

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 015 612**

51 Int. Cl.:

A61L 27/26

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2015** **PCT/US2015/045494**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2016** **WO16025945**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2015** **E 15831684 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2025** **EP 3180042**

54 Título: **Material compuesto para la restauración de tejidos**

30 Prioridad:

15.08.2014 US 201462038030 P

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

06.05.2025

73 Titular/es:

**THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.00%)
Technology Ventures, 3400 N. Charles Street,
Clark 106
Baltimore, MD 21218, US**

72 Inventor/es:

**JIANG, XUESONG;
REDDY, SASHANK;
BRANDACHER, GERALD;
MAO, HAI-QUAN;
SACKS, JUSTIN;
LI, XIAOWEI;
FENG, KEVIN y
MARTIN, RUSSELL**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 3 015 612 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

Material compuesto para la restauración de tejidos

Antecedentes**1. Campo**

- 5 La presente divulgación se refiere a materiales compuestos y procedimientos que restauran el volumen de tejido blando perdido a la vez que promueven la regeneración del tejido blando.

2. Descripción de las técnicas relacionadas

10 Los defectos de los tejidos blandos resultantes de traumatismos, resecciones oncológicas o malformaciones congénitas son difíciles de tratar por medios convencionales. Las terapias actuales, incluyendo los reordenamientos tisulares o la transferencia de tejidos, provocan defectos en la zona donante. Otras terapias, tales como los implantes protésicos, provocan fibrosis y encapsulamiento. Las estrategias existentes para promover el crecimiento interior tisular también son inadecuadas para el tratamiento de los defectos de los tejidos blandos. Las matrices acelulares actuales dan lugar a láminas de tejido planas y fibróticas, en lugar del tejido blando y tridimensional necesario para las reconstrucciones ideales. Por último, aunque los injertos de 15 grasa pueden restaurar defectos de los tejidos blandos, su uso generalizado se ve obstaculizado por la supervivencia variable de los injertos y los volúmenes limitados de restauración. Un enfoque ideal para la reconstrucción de tejidos blandos fomentaría la regeneración de tejidos blandos tal como el tejido adiposo in vivo, seguida de la implantación de los tejidos para promover la regeneración. Sin embargo, el recrecimiento del tejido adiposo requiere una matriz adecuada para que las células se adhieran, migren, proliferen, se 20 diferencien y se organicen en un nuevo tejido. En el lugar de la reparación falta gran parte de la matriz extracelular (ECM) nativa. Por lo tanto, recrear una matriz sintética que no sólo restaure inmediatamente el volumen de tejido perdido, sino que también reacondicione el microentorno, favorezca la infiltración de células huésped y fomente la regeneración del tejido blando, se convierte en una tarea esencial a la hora de reparar defectos de tejido blando mediante la reconstrucción basada en tejido adiposo.

25 Los hidrogeles ofrecen varias ventajas como material de relleno para la reconstrucción de tejidos blandos. Sin embargo, para conseguir propiedades mecánicas suficientes, suelen requerirse densidades de reticulación más elevadas. En estas condiciones, sin embargo, las células del tejido huésped (por ejemplo, progenitores adipocitarios y progenitores endoteliales) no son capaces de penetrar y crecer en los andamiajes. En el caso de los hidrogeles degradables, la cicatrización y la formación de tejido fibroso son típicas porque el crecimiento 30 interior del tejido huésped se produce demasiado lentamente, o al menos a un ritmo más lento que la absorción del material de fibra.

Recientemente, se han desarrollado nanofibras funcionalizadas que sirven como imitadores de ECM para apoyar diversas actividades celulares. Los poli- α -ésteres sintéticos biodegradables conformes con la FDA, tal como la policaprolactona (PCL) o la poli(láctida-co-glicolida) (PLGA), pueden utilizarse para generar nanofibras 35 mediante un procedimiento conocido como electrohilado. Las suturas e implantes biodegradables preparados a partir de estos polímeros se han utilizado ampliamente en clínica debido a su excelente historial de biocompatibilidad. Se han desarrollado diversas nanofibras de distintos diámetros y topografías para aplicaciones de ingeniería de células madre. Sin embargo, estas nanofibras no ofrecen estructuras macroscópicas, lo que dificulta su uso como andamiajes tridimensionales.

40 Dados los diversos problemas asociados con tales procedimientos y sistemas convencionales, existe todavía una necesidad en la técnica de soluciones mejoradas para la curación de defectos de tejidos blandos. La presente divulgación proporciona una solución para esta necesidad que supera los diversos problemas observados en la técnica.

45 Joseph W. Freeman et al., "Evaluation of a hydrogel-fiber composite for ACL tissue engineering", Journal of Biomechanics, Pergamon Press, New York, NY, EE. UU., Vol. 44, N° 4, 27 de octubre de 2010, páginas 694-699 divulga un novedoso andamiaje de hidrogel-fibra como opción potencial para la sustitución del ligamento cruzado anterior (ACL). Se trata de un andamiaje moldeado compuesto por fibras de PLLA dentro de un hidrogel de PEGDA.

50 El documento US 2012/040461 divulga matrices de material compuesto y procedimientos para formar las matrices. Las matrices de material compuesto incluyen una red polimérica formadora de hidrogeles y una red de fibras electrohiladas incrustadas dentro de la red polimérica.

El documento WO 2013/071107 divulga composiciones inyectables que comprenden una pluralidad de partículas de fibroína de seda que pueden retener su volumen original dentro del tejido durante un periodo de tiempo.

55 El documento US 2004/0197367 divulga un andamiaje implantable, biocompatible que contiene una matriz polimérica biocompatible, porosa, una estera fibrosa biocompatible, porosa, encapsulada por y dispuesta dentro

de dicha matriz polimérica, y una pluralidad de células de mamífero sembradas dentro de dicho andamiaje tisular.

El documento WO 2013/172788 divulga gelatina unida covalentemente con dialdehído de dextrano y que contiene adicionalmente fibra de albúmina. Dicha composición se inyectará con una aguja de calibre 21.

- 5 El documento WO 2009/042829 divulga fibras de hidrogel que tienen diámetro pequeño (nanómetros a micrómetros), preferentemente de longitud de fibra corta (nanómetros a milímetros) y que comprenden un polímero carboxifuncionalizado reticulado y un polímero hioxifuncionalizado, tales como ácido poliacrílico (PAA) y un polisacárido, tal como dextrano, respectivamente.

- 10 Jeannine Coburn et al., "Biomimetics of the Extracellular Matrix: An Integrated Three-Dimensional Fiber-Hydrogel Composite for Cartilage Tissue Engineering", Smart Structures and Systems, Vol. 7, No. 3, 25 de marzo de 2011, páginas 213-222 divulga una novedosa técnica de electrohilado para diseñar un material compuesto tridimensional de fibra-hidrogel que imita la estructura nativa de la ECM, es inyectable y tiene dimensiones prácticas a macroescala para defectos tisulares clínicamente relevantes. En un sistema modelo de ingeniería tisular del cartílago articular, los materiales compuestos de fibra-hidrogel mejoraron la respuesta biológica de las células madre adultas, con una estimulación mecánica dinámica que dio lugar a niveles casi nativos de matriz extracelular.

Sumario

- 20 La invención se basa, al menos en parte, en la identificación de complejos de andamiaje que tienen componentes de fibra polimérica que poseen propiedades mejoradas (*por ejemplo*, cualidades mejoradas para la reconstrucción de tejido blando, como se detalla más *infra*).

- 25 En un aspecto, la invención proporciona un complejo de andamiaje isotrópico como una formulación inyectable que comprende una fibra polimérica o fragmentos de la misma que tienen un diámetro medio de 100nm a 8000nm unidos covalentemente a un material de hidrogel, en la que la fibra polimérica o fragmentos de la misma comprenden una policaprolactona, y el material de hidrogel comprende ácido hialurónico, en la que el material de hidrogel es capaz de formar una red funcional y en la que la proporción de fibra polimérica a material de hidrogel es de 1:10 a 10:1 en base a la masa del componente, o de 1 a 50mg/mL en base a la concentración, en el que el complejo de andamiaje comprende una pluralidad de poros presentes en o dentro de una superficie del complejo de andamiaje, en el que los poros están presentes en una concentración de al menos unos 50 poros por cm² de la superficie, y en el que al menos el 80% de los poros tienen un diámetro medio de poro en la superficie de al menos unas 5 micrómetros y en el que la fibra polimérica o fragmentos de la misma están uniformemente dispersos.

