formarse en una estructura, por ejemplo matrices al azar (por ejemplo fieltros y vellones no tejidos), matrices orientadas (fibras que tienen algún alineamiento relativo), estructuras tricotadas (por ejemplo telas tricotadas), estructuras trenzadas (por ejemplo hebras trenzadas), estructuras empaquetadas y cintas cardadas. Una estructura preferida comprende fibras según la invención colocadas en paralelo o al azar entre sí y preferentemente unidas a una capa de soporte, por ejemplo una película de poliuretano. Esta capa de soporte puede estar recubierta de manera adhesiva.

Una posibilidad adicional es para fibras que van a disponerse en un gel amorfo.

Una posibilidad adicional se refiere a fibras producidas con un polisacárido (por ejemplo alginato) reticulado mediante un catión divalente o superior (por ejemplo calcio). Tales fibras pueden mezclarse (usando las técnicas descritas en el documento WO-A-9613285 (Innovative Technologies Ltd) con una disolución acuosa de un material precursor de hidrogel mediante el cual los cationes de las fibras reticulan el material precursor dando como resultado la formación de un hidrogel en el que las moléculas del precursor de hidrogel están reticuladas mediante los cationes divalentes o superiores donados por las fibras. La mezcla puede incorporar un plastificante. Posteriormente, puede eliminarse el agua del hidrogel de modo que se proporciona una forma deshidratada del mismo que contiene las fibras como refuerzo. Un producto de este tipo es sumamente adecuado para su uso en la cicatrización de heridas durante la cual las fibras se expondrán en la superficie del producto para proporcionar un sustrato para crecimiento celular. El precursor de hidrogel puede ser por ejemplo alginato de sodio y el plastificante puede ser por ejemplo glicerol, polietilenglicol, sorbitol o un polímero de PEO/PPO.

Los sustratos de crecimiento celular en forma de tiras o láminas pueden enrollarse por ejemplo en tubos u otras estructuras tridimensionales.

Tal como se indicó anteriormente, los sustratos de crecimiento celular según la invención pueden usarse en una gama de aplicaciones de crecimiento celular. Si el alineamiento celular sobre la superficie del sustrato es importante, entonces éste puede estar impuesto por la naturaleza de la célula y su relación con su superficie. Por ejemplo, el alineamiento celular puede determinarse mediante el tamaño de una fibra sobre la cual se hace crecer la célula. Si se requiere alineamiento de la longitud de la célula o bien perpendicular o bien paralelo a un eje particular del sustrato, entonces esto puede conseguirse o bien mediante cualquier exposición de la superficie a un flujo que producirá una tensión de corte en la pared paralela a la orientación deseada o bien a un esfuerzo axial que tenderá a provocar que las células se sitúen a través del eje de tensión y por tanto a través del eje de la superficie.

Se facilitarán ahora varios ejemplos específicos (pero no limitativos) de usos de sustratos de crecimiento celular según la invención.

### *Tratamiento de heridas*

Los sustratos pueden usarse en el tratamiento de heridas. Para este fin, puede preferirse un sustrato de crecimiento celular (según la invención) en forma de una lámina o película plana. El material de película o lámina puede incorporar un agente que va a administrarse a la herida.

Alternativamente, pueden ponerse sobre la herida series en paralelo o al azar de fibras con o sin células sembradas o bien individualmente, empaquetadas o bien fijas a un soporte que puede estar recubierto de manera adhesiva. Un ejemplo de un soporte adecuado es un material de película polimérico, particularmente una película transpirable (por ejemplo, película de MVTR alta). La película puede ser una que tiene una MVTR cuando está en contacto con agua líquida que es al menos el doble que cuando está en contacto con vapor de agua (pero no agua líquida). Por ejemplo, la MVTR en contacto con vapor de agua sólo puede ser de  $3000\text{-}5000\text{ g m}^{-2}\text{ 24 h}^{-1}$  (tal como se mide según la norma ASTM E96B) y una MVTR en presencia de agua líquida (tal como se mide según la norma ASTM E96BW) de  $8000\text{ a }10000\text{ g m}^{-2}\text{ 24 h}^{-1}$ . El soporte puede tener un aparato para permitir la transferencia de exudado. Ya se use o no un soporte, las fibras aplicadas a la herida pueden incorporar factores de crecimiento para administrar a células de la superficie o incorporar agentes que influirán en el entorno circundante, por ejemplo bactericidas, etc. Pueden aplicarse mezclas de fibras a la herida, por ejemplo dos cualquiera de (i) fibras sembradas con células, (ii) fibras no sembradas y (iii) fibras que contienen un agente que va a administrarse a la herida.