En ciertas realizaciones, la fibra polimérica incluye una fibra de policaprolactona electrohilada. Opcionalmente, la fibra polimérica incluye otro material polimérico sintético que comprende un poli(ácido láctico-co-glicólico), un ácido poliláctico, y/o una policaprolactona, o una combinación de los mismos.

- 35 En una realización, el complejo está formulado para ser sustancialmente biocompatible. Opcionalmente, la fibra polimérica incluye además un material polimérico biológico que incluye una seda, un colágeno, un quitosano, y/o una combinación de los mismos.

- 40 En una realización, el material de hidrogel incluye ácido hialurónico. Opcionalmente, el material de hidrogel incluye además un material de hidrogel que incluye un poli(etilenglicol), un colágeno, un dextrano, una elastina, un alginato, una fibrina, un alginato, un ácido hialurónico, un poli(alcohol vinílico), un derivado de los mismos, o una combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, el material de hidrogel incluye una matriz extracelular de tejido procesado.

En una realización, la matriz extracelular tisular procesada es derivable de un tejido adiposo.

En otra realización, el complejo de andamiaje incluye una fibra de policaprolactona no tejida.

- 45 En una realización, el material de hidrogel incluye un ácido hialurónico que cubre sustancialmente al menos una porción de una superficie exterior de la fibra de policaprolactona.

En ciertas realizaciones, el material de hidrogel está unido a la superficie exterior de la fibra polimérica.

En otra realización, el complejo de andamiaje incluye además una fracción reticulante presente en una cantidad eficaz para introducir unión entre la fibra polimérica y el material de hidrogel.

- 50 En realizaciones adicionales, el complejo de andamiaje incluye además una fracción de reticulación presente en una cantidad eficaz para inducir la reticulación entre la fibra de policaprolactona y el ácido hialurónico.

Opcionalmente, el complejo de andamiaje es para su uso en un procedimiento de promoción del crecimiento tisular y la infiltración celular cuando se implanta en un tejido objetivo presente en un sujeto humano.

En ciertas realizaciones, el complejo de andamiaje es sustancialmente biodegradable cuando se implanta en un tejido humano.

En una realización, el complejo de andamiaje es sustancialmente no biodegradable cuando se implanta en un tejido humano.

- 5 En otra realización, el complejo de andamiaje incluye además un agente terapéutico seleccionado de una célula, una molécula pequeña, un ácido nucleico y un polipéptido.

Se describe además un biomaterial implantable que incluye un complejo de andamiaje de la invención.

El material implantable puede ser sustancialmente acelular y/o está sustancialmente libre de polipéptidos.

El material implantable puede formularse para su administración mediante inyección.

- 10 El material implantable puede formularse para administración subdérmica.

Otro aspecto de la invención proporciona un dispositivo médico para retener la forma del tejido en un sujeto sometido a un procedimiento quirúrgico, que incluye el complejo de andamiaje y/o el material implantable de la invención en una cantidad eficaz para proporcionar la retención de una forma de tejido cuando se administra al sujeto.

- 15 Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento para preparar un implante para reparación de tejido o cartílago siendo un complejo de andamiaje isotrópico de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento los pasos de: proporcionar un andamiaje acelular tridimensional que comprende fibras poliméricas orientadas para producir una pluralidad de poros, en el que al menos una porción de las fibras poliméricas están reticuladas a una red formadora de hidrogel para formar un material compuesto reticulado; y
20 reaccionar o estabilizar el complejo para formar un implante estabilizado preparando así el implante.

Opcionalmente, el tejido incluye un tejido blando.

- Se describe además un complejo de andamiaje para su uso en un procedimiento para resolver un defecto tisular resultante de un traumatismo o intervención quirúrgica, comprendiendo el procedimiento distender el tejido, donde distender el tejido incluye implantar una cantidad eficaz del complejo de andamiaje de la invención
25 en el tejido para así distenderlo.

Se describe además un complejo de andamiaje para su uso en un procedimiento para reducir o revertir un defecto tisular resultante de una enfermedad, trastorno o afección asociada al envejecimiento, comprendiendo el procedimiento distender el tejido incluyendo el tejido, donde distender el tejido incluye implantar una cantidad eficaz de un complejo de andamiaje de la invención en el tejido para distenderlo de ese modo.

- 30 Opcionalmente, el defecto tisular incluye tejido pleural, tejido muscular, piel o una combinación de los mismos.

- Se describe, además, pero sin formar parte de la invención, un material compuesto que incluye un gel y al menos una nanoestructura dispuesta dentro del gel. El gel puede ser hidrogel o cualquier otro gel adecuado. La nanoestructura puede ser una nanofibra o cualquier otra nanoestructura adecuada. La nanoestructura puede unirse covalentemente al gel. La nanoestructura puede estar hecha de policaprolactona (PCL) o de cualquier
35 otro material adecuado.

Se describe, además, pero sin formar parte de la invención, un procedimiento para curar un defecto de tejido blando que comprende aplicar un material compuesto a un defecto de tejido blando, en el que el material compuesto incluye un gel y una nanoestructura dispuesta dentro del gel.

- 40 Además descrito, pero no formando parte de la invención, es un procedimiento para fabricar un material compuesto para su uso en la curación de defectos de tejidos blandos w incluir proporcionar un gel y disponer nanofibras dentro del gel.

Donde sea aplicable o no se deniegue específicamente, se contempla que cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento puede combinarse con cualquier otra u otras realizaciones, aunque las realizaciones se describan bajo diferentes aspectos de la invención.

- 45 Estas y otras realizaciones se divulgan o son obvias a partir de y están comprendidas por, la siguiente Descripción Detallada.

Breve descripción de los dibujos

- La siguiente descripción detallada, dada a modo de ejemplo, pero que no pretende limitar la invención únicamente a las realizaciones específicas descritas, puede entenderse mejor en conjunción con los dibujos
50 adjuntos.

La Fig. 1A ilustra la estructura de una realización de un compuesto de acuerdo con la presente divulgación, mostrando nanoestructuras dispuestas en un gel y, en particular, la unión covalente de la nanoestructura a grupos funcionales en el gel.

5 La Fig. 1B muestra una imagen de microscopio óptico de un material compuesto completamente hinchado como el ilustrado en la Fig. 1;

La Fig. 1C es una imagen del aspecto macroscópico de un material compuesto hidratado como el ilustrado en la Fig. 1;

La Fig. 1D muestra una imagen de micrografía electrónica de barrido (SEM) de un material compuesto deshidratado como el ilustrado en la Fig. 1, que revela la similitud ultraestructural con la ECM;

10 La Fig. 2A representa curvas de tensión-deformación de una realización del material compuesto de la Fig. 1 trazadas frente al hidrogel de HA solo, revelando un módulo elástico mejorado en comparación con el hidrogel a la misma densidad de reticulación;

15 La Fig. 2B representa un ensayo de fatiga que muestra que la realización de un material compuesto de la Fig. 2A conserva un grado similar de robustez de la integridad mecánica en comparación con el hidrogel normal;

Las Figs. 3A y 3B muestran fluorescencia y superposición (Fig. 3A) con imágenes de contraste de fase (Fig. 3B) de ASCs cultivadas en material compuesto de hidrogel de nanofibra-HA durante 4 días;

Las Figs. 3C y 3D muestran fluorescencia y superposición (Fig. 3C) con imágenes de contraste de fase (Fig. 3D) de ASCs cultivadas en hidrogel de HA normal durante 4 días;

20 Las Figs. 4A y 4B muestran una imagen de fluorescencia y superposición (Fig. 4A) con imagen de contraste de fase (Fig. 4B) contrastando ASCs migrando desde esferoides a lo largo de nanofibras alineadas de 650-nm.

La Fig. 5A es una fotografía que muestra el aspecto del material compuesto de nanofibra-hidrogel *in situ* bajo la almohadilla de grasa inguinal de rata;

25 La Fig. 5B muestra imágenes de tinción H&E de secciones de tejidos alrededor del material compuesto recogidas a las 2 semanas de la implantación; y

La Fig. 5C muestra imágenes de tinción H&E de secciones de tejido recogidas de la interfaz material compuesto-tejido a las 4 semanas, mostrando infiltración celular.

30 La Fig. 6A muestra un esquema de síntesis para el material compuesto de hidrogel de fibra de policaprolactona (PCL)-HA.

La Fig. 6B representa una ilustración esquemática de la estructura de material compuesto con unión interfacial entre las fibras de PCL y la red de cadenas de HA.

35 La Fig. 6C representa imágenes ópticas que muestran el aspecto general de un material compuesto de hidrogel de fibra cilíndrica-HA recién preparado (izquierda) y un hidrogel de HA (derecha) con las mismas dimensiones (barra de escala = 5 mm).

La Fig. 6D muestra imágenes ópticas del mismo conjunto de muestras tras la liofilización y rehidratación.

La Fig. 6E muestra imágenes SEM de la sección transversal de un hidrogel de HA (barra de escala = 40 μ m).

40 La Fig. 6F muestra imágenes de SEM de la sección transversal del material compuesto de hidrogel de fibra de PCL-HA (barra de escala = 100 μ m).

La Fig. 6G muestra imágenes SEM de cortes transversales de tejido adiposo nativo descelularizado (barra de escala = 10 μ m).

45 La Fig. 7A muestra el efecto del diámetro de la fibra y la unión interfacial sobre el módulo de compresión de refuerzo del hidrogel de HA. Se prepararon hidrogeles y materiales compuestos de HA a base de 4,5 mg/ml de HA. Los valores de tensión se midieron al 50 % de la deformación. *p < 0,05 (prueba t de Student).

50 La Fig. 7B muestra el efecto del diámetro de la fibra y la unión interfacial sobre el módulo de compresión de refuerzo del hidrogel de PEG. Se prepararon hidrogeles y materiales compuestos de PEG basados en 30 mg/ml de PEGSH y 20 mg/ml de PEGDA, y se utilizaron fibras de PCL de 1,0- μ m

para sintetizar los compuestos de hidrogel de fibra-PEG. Los valores de tensión se midieron al 50 % de la deformación. *p < 0,05 (prueba t de Student).

La Fig. 8A muestra el efecto de la densidad de unión interfacial y el diámetro de la fibra sobre el módulo de almacenamiento de cizallamiento de refuerzo del hidrogel de HA. *p < 0,05 (prueba t de Student).

5 La Fig. 8B muestra el efecto de la densidad de unión interfacial y el diámetro de la fibra en el módulo de almacenamiento de cizallamiento de refuerzo del hidrogel de PEG. Los valores del módulo de almacenamiento de cizallamiento se midieron a una frecuencia de 1 Hz. *p < 0,05 (prueba t de Student).

10 La Fig. 8C muestra el efecto de la densidad de unión interfacial y el diámetro de la fibra sobre el módulo de almacenamiento de cizallamiento de refuerzo del hidrogel de HA. Los valores del módulo de almacenamiento de cizallamiento se midieron a una frecuencia de 1 Hz. *p < 0,05 (prueba t de Student).

15 La Fig. 8D muestra el efecto de la densidad de unión interfacial y el diámetro de la fibra sobre el módulo de almacenamiento de cizallamiento de refuerzo del hidrogel de HA. Los valores del módulo de almacenamiento de cizallamiento se midieron a una frecuencia de 1 Hz. *p < 0,05 (prueba t de Student).

20 La Fig. 9A muestra el efecto de la cantidad de carga de fibra en el módulo de almacenamiento de cizallamiento del hidrogel de HA. El hidrogel de HA y los materiales compuestos se sintetizaron utilizando 10 mg/ml de HA. Los módulos de almacenamiento de cizallamiento se miden a una frecuencia de 1 Hz. Las flechas azules indican las condiciones para ambos materiales compuestos con una relación molar de 1 a 2 de grupos SH a grupos (DA+MAL). *p < 0,05 (prueba t de Student).

25 La Fig. 9B muestra el efecto de la cantidad de carga de fibra en el módulo de almacenamiento de cizallamiento del hidrogel de HA. El hidrogel y materiales compuestos de HA se sintetizaron utilizando 4,5 mg/ml de HA. Los módulos de almacenamiento de cizallamiento se miden a una frecuencia de 1 Hz. Las flechas azules indican las condiciones para ambos materiales compuestos con una relación molar de 1 a 2 de grupos SH a grupos (DA+MAL). *p < 0,05 (prueba t de Student).

La Fig. 10A representa la resistencia mecánica del material compuesto de hidrogel de fibra-HA a diferentes frecuencias. El módulo de almacenamiento de cizallamiento del hidrogel de HA y de los materiales compuestos se mide frente a diferentes frecuencias de carga de cizallamiento.

30 La Fig. 10B representa la resistencia mecánica del material compuesto de hidrogel de fibra-HA bajo diferentes rehidrataciones. Comparación de la tensión de compresión de los materiales compuestos antes y después de la rehidratación (deformación = 40%).

La Fig. 10C representa la resistencia mecánica del material compuesto de hidrogel de fibra-HA bajo diferentes cargas cíclicas. Se miden las tensiones de compresión de un hidrogel de HA y del material compuesto correspondiente frente a una carga cíclica (deformación = 25%).

35 La Fig. 11A muestra la capacidad de migración de las células madre derivadas de tejido adiposo humano (hASCs) en hidrogel de HA en el día 27. El hidrogel de HA de control y los dos materiales compuestos se seleccionaron para que presentaran módulos de compresión similares de alrededor de 1,9 kPa. La F-actina y los núcleos de las hASC se tiñeron con Alexa Fluor® 568 faloidina (rojo) y DAPI (azul), respectivamente. Las nanofibras se marcaron con Alexa Fluor® 647 (blanco). Barras de escala = 100 µm.

40 La Fig. 11B muestra la capacidad de migración de las células madre derivadas del tejido adiposo humano (hASCs) en el material compuesto de hidrogel de nanofibras-HA el día 27. El hidrogel de HA de control y los dos materiales compuestos se seleccionaron para que presentaran módulos de compresión similares de alrededor de 1,9 kPa. La F-actina y los núcleos de las hASC se tiñeron con Alexa Fluor® 568 faloidina (rojo) y DAPI (azul), respectivamente. Las nanofibras se marcaron con Alexa Fluor® 647 (blanco). Barras de escala = 100 µm.

45 La Fig. 11C muestra la capacidad de migración de las células madre derivadas del tejido adiposo humano (hASCs) en el material compuesto de hidrogel RGD-nanofibras-HA el día 27. El hidrogel de HA de control y los dos materiales compuestos se seleccionaron para que presentaran módulos de compresión similares de alrededor de 1,9 kPa. La F-actina y los núcleos de las hASC se tiñeron con Alexa Fluor® 568 faloidina (rojo) y DAPI (azul), respectivamente. Las nanofibras se marcaron con Alexa Fluor® 647 (blanco). Barras de escala = 100 µm.

50 La Fig. 11D muestra la capacidad de migración de las células madre derivadas del tejido adiposo humano (hASCs) en el material compuesto de hidrogel RGD-nanofibras-HA el día 27. El hidrogel de HA de control y los dos materiales compuestos se seleccionaron para que presentaran módulos de compresión similares de alrededor de 1,9 kPa. Las flechas amarillas en (d) y (e) indican células

adheridas a fibras o grupos de fibras. La F-actina y los núcleos de las hASC se tiñeron con Alexa Fluor® 568 faloidina (rojo) y DAPI (azul), respectivamente. Las nanofibras se marcaron con Alexa Fluor® 647 (blanco). Barras de escala = 20 μ m.

La Fig. 11E muestra la capacidad de migración de las células madre derivadas del tejido adiposo humano (hASCs) en el material compuesto de hidrogel de nanofibras-HA el día 27. El hidrogel de HA de control y los dos materiales compuestos se seleccionaron para que presentaran módulos de compresión similares de alrededor de 1,9 kPa. Las flechas amarillas en (d) y (e) indican células adheridas a fibras o grupos de fibras. La F-actina y los núcleos de las hASC se tiñeron con Alexa Fluor® 568 faloidina (rojo) y DAPI (azul), respectivamente. Las nanofibras se marcaron con Alexa Fluor® 647 (blanco). Barras de escala = 20 μ m.

La Fig. 11F muestra la capacidad de migración de las células madre derivadas del tejido adiposo humano (hASCs). Se muestra una ilustración esquemática de los esferoides de hASCs en la estructura de material compuesto con unión interfacial entre las fibras de PCL y la red de cadenas de HA.

La Fig. 12A muestra la regeneración tisular mediada por el material compuesto de hidrogel fibra-HA implantado y el hidrogel de HA en 30 días. Se muestran imágenes macroscópicas del material compuesto antes (recuadros) y después de su implantación bajo la almohadilla de grasa inguinal (barra de escala = 2 mm). Las estrellas blancas indican las matrices implantadas.

La Fig. 12B muestra la regeneración tisular mediada por el material compuesto de hidrogel de fibra-HA implantado y el hidrogel de HA en 30 días. Se muestran imágenes macroscópicas del hidrogel de HA antes (recuadros) y después de su implantación bajo la almohadilla de grasa inguinal (barra de escala = 2 mm). Las estrellas blancas indican las matrices implantadas.