### *Sustitutos dérmicos y epidérmicos cultivados*

Los sustratos de crecimiento celular según la invención pueden cultivarse con capas sencillas de queratinocitos epidérmicos o fibroblastos dérmicos (cualquiera de los cuales puede ser de origen autólogo o heterólogo). El sustrato (con células cultivadas) puede usarse solo o en combinación con sustratos cultivados de manera similar. Estos sustratos y células pueden usarse para el tratamiento de heridas de espesor parcial, por ejemplo sitios donantes y para el tratamiento de úlceras.

## ES 2 315 223 T3

### *Reparación/aumentación de tejidos*

Los sustratos de crecimiento celular en forma de fibras continuas pueden colocarse en relación con una estructura u órgano dañado. Pueden colocarse o bien individualmente o bien en paquetes durante el tratamiento invasivo o no invasivo.

Alternativamente, los sustratos de crecimiento celular en forma de fibras pueden proporcionarse como una suspensión inyectable. La suspensión puede introducirse en el organismo a lo largo de un sistema de guía de catéter o pueden formarse las fibras en el sitio. Como alternativa, es posible formular dos disoluciones; una que contiene el polisacárido, la otra el coagulante, conteniendo por tanto al menos una de las disoluciones proteína de adhesión celular y aplicar estas disoluciones a un paciente en condiciones tales que se produce la formación de fibras *in situ*, siendo la fibra formada posiblemente continua.

### *Ortopedia*

Los sustratos de crecimiento celular en forma de fibras pueden alinearse en paralelo a tendones y sembrarse *in situ* con células apropiadas, condrocitos, etc. Alternativamente, pueden cultivarse fibras más células en un laboratorio y administrarse luego al paciente. Para ambas realizaciones, las fibras pueden contener, o asociarse con fibras construidas con ácido hialurónico u otras sustancias derivadas de cartílago.

### *Injerto vascular*

Los sustratos de crecimiento celular en forma de fibras pueden tricotarse, tejerse o hilarse en tubos para estimular el crecimiento celular para formar un conducto sanguíneo.

### *Regeneración nerviosa*

Pueden repararse nervios dañados usando fibras para unir los dos extremos (separados) del nervio, proporcionando así un trayecto a lo largo del cual el nervio puede crecer.

### *Administración de fármacos*

Los sustratos de crecimiento celular pueden incorporar moléculas activas ubicadas en la capa de polisacárido. Estos agentes pueden usarse para influir en la incorporación de la fibra al tejido. Alternativamente, el agente puede proporcionar un depósito de fármaco para los fines de tratamiento tópico o sistémico.

Para todas las realizaciones anteriores de la invención, la proteína de adhesión celular puede sustituirse por un componente del plasma sanguíneo.

La invención se ilustra además con referencia a los siguientes ejemplos y las figuras de los dibujos adjuntos que muestran los resultados de los ejemplos.

Para los ejemplos, se usaron los siguientes procedimientos.

### *Cultivo celular*

Se hicieron crecer células de fibroblastos de ratón L929 para su uso en un experimento hasta la confluencia y entonces se extrajeron de las placas de cultivo tisular lavando con solución salina tamponada con Hepes, seguido por tratamiento con disolución de tripsina al 0,25%. Se centrifugó el sobrenadante resultante y se resuspendió el sedimento de células en medio de Eagle modificado por Dulbecco [que contenía suero de ternero fetal al 10%, penicilina al 5%/estreptomycina, ITS al 1% (insulina-transferrina-selenita)]. Si se subcultivaron, entonces las células se sembraron en placas sobre placas de cultivo tisular a una dilución de 1:5.

Se pesaron 15 mg de cada tipo de fibra que iba a someterse a prueba y se colocaron en cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 12 pocillos. En todos los experimentos, se lavaron las fibras con medios que contenían suero durante un periodo de 24 horas. Los controles experimentales fueron células sembradas sobre plástico de cultivo tisular. Las células usadas para las pruebas de las fibras se sembraron en placas a una densidad de 80.000 células por pocillo. Todos los experimentos se terminaron en un punto de tiempo de hasta 72 horas.