La Fig. 12C muestra la regeneración tisular mediada por el material compuesto de hidrogel de fibra-HA implantado y el hidrogel de HA en 30 días. Se muestran imágenes teñidas con H&E y tricómico de Masson de (i) tejido adiposo nativo, (ii) tejido cicatrizado tras cirugía simulada, (iii, v) tejido implantado con hidrogel de fibra-HA y (iv, vi) tejido implantado con hidrogel de HA en los días 14 y 30. En las imágenes, H = hidrogel de HA, C = material compuesto de hidrogel de fibra-HA, B = tejido adiposo marrón, flecha amarilla = vaso sanguíneo. Barra de escala = 200 μ m.

La Fig. 12D muestra la regeneración tisular mediada por el material compuesto de hidrogel de fibra-HA implantado y el hidrogel de HA en 30 días. Se muestran imágenes teñidas con H&E y tricómico de Masson de (i) tejido adiposo nativo, (ii) tejido cicatrizado tras cirugía simulada, (iii, v) tejido implantado con hidrogel de fibra-HA y (iv, vi) tejido implantado con hidrogel de HA en los días 14 y 30. La tinción azul de la tinción tricromática de Masson indica el colágeno total en el tejido examinado. En las imágenes, H = hidrogel de HA, C = material compuesto de hidrogel de fibra-HA, B = tejido adiposo marrón, flecha amarilla = vaso sanguíneo. Barra de escala = 200 μ m.

La Fig. 13A representa un diagrama esquemático de la preparación de fibras modificadas superficialmente con MAL mediante el procedimiento de injerto con PAA.

La Fig. 13B muestra las densidades medias de los grupos carboxilo en las fibras tras el injerto de PAA con 3 y 10 % (v/v) de ácido acrílico (* $p < 0,05$, $n = 6$).

La Fig. 14 muestra los módulos de almacenamiento por cizallamiento del hidrogel de HA con diferentes proporciones molares de SH y DA preparado con 4,5 mg/ml de HA-SH.

La Fig. 15A muestra los módulos de almacenamiento de cizallamiento de los materiales compuestos de hidrogel de fibra-HA preparados con distintas cantidades de fibras. El diámetro medio de las fibras es de 686 nm, la densidad superficial de MAL en las fibras era de 100 nmol/mg, y los materiales compuestos se prepararon con 4,5 mg/ml de HA-SH y 5 mg/ml de PEGDA. Las flechas azules indican 1 a 2 de relación molar de grupos SH a grupos (DA+MAL). * $p < 0,05$ ($n = 3$).

La Fig. 15B muestra los módulos de almacenamiento de cizallamiento de los materiales compuestos de hidrogel de fibra-PEG con diversas cantidades de fibras cargadas. * $p < 0,05$ ($n = 3$).

La Fig. 16 muestra el tamaño medio de los poros del hidrogel de HA y del material compuesto de hidrogel de nanofibras-HA, calculado a partir de las imágenes SEM de su sección transversal (* $p < 0,05$).

La Fig. 17A muestra la infiltración celular y el crecimiento tisular a través del material compuesto de hidrogel de fibra-HA en el día 14. Los tejidos seccionados se tiñeron con H&E para determinar el colágeno total (azul). Etiquetas: C = material compuesto de hidrogel de fibra-HA, flecha amarilla = vaso sanguíneo. Barra de escala = 50 μ m.

La Fig. 17B muestra la infiltración celular y el crecimiento tisular a través del material compuesto de hidrogel de fibra-HA en el día 14. Los tejidos seccionados se tiñeron con el tricrómico de Masson para determinar el colágeno total (azul). Etiquetas: C = material compuesto de hidrogel de fibra-HA, flecha amarilla = vaso sanguíneo. Barra de escala = 50 μ m.

5 La Fig. 17C muestra la infiltración celular y el crecimiento tisular a través del material compuesto de hidrogel de fibra-HA en el día 30. Los tejidos seccionados se tiñeron con H&E para determinar el colágeno total (azul). Etiquetas: C = material compuesto de hidrogel de fibra-HA, flecha amarilla = vaso sanguíneo. Barra de escala = 50 μ m.

10 La Fig. 17D muestra la infiltración celular y el crecimiento tisular a través del material compuesto de hidrogel de fibra-HA en el día 30. Los tejidos seccionados se tiñeron con el tricrómico de Masson para determinar el colágeno total (azul). Etiquetas: C = material compuesto de hidrogel de fibra-HA, flecha amarilla = vaso sanguíneo. Barra de escala = 50 μ m.

La Fig. 18 muestra imágenes SEM de cortes transversales del tejido adiposo descelularizado (panel superior) y del material compuesto de hidrogel de fibra-HA (panel inferior).

15 La Fig. 19A muestra la capacidad de migración de las hASCs en hidrogeles de HA ($G' = 24,85 \mu 2,92$ Pa) el día 4. El hidrogel de HA se fabricó con 2,5 mg/ml de HA-SH y 5,0 mg/ml de PEGDA. Barra de escala = 100 μ m.

20 La Fig. 19B muestra la capacidad de migración de las hASC en un material compuesto de hidrogel de fibra-HA y 1,0 μ m ($G' = 32,29 \mu 2,16$ Pa) el día 4. Los materiales compuestos se fabricaron con 2,5 mg/ml de HA, 5,0 mg/ml de PEGDA y 10 mg/ml de fibras. Barra de escala = 100 μ m.

La Fig. 19C muestra la capacidad de migración de las hASC en un material compuesto de hidrogel de 286 nm de fibra-HA ($G' 39,56 \mu 1,26$ Pa) el día 4. Los materiales compuestos se fabricaron con 2,5 mg/ml de HA, 5,0 mg/ml de PEGDA y 10 mg/ml de fibras. Barra de escala = 100 μ m.

25 La Fig. 20A muestra una formulación inyectable. El material compuesto de fibra-hidrogel puede formularse para aplicaciones inyectables.

La Fig. 20B muestra que el material compuesto inyectable es estable inmediatamente después de la inyección.

La Fig. 20C muestra que el material compuesto inyectable permanece no dispersivo en agua con retención de forma y volumen.

30 La Figura 20D muestra la infiltración celular y el crecimiento tisular a través del material compuesto de hidrogel de fibra-HA inyectable en el día 30, mostrando una amplia remodelación celular y formación de adipocitos. Los tejidos seccionados se tiñeron con H&E. Etiquetas: c = material compuesto de hidrogel de fibra-HA.

Descripción detallada

35 La presente invención se refiere generalmente a materiales compuestos que comprenden un hidrogel y una nanoestructura para su uso en procedimientos de reconstrucción de tejidos blandos. La invención también se refiere en general a los usos para reparar o reconstruir una lesión de tejido blando utilizando una composición que comprende un hidrogel y una nanoestructura dispuesta en el mismo. La invención en otros aspectos también se relaciona con un procedimiento de fabricar una composición para el uso en la reconstrucción suave del tejido donde la composición comprende un hidrogel y una nanoestructura dispuestos allí.

40 A continuación se proporciona una descripción detallada de la invención para ayudar a los expertos en la técnica a practicar la presente invención. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. La terminología empleada en la descripción de la invención sirve únicamente para describir realizaciones particulares y no pretende ser limitativa de la invención.

Aunque cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento dentro del alcance de las reivindicaciones también se puede utilizar en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen los procedimientos y materiales preferidos.

50 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el significado comúnmente entendido por una persona experta en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a los expertos una definición general de muchos de los términos (a menos que se definan de otra manera en el presente documento) utilizados en esta invención: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5ta Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer

Verlag (1991); y Hale & Marham, the Harper Collins Dictionary of Biology (1991). En general, los procedimientos de los procedimientos de biología molecular descritos o inherentes al presente documento y similares son procedimientos comunes utilizados en la técnica. Estas técnicas estándar pueden encontrarse en manuales de referencia como, por ejemplo, Sambrook et al., (2000, Molecular Cloning--A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratories); y Ausubel et al., (1994, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva-York).

Los siguientes términos pueden tener los significados que se les atribuyen a continuación, a menos que se especifique lo contrario. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluidas las definiciones. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Definiciones

Tal como se utiliza en el presente documento, un "complejo de andamiaje" incluye cualquier asociación covalente de dos componentes: una fibra polimérica y un material de hidrogel. El complejo de andamiaje contiene la fibra polimérica y el material de hidrogel en una "red funcional", lo que significa que las interacciones entre los componentes dan lugar a un beneficio químico, bioquímico, biofísico, físico o fisiológico. Además, una red funcional puede incluir componentes adicionales, incluyendo células, materiales biológicos (por ejemplo, polipéptidos, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos), compuestos terapéuticos, moléculas sintéticas y similares. En ciertas realizaciones, el complejo de andamiaje promueve el crecimiento tisular y la infiltración celular cuando se implanta en un tejido objetivo presente en un sujeto humano.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "hidrogel" es un tipo de "gel", y se refiere a una matriz polimérica habitable por agua, que consiste en una red tridimensional de macromoléculas (por ejemplo, polímeros hidrófilos, polímeros hidrófobos, mezclas de los mismos) unidas por enlaces cruzados covalentes o no covalentes que pueden absorber una cantidad sustancial de agua (por ejemplo, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más del 99% por unidad de molécula no acuosa) para formar un gel elástico. La matriz polimérica puede estar formada por cualquier material polimérico sintético o natural adecuado. En el presente documento, el término "gel" se refiere a una red sólida tridimensional que se extiende por el volumen de un medio líquido y lo atrapa por efecto de la tensión superficial. Esta estructura de red interna puede ser el resultado de enlaces físicos (geles físicos) o químicos (geles químicos), así como de cristalitas u otras uniones que permanecen intactas dentro del fluido de extensión. Prácticamente cualquier fluido puede utilizarse como diluyente, incluyendo el agua (hidrogeles), el aceite y el aire (aerogeles). Tanto en peso como en volumen, la composición de los geles es mayoritariamente fluida, por lo que presentan densidades similares a las de los líquidos que los componen. Un hidrogel es un tipo de gel que utiliza agua como medio líquido.

Las definiciones de polímeros "hidrófobos" e "hidrofilicos" se basan en la cantidad de vapor de agua absorbida por los polímeros a una humedad relativa del 100%. De acuerdo con esta clasificación, los polímeros hidrófobos sólo absorben hasta un 1% de agua al 100% de humedad relativa ("rh"), mientras que los polímeros moderadamente hidrofilicos absorben 1-10% de agua, los polímeros hidrofilicos son capaces de absorber más de un 10% de agua y los polímeros higroscópicos absorben más de un 20% de agua. Un polímero "hinchable en agua" es aquel que absorbe una cantidad de agua superior, como mínimo, al 50% de su propio peso, al sumergirse en un medio acuoso.

El término "reticulado" en el presente documento se refiere a una composición que contiene reticulaciones intramoleculares y/o intermoleculares, ya sea que surjan a través de enlaces covalentes o no covalentes, y pueden ser directos o incluir un reticulante. El enlace "no covalente" incluye tanto el enlace de hidrógeno como el enlace electrostático (iónico).

El término "polímero" incluye estructuras poliméricas lineales y ramificadas, y también abarca polímeros reticulados, así como copolímeros (que pueden o no estar reticulados), incluyendo así copolímeros en bloque, copolímeros alternantes, copolímeros aleatorios, y similares. Los compuestos aquí denominados "oligómeros" son polímeros con un peso molecular inferior a aproximadamente 1000 Da, preferentemente inferior a aproximadamente 800 Da. Los polímeros y oligómeros pueden ser naturales u obtenidos a partir de fuentes sintéticas.

Reconstrucción de tejidos blandos

Las devastadoras pérdidas de tejidos blandos por extirpación de tumores, traumatismos, envejecimiento o malformaciones congénitas afectan a millones de personas cada año. La pérdida de tejidos, incluidos piel, grasa y músculo, provoca importantes alteraciones funcionales y estéticas difíciles de tratar por medios convencionales. Por ejemplo, en Estados Unidos se realizan más de 300.000 mastectomías parciales al año, que dejan cicatrices desfigurantes por la pérdida de tejido mamario blando. Las opciones existentes para la restauración de los tejidos blandos presentan importantes inconvenientes. Los colgajos de tejido autólogo requieren trasladar tejidos blandos de otra parte del cuerpo en procedimientos quirúrgicos largos que dejan déficits en la zona donante LoTempio 2010.. Plastic and Reconstructive Surgery, 126(2), 393-401; Patel 2012. Annals of Plastic Surgery, 69(2), 139-144}. Los implantes protésicos son propensos a una respuesta a cuerpo extraño que conduce a la fibrosis y el encapsulamiento{ Calobrace 2014 Plastic and Reconstructive Surgery,

134(1 Suppl), 6S-11; Tsoi 2014.. Plastic and Reconstructive Surgery, 133(2), 234-249}. El injerto de grasa que implica la colocación de adipocitos cosechados durante la liposucción se limita a pequeños volúmenes y se ve obstaculizado por la escasa supervivencia del injerto {Kakagia 2014 Surgical Innovation, 21(3), 327-336; Largo 2014 British Journal of Plastic Surgery, 67(4), 437-448}. Por último, se pueden utilizar rellenos inyectables de hidrogel para tejidos blandos, pero sólo son adecuados para defectos más pequeños y la restauración del volumen que proporcionan es transitoria {Young 2011. Acta Biomaterialia, 7(3), 1040-1049; Varma 2014 Acta Biomaterialia, 10(12), 4996-5004}. Se ha propuesto una nueva generación de soluciones de ingeniería tisular centradas en el uso de andamiajes de hidrogel como plantillas para regenerar tejidos blandos tal como el tejido adiposo en el lugar de la reconstrucción.

Enfoques actuales de ingeniería tisular para la reconstrucción de tejidos blandos

Se han identificado células madre derivadas del tejido adiposo (ASC) en lechos de heridas que rodean defectos de tejidos blandos {Salibian 2013 Archives of plastic surgery 40.6: 666-675}. Pueden diferenciarse en tejidos blandos, tal como la grasa, cuando cuentan con el apoyo de un microentorno matricial adecuado. Por lo tanto, las estrategias para rellenar el lugar de reparación con materiales funcionales tienen el potencial de permitir la regeneración de nuevo tejido utilizando las ASC endógenas. Los hidrogeles se han estudiado ampliamente como matriz de andamiaje para la regeneración de defectos tisulares debido a su naturaleza tridimensional (3D) y a sus propiedades elásticas, que son similares a las de los tejidos blandos. Se han utilizado diversos procedimientos para generar andamiajes de hidrogel con módulos similares a los de los tejidos adiposos nativos (~2 kPa) {Alkhouli 2013 American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, 305(12), E1427-35; Sommer 2013 Acta biomaterialia 9.11 (2013): 9036-9048} manteniendo su volumen y forma frente a la tensión física del tejido circundante. Esto requiere una mayor densidad de reticulación y un tamaño medio de poro más pequeño {Ryu 2011 Biomacromolecules 12.7 (2011): 2653-2659; Khetan 2013 Nature Materials, 12(5), 458-465; Li 2014 Journal of Neurotrauma, 31(16), 1431-1438}, lo que provoca una escasa infiltración celular y una regeneración deficiente. La capacidad de los andamiajes de hidrogel para promover la infiltración celular es la clave del éxito de la restauración de los tejidos blandos. La falta de infiltración vascular es responsable del fracaso de los injertos de grasa de gran volumen y de otros intentos de ingeniería tisular. Ningún material disponible en la actualidad puede rellenar el volumen perdido en los defectos de tejidos blandos y, al mismo tiempo, promover la vascularización temprana y la diferenciación de las ASC para regenerar los tejidos blandos.