### *Fijación y tinción*

Se lavaron las células y fibras dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y luego se fijaron usando disolución de formalina (tamponada neutra al 10%) durante 10 minutos. Se eliminó el fijador y se lavaron las células y fibras dos veces más con PBS. Entonces se tiñeron las células con Giemsa durante 10 minutos, seguido por 3 lavados de cinco minutos con PBS. Entonces se observaron las células usando un microscopio Nikon Diaphot y se capturaron las imágenes usando una videocámara digital JVC DV1. Entonces se descargaron las imágenes a un ordenador Apple Macintosh Power PC Performa 6400/200 y se realizó el análisis usando el programa de dominio NIH image. Para la microscopía electrónica de barrido, se deshidrataron las muestras fijadas en etanol al 100% durante un periodo de 2

## ES 2 315 223 T3

horas. Entonces se recubrieron por pulverización las muestras usando un aparato Denton Vacuum modelo desk 1. Se montaron las muestras sobre un portamuestras y se observaron usando un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-510. Se capturaron las imágenes usando la cámara JVC y se analizaron en el ordenador Macintosh usando NIH image.

5

### *Preparación de plasma sanguíneo bovino enriquecido*

Se extrajo sangre bovina y se mezcló en una razón 9:1 con una disolución acuosa al 4% p/p de citrato de trisodio (Sigma Chemicals) como anticoagulante. Entonces se centrifugó la mezcla a 1000 rpm durante 10 minutos, tiempo tras el cual se eliminó el plasma sobrenadante con una pipeta, se congeló a de -15 a 20°C y entonces se descongeló con refrigeración a 4°C. Esto provocó que el contenido en proteína globular del plasma se mantuviera precipitado y se concentró mediante deposición en el fondo del recipiente de almacenamiento. Se eliminó el sobrenadante del plasma refrigerado y cuando se descongeló la fracción restante formó un plasma enriquecido adicionalmente en proteína globular, concentración que puede enriquecerse adicionalmente mediante otro ciclo de congelación-descongelación. La fracción de plasma así aislada se usó en algunos de los experimentos explicados resumidamente a continuación.

15

### Ejemplo 1

(Comparativo)

20

Se produjeron fibras de alginato de calcio mediante eyección a 12 m/min de una disolución acuosa al 5,5% p/p de alginato de sodio (de Pronova Biopolymer, que tiene un contenido en ácido gulurónico del 70%) a través de una hilera que tiene 40.000 agujeros de 70  $\mu\text{m}$  de diámetro cada uno en un baño de coagulación de cloruro de calcio dihidratado (1,5% p/p) y se lavaron las fibras resultantes con acetona y se secaron. Se observaron las fibras bajo un microscopio electrónico de barrido (Hitachi modelo S510) y se encontró que eran cilíndricas, lisas, de aproximadamente 10-20  $\mu\text{m}$  de diámetro, con pocas características topográficas superficiales destacadas (véase la figura 1). Entonces se evaluaron las propiedades de adhesión celular de las fibras usando células de fibroblastos de ratón L929 según el método explicado de manera resumida anteriormente. No se observó unión celular a las fibras en el plazo de 2 horas, tiempo durante el cual las fibras formaron un gel y luego se desintegró.

25

30

### Ejemplo 2

Se preparó una mezcla de disolución acuosa al 5,5% p/p de alginato de sodio (tal como en el ejemplo 1) con plasma sanguíneo bovino mezclando los componentes en una razón de 3:2. Entonces se usó esta mezcla para producir fibras en el laboratorio mediante eyección a partir de una jeringa de insulina de 1 ml a través de una aguja de un diámetro externo de 35  $\mu\text{m}$  en un baño de coagulación de cloruro de calcio dihidratado (1,5% p/p) y se lavaron las fibras resultantes en acetona y se secaron. Se observaron las fibras bajo el microscopio electrónico de barrido (véase la figura 2a). Entonces se evaluaron las propiedades de adhesión celular de las fibras usando células de fibroblastos de ratón L929 según el método explicado de manera resumida anteriormente. En el plazo de 48 horas, las células habían crecido hasta la confluencia sobre las fibras (véase la figura 2b), una mejora considerable del resultado observado en el ejemplo 1.

35

40

### Ejemplo 3

(Comparativo)

Se preparó una disolución al 3% p/p de quitosano, que tiene un grado de desacetilación >70% (disponible de Nigerian Fisheries), en ácido acético glacial acuoso al 2%.