Matriz de hidrogel

En los últimos años, Li y Wen han desarrollado un hidrogel de ácido hialurónico (AH) conjugado con péptido de bucle derivado de laminina (CCRRIKVAVWLC, 10 µM) con tamaño de poro y módulo optimizados (10 - 100 Pa) para el trasplante de células madre. Han demostrado que este hidrogel soporta la migración robusta de células madre neurales (NSC) y el brote de neuritas de las células diferenciadas {Li 2014 Journal of Neurotrauma, 31(16), 1431-1438}. En un modelo de lesión cortical controlada (CCI) de rata para lesiones cerebrales traumáticas, este hidrogel, cuando se inyectaba el día 3 después de la lesión por LCC, promovía la formación de una red vascular significativa que llenaba el lugar de la lesión (> 10 mm) entre 4 semanas y 6 meses después de la implantación. Esta mejora de la angiogénesis se atribuyó a la capacidad de este hidrogel para retener y presentar factores de crecimiento secretados por los tejidos, en particular el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Los informes publicados también revelaron que los pequeños fragmentos de degradación de HA de 3-10 unidades de disacáridos eran potentes reguladores de la proliferación de células endoteliales, la migración, la formación de túbulos y la angiogénesis {Slevin 2002 Journal of Biological Chemistry, 277(43), 41046-41059}. En un estudio reciente, se comprobó la eficacia de este hidrogel de HA para liberar esferoides de NSC derivadas de tejido fetal humano en una lesión cerebral provocada por un traumatismo craneoencefálico. Este hidrogel de HA proporcionó una sólida formación vascular dentro de la matriz del andamiaje tras el trasplante. Los vasos sanguíneos regenerados crecieron en la lesión y penetraron a través de la matriz implantada, y favorecieron la supervivencia y el crecimiento de los progenitores neuronales. Aunque estos estudios no son para la regeneración de tejido adiposo, estos resultados confirmaron la capacidad única de esta composición optimizada de hidrogel de HA para promover el crecimiento interior vascular del huésped. Y lo que es más importante, la matriz de hidrogel es lo suficientemente porosa como para permitir una migración celular robusta dentro de la matriz de hidrogel. Sin embargo, el uso directo de este hidrogel de HA para la reconstrucción de tejidos blandos no es factible, ya que sus propiedades mecánicas no son lo suficientemente elevadas como para mantener la integridad del lugar de implantación: el tejido adiposo circundante tiene un módulo más de 10 veces superior. Aumentar la densidad de reticulación para mejorar su módulo la hará poco permeable a la infiltración y migración celular. Se necesita una nueva estrategia para aumentar la propiedad mecánica sin disminuir significativamente el tamaño medio de los poros del hidrogel a granel. Se proporcionan materiales de hidrogel que contienen y/o están aislados de una matriz extracelular de tejido procesado, como la matriz extracelular derivada y/o derivable de un tejido adiposo.

Complejos de andamiaje.

Se proporcionan en el presente documento complejos de andamiaje adecuados para dispositivos médicos de uso que se incorporan en un tejido de un sujeto humano al que se administran los complejos, por ejemplo, mediante inyección o implantación como se ha definido anteriormente. Los complejos de andamiaje contienen

una fibra polimérica, generalmente con un diámetro medio de 100 nm a 8000 nm, o de 150 nm a 5000 nm, o de 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500, 5.000, 5.500, 6.000, 6.500, 7.000, 7.500 u 8.000. Como se proporciona en el presente documento, la proporción de fibra polimérica a material de hidrogel 1:10 a 10:1, tal como 1:5 a 5:1, tal como 1:3 a 3:1 sobre una base de masa componente. La relación entre la fibra polimérica y el material de hidrogel también se proporciona como una base de concentración, por ejemplo, un peso determinado de fibra polimérica por volumen de material de hidrogel. La concentración oscila de 1 a 50mg/mL. El material de hidrogel se dispone generalmente sobre la fibra polimérica, por ejemplo, adherido a la superficie exterior (o a una superficie exterior, dependiendo de la composición y la forma) de la fibra polimérica. El complejo de andamiaje no suele ser un material sólido uniforme. En su lugar, los complejos de andamiaje contienen una pluralidad de poros presentes sobre o dentro de una superficie del complejo de andamiaje. La presencia, el tamaño, la distribución, la frecuencia y otros parámetros de los poros pueden modularse durante la creación del complejo de andamiaje. El tamaño de los poros puede ser desde menos de aproximadamente 1 micrómetro hasta 100 micrómetros, incluyendo 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 micrómetros, y el tamaño de los mismos está adaptado, de tal manera que al menos el 80%, 90%, 95% o más del 95% de los poros tienen un tamaño deseado o están dentro de un rango de tamaño deseado.

Los complejos de andamiaje de la invención son adecuados para su incorporación en un tejido de un sujeto humano, y por lo tanto son generalmente "biocompatibles", lo que significa capaces de interactuar con un sistema biológico (tal como el que se encuentra en un sujeto humano) sin inducir una respuesta fisiopatológica en el mismo y/o, por lo tanto. En algunas realizaciones, el complejo de andamiaje se proporciona con el fin de retenerse de forma duradera en el tejido. Alternativamente, los complejos de andamiaje se retienen transitoriamente en el sujeto humano, y se proporcionan como sustancialmente biodegradables. La fibra polimérica contiene policaprolactona.

Como se proporciona en el presente documento, una forma preferida de interacción del complejo que contiene fibra polimérica e hidrogel incluye una fracción de reticulación, generalmente presente en una cantidad eficaz para introducir la unión entre la fibra polimérica y el material de hidrogel, por ejemplo, para inducir la reticulación entre la fibra de policaprolactona y el ácido hialurónico.

Diseño de andamiajes para la restauración de tejidos blandos

El concepto de material compuesto se ha utilizado ampliamente como mecanismo de refuerzo de materiales. Por ejemplo, la adición de partículas de hidroxiapatita en el hidrogel puede aumentar su rigidez {Wu 2008 Materials Chemistry and Physics 107.2 (2008): 364-369}, y el módulo de tracción del material compuesto aumenta aún más para las partículas alargadas {Yusong 2007 Journal of Materials Science, 42(13), 5129-5134}. Las mallas de nanofibras electrohiladas se han utilizado ampliamente como sustrato de ingeniería tisular debido a su similitud topográfica con la ECM nativa. De particular interés, la ECM descelularizada del tejido adiposo es altamente fibrosa y porosa por naturaleza (Fig. 6G) {Young 2011. Acta Biomaterialia, 7(3), 1040-1049}. Varios estudios recientes han intentado recapitular los componentes fibrosos introduciendo fibras fragmentadas de poli(láctida) (PLA) o quitosano en un hidrogel de polietilenglicol (PEG), poliacrilamida o alginato {Coburn 2011 Smart Structures and Systems, 7(3), 213; #37; Zhou 2011 Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 84(1), 155-162; Shin 2015 Journal of Materials Chemistry}. Las fibras fragmentadas se mezclan con soluciones precursoras de hidrogel y se incorporan al hidrogel durante el procedimiento de gelificación para crear una arquitectura tridimensional. Estos hidrogeles embebidos en fibras han mostrado mejores propiedades mecánicas que los hidrogeles correspondientes. Sin embargo, no se ha publicado ningún informe sobre pruebas de infiltración de células huésped *in vivo*. Además, estos hidrogeles no son degradables y requieren ligandos adhesivos para la adhesión y diferenciación de los adipocitos.

Diseño de un material compuesto de nanofibra-hidrogel

Para lograr el efecto de refuerzo de fibra manteniendo una alta porosidad en la fase de hidrogel, se proporciona un material compuesto de fibra-hidrogel electrohilada que ofrece propiedades superiores en comparación con otros andamiajes. Más allá de la mezcla de nanofibras y una matriz de hidrogel, de la que se ha informado anteriormente {Coburn 2011 Smart Structures and Systems, 7(3), 213}, aquí se introduce la unión interfacial entre las superficies de las fibras y la red de reticulación del hidrogel (Fig. 6). Este diseño de material compuesto no sólo permite un refuerzo mecánico más fuerte del componente de fibra sólida, sino que también permite un ajuste independiente de las propiedades mecánicas a granel y del tamaño medio de los poros/porosidad de la fase de hidrogel, lo que permite tanto unas propiedades óptimas de infiltración celular como la integridad estructural. Se contempla además que las fibras puedan emplearse como sustratos de adhesión celular preferentes para las ASC y los progenitores endoteliales, actuando por tanto como guía para apoyar la migración celular y la diferenciación de las ASC.

Innovación

En ciertos aspectos, la innovación clave es el diseño de material compuesto de nanofibra-hidrogel con unión interfacial entre las superficies de nanofibra y la red de hidrogel (Fig. 6A). Este material compuesto de ingeniería tiene el potencial de mejorar drásticamente la propiedad mecánica del hidrogel sin disminuir significativamente

el tamaño medio de los poros en la fase de hidrogel. La introducción de la unión interfacial puede ofrecer un efecto de refuerzo mecánico superior al de la simple mezcla física de los dos componentes. Este estudio trazará la gama de propiedades mecánicas (módulos de compresión y cizallamiento) alcanzables con los materiales compuestos de hidrogel de fibra de policaprolactona (PCL)-HA electrohilado en contraste con las mezclas. La segunda innovación es la demostración de dicho material compuesto de nanofibra-hidrogel para restaurar defectos de tejidos blandos. La caracterización preliminar demostró que el material compuesto compartía características estructurales con el tejido adiposo (Fig. 6) {Christman, 2012 US 20120264190 A1; Young 2011.. Acta Biomaterialia, 7(3), 1040-1049}. Se planteó la hipótesis de que este material compuesto ofrece integridad estructural y propiedades mecánicas importantes para la regeneración de tejidos blandos. Este estudio también ha demostrado la versatilidad y eficacia de los materiales compuestos, en comparación con los hidrogeles.