Se prepararon fibras de quitosano en el laboratorio eyectando la disolución de quitosano a partir de una jeringa de insulina de 1 ml a través de una aguja de 35  $\mu\text{m}$  de diámetro externo en un baño de coagulación de hidróxido de sodio (5% p/p) y se secaron las fibras resultantes. Se observaron las fibras bajo el microscopio electrónico de barrido, se encontró que las fibras tenían un diámetro de 40-100  $\mu\text{m}$  y que eran lisas, cilíndricas con pocas características topográficas superficiales destacadas. Entonces se evaluaron las propiedades de adhesión celular de las fibras usando células de fibroblastos de ratón L929 según el método explicado de manera resumida anteriormente. Tras 48 horas, se encontró que varias células se adherían a las fibras pero no resultó evidente ninguna prueba de alineamiento y alargamiento celular (véase la figura 3).

50

55

### Ejemplo 4

60

Se prepararon fibras de quitosano en el laboratorio eyectando una disolución de quitosano (tal como se especificó en el ejemplo 3) a partir de una jeringa de insulina de 1 ml a través de una aguja de 35  $\mu\text{m}$  de diámetro externo en un baño de coagulación de plasma sanguíneo bovino enriquecido (aislado tal como se describió anteriormente) y se lavaron las fibras resultantes con acetona y se secaron. Entonces se evaluaron las propiedades de adhesión celular de las fibras usando células de fibroblastos de ratón L929 según el método explicado de manera resumida anteriormente. En el plazo de 48 horas, las células habían crecido hasta la confluencia (tal como se observa en la figura 4) sobre las fibras, un grado mucho mayor de unión celular que el observado para fibras coaguladas en hidróxido de sodio (en comparación con el ejemplo 3).

65

## ES 2 315 223 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Sustrato para crecimiento celular que comprende un polisacárido y una proteína de adhesión celular proporcionada en la superficie del sustrato y asociada con el mismo mediante puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o atrapamiento físico.
- 10 2. Sustrato según la reivindicación 1, que comprende una capa basal de polisacárido que tiene una capa superficial que incorpora la proteína de adhesión celular.
- 15 3. Sustrato según la reivindicación 2, en el que la capa basal de polisacárido tiene un espesor superior al 60% del espesor combinado de la capa basal de polisacárido y la capa de proteína de adhesión celular.
- 20 4. Sustrato según la reivindicación 3, en el que la capa basal de polisacárido tiene un espesor superior al 80% del espesor combinado de la capa basal de polisacárido y la capa de proteína de adhesión celular.
- 25 5. Sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que la capa de proteína de adhesión celular es solidaria con la capa basal de polisacárido.
- 30 6. Sustrato según la reivindicación 5, en el que la capa de la proteína de adhesión celular tiene un espesor de 1-20  $\mu\text{m}$ .
- 35 7. Sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que la capa de la proteína de adhesión celular es una capa adsorbida a la superficie.
- 40 8. Sustrato según la reivindicación 7, en el que la capa de la proteína de adhesión celular tiene 3-5 moléculas de profundidad.
- 45 9. Sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que la capa basal de polisacárido comprende al menos el 80% en peso de polisacárido.
- 50 10. Sustrato según la reivindicación 9, en el que la capa basal de polisacárido comprende al menos el 90% en peso de polisacárido.
- 55 11. Sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que la capa superficial de la proteína de adhesión celular comprende al menos el 80% en peso de proteína de adhesión celular.
- 60 12. Sustrato según la reivindicación 11, en el que la capa superficial de la proteína de adhesión celular comprende al menos el 90% en peso de proteína de adhesión celular.
- 65 13. Sustrato según la reivindicación 12, en el que la capa superficial de la proteína de adhesión celular comprende del 95 al 100% en peso de proteína de adhesión celular.
- 70 14. Sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, en el que la capa de proteína de adhesión celular es una capa discontinua.
- 75 15. Sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14, en el que la capa de polisacárido incorpora un principio activo seleccionado de un fármaco, factor de crecimiento o agente quimiotáctico.
- 80 16. Sustrato según la reivindicación 15, en el que el principio activo está encapsulado.
- 85 17. Sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que el polisacárido se selecciona de alginatos, quitosano, almidones catiónicos, derivados catiónicos de otros hidrocoloides, pectina baja en metoxilo, carragenanos, condroitina sulfato, ácido hialurónico, carboximetilcelulosa, carboximetilalmidón, carboximetilguar, celulosa sulfato, dextran sulfato, goma gellan, goma xantana y derivados aniónicos de otros hidrocoloides.
- 90 18. Sustrato según la reivindicación 17, en el que el polisacárido es un alginato.
- 95 19. Sustrato según la reivindicación 18, en el que el alginato tiene un contenido en ácido gulurónico (G) de al menos el 35% en peso y un contenido en ácido manurónico (M) de como máximo el 65% en peso.
- 100 20. Sustrato según la reivindicación 19, en el que el polisacárido tiene un contenido en G del 35-70% en peso y un contenido en M del 65-30% en peso.
- 105 21. Sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en el que el alginato está reticulado con cationes divalentes.
- 110 22. Sustrato según la reivindicación 21, en el que los cationes divalentes son iones calcio.

## ES 2 315 223 T3

23. Sustrato según la reivindicación 22, en el que la proteína de adhesión celular se estabiliza mediante puentes de ión calcio.
24. Sustrato según la reivindicación 17, en el que el polisacárido es quitosano.
25. Sustrato según la reivindicación 24, en el que el quitosano comprende al menos el 70% de quitina desacetilada.
26. Sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en el que la proteína de adhesión celular está presente en el plasma sanguíneo.
27. Sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en el que la proteína de adhesión celular incorpora el sitio de unión RGD.
28. Sustrato según la reivindicación 27, en el que la proteína de adhesión celular es fibronectina, vitronectina o proteína de von Willebrand.
29. Sustrato según la reivindicación 28, en el que la proteína de adhesión celular es fibronectina.
30. Sustrato para crecimiento celular que comprende un polisacárido y un componente del plasma sanguíneo proporcionado en la superficie del sustrato y asociado de manera no covalente con el mismo mediante puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o atrapamiento físico.
31. Sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30 en forma de una fibra.
32. Sustrato según la reivindicación 31, en el que la fibra tiene un diámetro de 10-1000  $\mu\text{m}$ .
33. Sustrato según la reivindicación 32, en el que la fibra tiene un diámetro de 40-150  $\mu\text{m}$ .
34. Sustrato según la reivindicación 33, en el que la fibra tiene un diámetro de 40-100  $\mu\text{m}$ .
35. Sustrato según la reivindicación 34, en el que la fibra tiene un diámetro de 50-80  $\mu\text{m}$ .
36. Sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, que está en forma de una lámina o película.
37. Sustrato según la reivindicación 36, que tiene un espesor de 2-2000  $\mu\text{m}$ .
38. Sustrato según la reivindicación 37, que tiene un espesor de 10-100  $\mu\text{m}$ .
39. Sustrato según la reivindicación 37, que tiene un espesor de 200-1000  $\mu\text{m}$ .
40. Sustrato según la reivindicación 37, que tiene un espesor de 500-2000  $\mu\text{m}$ .
41. Montaje de fibras según una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 35.
42. Montaje según la reivindicación 41, en forma de una matriz al azar, una matriz orientada con fibras que tienen algo de alineamiento relativo, una estructura tricostada, una estructura trenzada, una estructura empaquetada o una cinta cardada.
43. Montaje que comprende una pluralidad de fibras según una cualquiera de las reivindicaciones 31 ó 35, en el que las fibras están dispuestas paralelas entre sí.
44. Montaje que comprende una pluralidad de fibras según una cualquiera de las reivindicaciones 31 ó 34, en el que las fibras están dispuestas aleatoriamente.
45. Montaje según la reivindicación 43 ó 44, en el que las fibras se proporcionan en un soporte en forma de una lámina o película.
46. Montaje según la reivindicación 45, en el que las fibras se proporcionan en una película de alta tasa de transmisión de vapor de humedad.
47. Montaje según la reivindicación 41, en el que dichas fibras se proporcionan en una matriz de un gel amorfo.
48. Método para producir un sustrato de crecimiento celular que comprende extraer una disolución que contiene polisacárido disuelto y proteína de adhesión celular, estando presente el polisacárido en una cantidad mayor que la proteína de adhesión celular, en un baño de coagulación de manera que precipita un sustrato compuesto de una capa basal de un polisacárido y una capa superficial de proteína de adhesión celular asociada con la misma mediante puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o atrapamiento físico.

## ES 2 315 223 T3

49. Método según la reivindicación 48, en el que el sustrato se precipita en un baño que contiene cationes divalentes.

50. Método según la reivindicación 49, en el que los cationes divalentes son iones calcio.

5 51. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 48 a 50, en el que la disolución que va a extraerse comprende, basándose en el peso total del polisacárido y la proteína de adhesión celular, el 60-99% en peso del polisacárido y el 1-40% en peso de la proteína de adhesión celular.