La finalización con éxito de este proyecto proporcionará una solución lista para usar para la restauración del volumen de tejido blando faltante, particularmente para defectos más grandes en los que el establecimiento de la red vascular, el mantenimiento de la integridad del sitio de reparación tisular, la promoción de la migración y organización celular y el reclutamiento de células huésped son cruciales para una restauración tisular sostenible. El amplio historial clínico de los componentes de los materiales utilizados en este diseño de material compuesto, es decir, el hidrogel de HA y las fibras de poliéster biodegradables, junto con estos datos preliminares sobre la compatibilidad tisular, sugerían una compatibilidad tisular superior y una vía de aprobación normativa directa para la traslación clínica.

Características:

En algunas realizaciones, la invención proporciona la unión interfacial entre nanofibras y red polimérica en el componente hidrogel. Esto es importante para la formación de un "verdadero" material compuesto. Se demostró que la mezcla de dichas fibras e hidrogel no proporcionaba el mismo grado de mejora mecánica. También existen informes anteriores sobre el uso de mezclas de nanofibras- hidrogeles. En otras palabras, la unión interfacial diferencia considerablemente este nuevo trabajo de la técnica. Además, la unión interfacial podría incluir enlaces covalentes, como se muestra en este manuscrito, y enlaces secundarios, como los enlaces de hidrógeno y la interacción de carga electrostática.

Este es también el primer trabajo en el campo que demuestra refuerzo isotrópico-el material compuesto es más fuerte en todas las orientaciones, como se necesita para reemplazar defectos volumétricos de geometría arbitraria. Los diseños con esteras de nanofibras o un pequeño número de filamentos alineados son intrínsecamente anisótropos. Este diseño es capaz de conformar tanto materiales isotrópicos como anisótropos

El trabajo presentado en el presente documento, para al menos ciertos aspectos, define los componentes utilizados para la formación de material compuesto para ser una red de hidrogel con suficiente tamaño de poro y porosidad para la migración celular y el crecimiento interior de tejido huésped, y nanofibras que incluyen vagamente fibras de polímero con diámetros que van desde 50 nm a 10 μ m.

Componente gel/hidrogel

El material compuesto de hidrogel de la invención puede incluir cualquier tipo de componente de hidrogel adecuado dentro del alcance de las reivindicaciones.

La invención contempla materiales compuestos de nanoestructura/gel que incluyen cualquier componente de gel adecuado, incluyendo cualquier componente de hidrogel adecuado conocido en la técnica dentro del alcance de las reivindicaciones.

Los geles/hidrogeles de la invención pueden contener además otros polímeros habitables en agua, tales como polímeros de acrilato, que se forman generalmente a partir de ácido acrílico, ácido metacrílico, acrilato de metilo, acrilato de etilo, metacrilato de metilo, metacrilato de etilo y/u otros monómeros de vinilo. Polímeros de acrilato adecuados son los copolímeros disponibles bajo el nombre comercial "Eudragit" de Rohm Pharma (Alemania), como se indica supra. Los copolímeros E, L, S, RL, RS y NE de la serie Eudragit están disponibles solubilizados en disolvente orgánico, en dispersión acuosa o en polvo seco. Los polímeros de acrilato preferidos son los copolímeros de ácido metacrílico y metacrilato de metilo, tales como los polímeros de las series Eudragit L y Eudragit S. Los copolímeros preferidos son Eudragit L-30D-55 y Eudragit L-100-55 (este último copolímero es una forma secada por pulverización de Eudragit L-30D-55 que puede reconstituirse con agua). El peso molecular del copolímero Eudragit L-30D-55 y Eudragit L-100-55 es de aproximadamente 135.000 Da, con una relación entre grupos carboxilo libres y grupos éster de aproximadamente 1:1. El copolímero es generalmente insoluble en fluidos acuosos con un pH inferior a 5,5. Otro copolímero de ácido metacrílico y metacrilato de metilo especialmente adecuado es Eudragit S-100, que difiere de Eudragit L-30D-55 en que la proporción entre grupos carboxilo libres y grupos éster es aproximadamente de 1:2. Eudragit S-100 es insoluble a un pH inferior a 5,5, pero, a diferencia de Eudragit L-30D-55, es poco soluble en fluidos acuosos con un pH comprendido entre 5,5 y 7,0. Este copolímero es soluble a pH 7,0 y superior. También puede utilizarse Eudragit L-100, que tiene un perfil de solubilidad dependiente del pH entre el de Eudragit L-30D-55 y Eudragit S-100, en la medida en que es insoluble a un pH inferior a 6,0. Los expertos en la técnica apreciarán que Eudragit L-30D-55, L-100-

55, L-100 y S-100 pueden sustituirse por otros polímeros aceptables que tengan características de solubilidad dependientes del pH similares.

Cualquiera de las composiciones de gel/hidrogel descritas en el presente documento puede modificarse para contener un agente activo y actuar, así como un sistema de administración de agente activo cuando se aplica a una superficie corporal (por ejemplo, un sitio de reparación tisular) en relación de transmisión de agente activo a la misma. La liberación de agentes activos "cargados" en las presentes composiciones de hidrogel de la invención implica típicamente tanto la absorción de agua como la desorción del agente a través de un mecanismo de difusión controlado por hinchamiento. Las composiciones de hidrogel que contienen agentes activos pueden emplearse, a modo de ejemplo, en sistemas transdérmicos de administración de fármacos, en apósitos para heridas, en formulaciones farmacéuticas tópicas, en sistemas implantados de administración de fármacos, en formas farmacéuticas orales y similares.

Agentes activos adecuados que pueden incorporarse en las presentes composiciones de hidrogel y administrarse sistémicamente (por ejemplo, con una forma de dosificación transdérmica, oral u otra forma de dosificación adecuada para la administración sistémica de un fármaco) incluyen, pero no se limitan a: agentes analépticos; agentes analgésicos; agentes anestésicos; agentes antiartríticos; fármacos respiratorios, incluidos agentes antiasmáticos; agentes anticancerígenos, incluyendo fármacos antineoplásicos; anticolinérgicos; anticonvulsivantes; antidepresivos; agentes antidiabéticos; antidiarreicos; antihelmínticos; antihistamínicos; agentes antihiperlipidémicos; agentes antihipertensivos; antiinfecciosos, tales como antibióticos y antivíricos; antiinflamatorios; antimigrañosos; antinauseosos; antiparkinsonianos; antipruriginosos; antipsicóticos; antipiréticos; antiespasmódicos; antituberculosos; antiulcerosos; antivíricos; ansiolíticos; supresores del apetito; fármacos para el trastorno por déficit de atención (TDA) y el trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH); preparados cardiovasculares, incluyendo los bloqueadores de los canales del calcio, los agentes antianginosos, los agentes del sistema nervioso central (SNC), los betabloqueantes y los agentes antiarritmicos; estimulantes del sistema nervioso central; preparados para la tos y el resfriado, incluyendo los descongestionantes; diuréticos; material genético; remedios a base de hierbas; hormonolíticos; hipnóticos; agentes hipoglucemiantes; agentes inmunosupresores; inhibidores de los leucotrienos; inhibidores mitóticos; relajantes musculares; antagonistas narcóticos; nicotina; agentes nutricionales, tales como vitaminas, aminoácidos esenciales y ácidos grasos; fármacos oftálmicos, tales como agentes antiglaucoma; parasimpaticolíticos; fármacos peptídicos; psicoestimulantes; sedantes; esteroides, incluyendo progestágenos, estrógenos, corticosteroides, andrógenos y agentes anabolizantes; agentes para dejar de fumar; simpaticomiméticos; tranquilizantes; y vasodilatadores, incluyendo coronarios generales, periféricos y cerebrales. Los agentes activos específicos con los que son útiles las presentes composiciones adhesivas incluyen, sin limitación, anabasina, capsaicina, dinitrato de isosorbida, aminostigmina, nitroglicerina, verapamilo, propranolol, silabolina, foridona, clonidina, citisina, fenazepam, nifedipina, fluacizina y salbutamol.