10 52. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 48 a 51, en el que el polisacárido disuelto es alginato de sodio.

53. Método según la reivindicación 52, en el que el alginato de sodio tiene un contenido en G del 35-70% en peso y un contenido en M del 65-35% en peso.

15 54. Método según la reivindicación 52 ó 53, en el que el alginato de sodio tiene una viscosidad para una disolución al 1% en agua de 30-300 cP.

20 55. Método según la reivindicación 54, en el que el alginato de sodio tiene una viscosidad de una disolución al 1% en agua de 40-100 cP.

25 56. Método para producir un sustrato de crecimiento celular que comprende aplicar a la superficie de una capa preformada de un polisacárido una capa superficial de una proteína de adhesión celular o componente del plasma sanguíneo de modo que dicha proteína de adhesión celular o componente del plasma sanguíneo se asocie con el polisacárido mediante puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o atrapamiento físico.

30 57. Método según la reivindicación 56, en el que el método de aplicación es mediante inmersión de la capa de polisacárido en un baño de recubrimiento que contiene la proteína de adhesión celular o componente del plasma sanguíneo.

35 58. Método según la reivindicación 56, en el que el polisacárido se precipita en un baño de coagulación que contiene la proteína de adhesión celular.

59. Método según la reivindicación 56, en el que el método de aplicación es mediante pulverización.

40 60. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 56 a 59, efectuado con estabilización de la capa de proteína.

45 61. Método de cultivo celular *in vitro* que comprende efectuar el crecimiento de las células en un sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40 o montaje según una cualquiera de las reivindicaciones 41 a 47.

50 62. Sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40 o montaje según una cualquiera de las reivindicaciones 41 a 47, para su uso en un tratamiento.

45

50

55

60

65

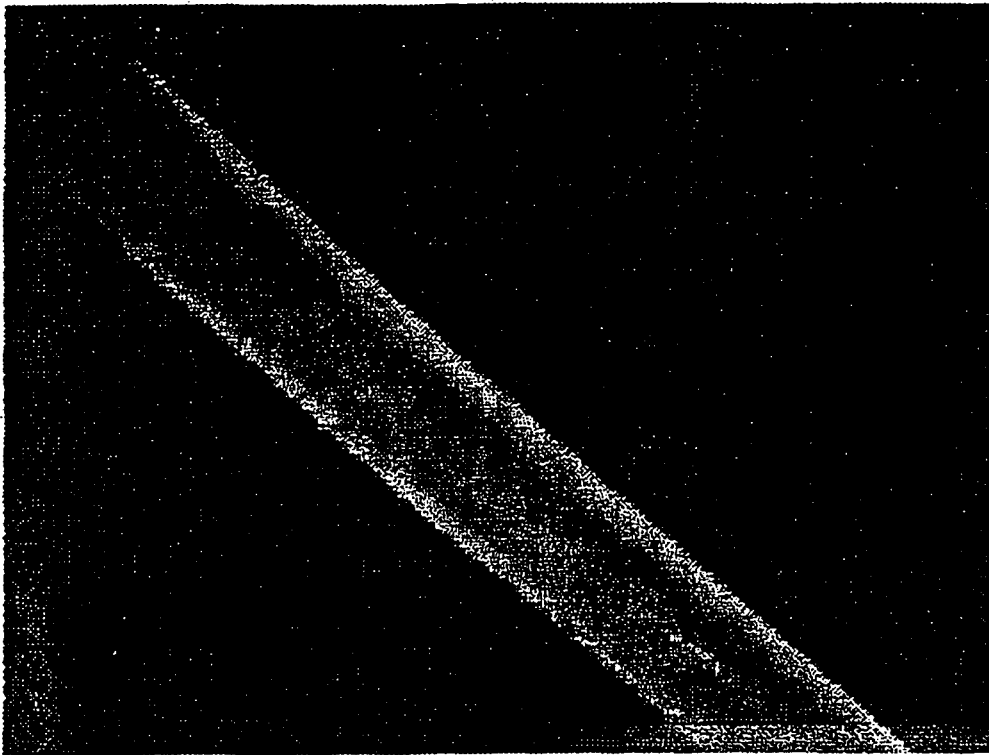


FIG. 1

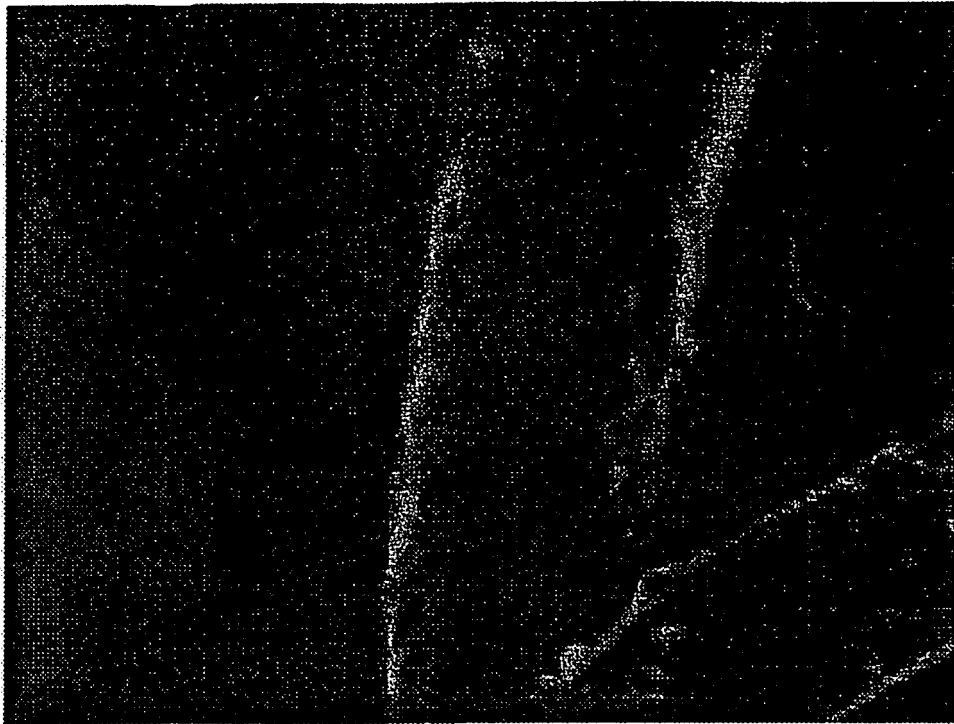


FIG. 2a

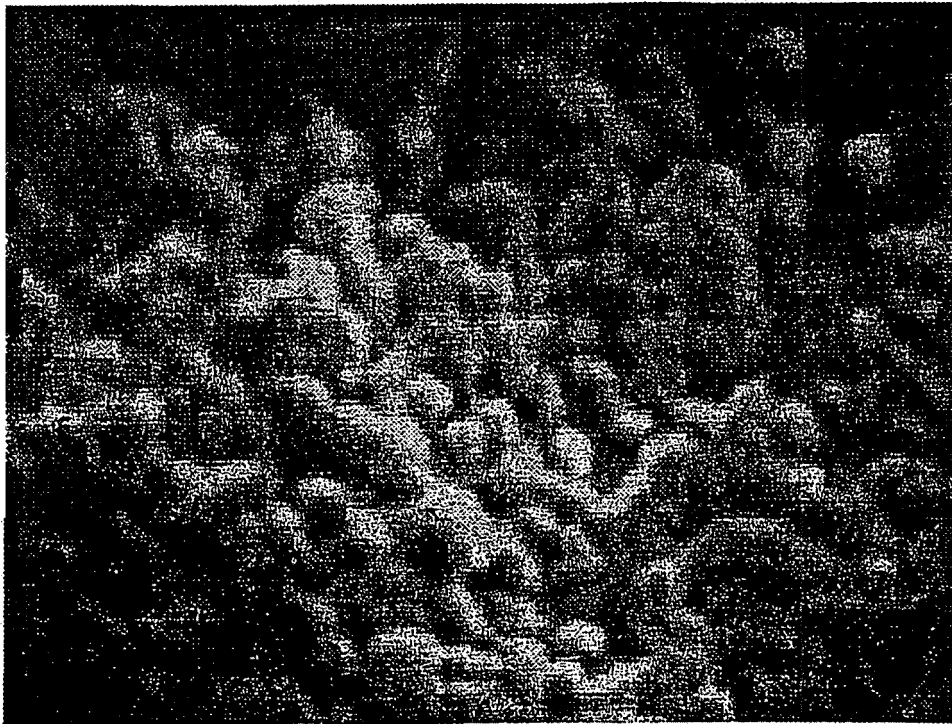


FIG. 2b

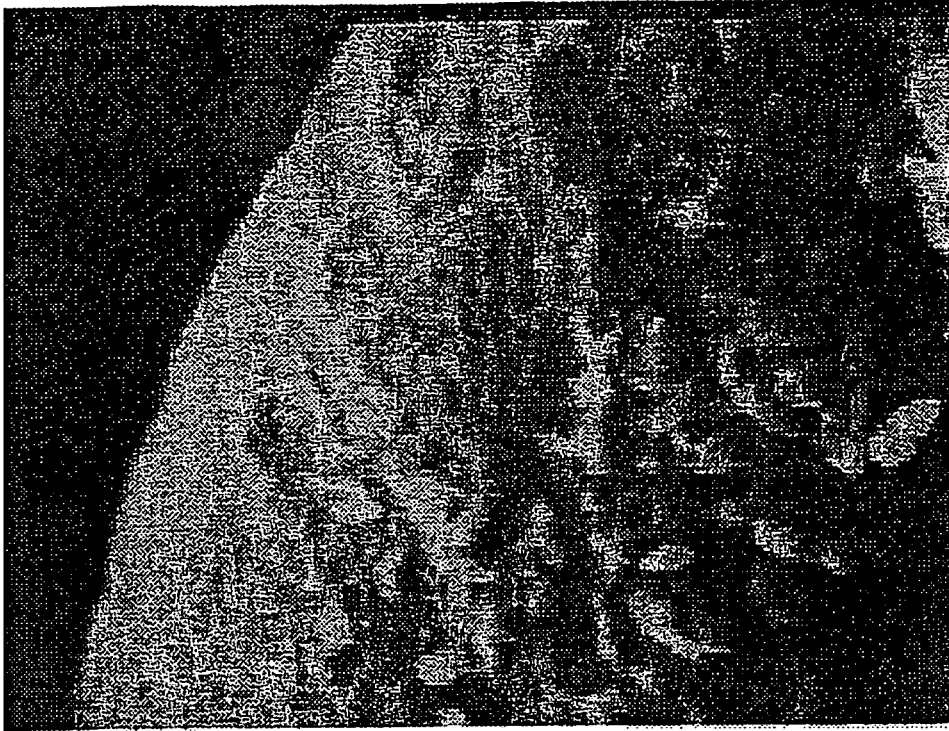


FIG. 3

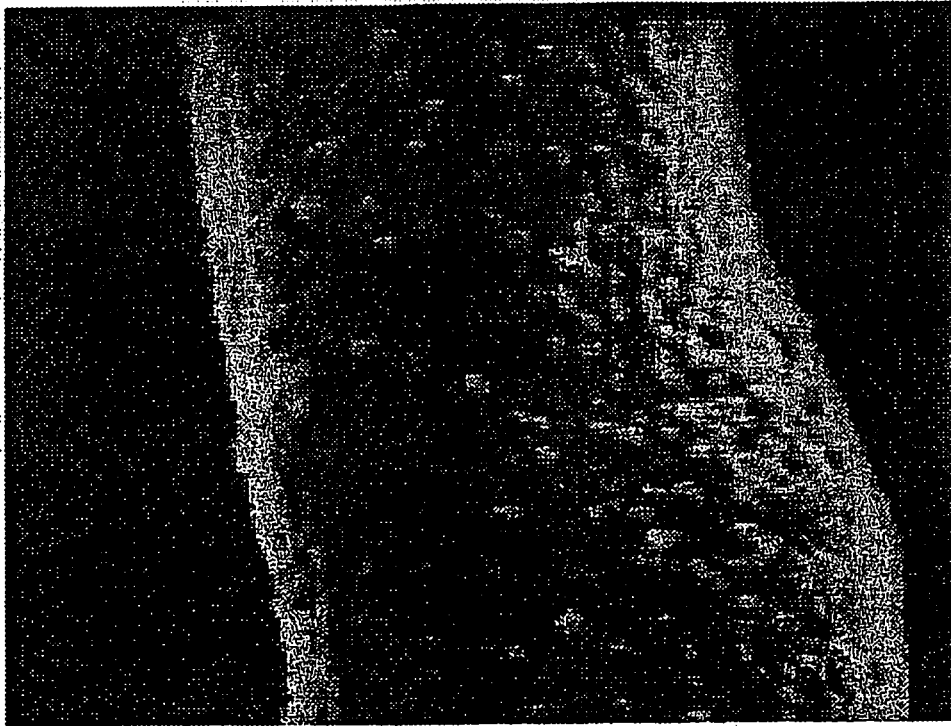


FIG. 4