Para la administración tópica de fármacos y/o almohadillas medicadas (por ejemplo, almohadillas medicadas para los pies), los agentes activos adecuados incluyen, a modo de ejemplo, los siguientes:

Agentes bacteriostáticos y bactericidas: Los agentes bacteriostáticos y bactericidas adecuados incluyen, a modo de ejemplo: compuestos halogenados tal como el yodo, complejos de yodopovidona (es decir, complejos de PVP y yodo, también denominados "povidina" y disponibles bajo el nombre comercial Betadine de Purdue Frederick), sales de yoduro, cloramina, clorohexidina e hipoclorito sódico; plata y compuestos que contienen plata, tales como sulfadiazina, acetiltanato proteico de plata, nitrato de plata, lactato de plata, sulfato de plata y cloruro de plata; compuestos organoestánicos, tales como benzoato de tri-n-butilestaño; zinc y sales de zinc; oxidantes, tales como peróxido de hidrógeno y permanganato potásico; compuestos de arilmercurio, tal como borato de fenilmercurio o merbromina; compuestos de alquilmercurio, tal como tiomersal; fenoles, tal como timol, o-fenil fenol, 2-bencil-4-clorofenol, hexaclorofeno y hexilresorcinol; y compuestos orgánicos nitrogenados, tales como 8-hidroxiquinoleína, clorquinaldol, clioquinol, etacridina, hexetidina, clorhexedina y ambazona.

Agentes antibióticos: Los agentes antibióticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, antibióticos de la familia de la lincomicina (refiriéndose a una clase de agentes antibióticos recuperados originalmente de streptomyces lincolnensis), antibióticos de la familia de la tetraciclina (refiriéndose a una clase de agentes antibióticos recuperados originalmente de streptomyces aureofaciens) y antibióticos basados en azufre, es decir, sulfonamidas. Los antibióticos ejemplares de la familia de la lincomicina incluyen lincomicina, clindamicina, compuestos relacionados como se describen, por ejemplo, en Pat. EE.UU. Nos. 3,475,407, 3,509,127, 3,544,551 y 3,513,155, y sales y ésteres farmacológicamente aceptables de los mismos. Los antibióticos ejemplares de la familia de la tetraciclina incluyen la propia tetraciclina, la clortetraciclina, la oxitetraciclina, la tetraciclina, la demeclociclina, la rolitetraciclina, la metaciclina y la doxiciclina y sus sales y ésteres farmacéuticamente aceptables, en particular las sales de adición ácida tal como la sal de clorhidrato. Los antibióticos a base de azufre ejemplares incluyen, entre otros, las sulfonamidas sulfacetamida, sulfabenzamida, sulfadiazina, sulfadoxina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametoazol, sulfametoazol y sus sales y ésteres farmacológicamente aceptables, por ejemplo, sulfacetamida sódica.

Agentes analgésicos: Los agentes analgésicos adecuados son los anestésicos locales, incluyendo, entre otros, acetamidoeugenol, acetato de alfadolona, alfaxalona, amucaína, amolanona, amilocaína, benoxinato, betoxicaína, bifenamina, bupivacaína, buretamina, butacaína, butaben, butanilcaína, buhalital, butoxicaína, carticaína, 2-cloroprocaína, cincocaína, cocaetilen, cocaína, ciclometicaína, dibucaína, dimetoisoquina, dimetocaína, diperadón, diciclonina, ecgonidina, ecgonina, aminobenzoato de etilo, cloruro de etilo, etidocaína, etoxadrol, beta.eucaína, euprocina, fenalcomina, fomocaína, hexobarbital, hexilcaína, hidroxidiona, hidroxiprocaína, hidroxitetraína, p-aminobenzoato de isobutilo, kentamina, mesilato de leucinocaína, levoadrol, lidocaína, mepivacaína, meprilcaína, metabutoxicaína, metohexital, cloruro de metilo, midazolam, mirtecaína, naepaína, octacaína, ortocaína, oxetazaína, paretoxicaína, fenacaína, fenciclidina, fenol, piperocaína, piridocaína, polidocanol, pramoxina, prilocaína, procaína, propanidida, propanocaína, proparacaína, propipocaína, propofol, propoxicaína, pseudococaína, pirrocaína, risocaína, alcohol salicílico, tetraína, tialbarbital, timilal, tiobutabarbital, tiopental, tolicaína, trimecaína, zolamina y sus combinaciones. La tetraína, la lidocaína y la prilocaína son agentes analgésicos de referencia en el presente documento.

Otros agentes tópicos que pueden administrarse utilizando las presentes composiciones de hidrogel como sistemas de administración de fármacos incluyen los siguientes: agentes antifúngicos, tales como ácido undecilénico, tolnaftato, miconazol, griseofulvina, ketoconazol, ciclopirox, clotrimazol y cloroxilenol; agentes queratolíticos, tales como ácido salicílico, ácido láctico y urea; vasodilatadores, tales como cantaridina; agentes antiacné, tales como peróxidos orgánicos (por ejemplo, peróxido de benzoilo), retinoides (por ejemplo, ácido retinoico, adapaleno y tazaroteno), sulfonamidas (por ejemplo, sulfacetamida sódica), resorcinol, corticosteroides (por ejemplo, triamcinolona), alfa-hidroxiácidos (por ejemplo, ácido láctico y ácido glicólico), alfa-cetoácidos (por ejemplo, ácido glicólico) y agentes antibacterianos específicamente indicados para el tratamiento del acné, tal como el ácido azelaico, la clindamicina, la eritromicina, la meclociclina, la minociclina, la nadifloxacina, la cefalexina, la doxiciclina y la ofloxacina; agentes aclarantes y blanqueadores de la piel, tal como la hidroquinona, el ácido kójico, el ácido glicólico y otros alfa-hidroxiácidos, la artocarpina y determinados peróxidos orgánicos; agentes para el tratamiento de las verrugas, tales como el ácido salicílico, el imiquimod, el dinitroclorobenceno, el ácido dibutílico escuárico, la podofilina, la podofilotoxina, la cantaridina, el ácido tricloraacético, la bleomicina, el cidofovir, el adefovir y sus análogos y agentes antiinflamatorios tales como corticosteroides y antiinflamatorios no esteroideos (AINE), entre los que se incluyen ketoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, benoxaprofeno, indoprofeno, piroprofeno, carprofeno, oxaprozina, pranoprofeno, suprofeno, alminoprofeno, butibufeno, fenbufeno y ácido tiaprofénico.

Para los apósitos para heridas, los agentes activos adecuados son aquellos útiles para el tratamiento de heridas, e incluyen, pero no se limitan a compuestos bacteriostáticos y bactericidas, agentes antibióticos, agentes analgésicos, vasodilatadores, agentes potenciadores de la cicatrización tisular, aminoácidos, proteínas, enzimas proteolíticas, citoquinas y factores de crecimiento polipeptídicos.

Para la administración tópica y transdérmica de algunos agentes activos, y en apósitos para heridas, puede ser necesario o deseable incorporar un potenciador de la permeación en la composición de hidrogel con el fin de aumentar la velocidad de penetración del agente en o a través de la piel. Entre los potenciadores adecuados se incluyen, por ejemplo, los siguientes: sulfóxidos tal como el dimetilsulfóxido (DMSO) y el decilmethylsulfóxido; éteres tales como el éter monoetilico de dietilenglicol (disponible comercialmente como Transcutol) y el éter monometílico de dietilenglicol; tensioactivos tales como laurato sódico, lauril sulfato sódico, bromuro de cetiltrimetilamonio, cloruro de benzalconio, Poloxamer (231, 182, 184), Tween (20, 40, 60, 80) y lecitina (Pat. EE.UU. No. 4.783.450); las azacicloheptan-2-onas 1-sustituidas, en particular la 1-n-dodecilciclaza-cicloheptan-2-ona (disponible bajo la marca comercial Azone de Nelson Research & Development Co., Irvine, California; véase Pat. EE.UU. Nos. 3,989,816, 4,316,893, 4,405,616 y 4,557,934); alcoholes tales como etanol, propanol, octanol, decanol, alcohol bencílico y similares; ácidos grasos tales como ácido láurico, ácido oleico y ácido valérico; ésteres de ácidos grasos, tales como el miristato de isopropilo, el palmitato de isopropilo, el metilpropionato y el oleato de etilo; polioles y sus ésteres, tales como el propilenglicol, el etilenglicol, el glicerol, el butanodiol, el polietilenglicol y el monolaurato de polietilenglicol (PEGML; véase, por ejemplo, Pat. EE.UU. No. 4.568.343); amidas y otros compuestos nitrogenados tales como urea, dimetilacetamida (DMA), dimetilformamida (DMF), 2-pirrolidona, 1-metil-2-pirrolidona, etanolamina, dietanolamina y trietanolamina; terpenos; alcanos; y ácidos orgánicos, en particular ácido salicílico y salicilatos, ácido cítrico y ácido succínico. También pueden utilizarse mezclas de dos o más potenciadores.

En ciertas otras realizaciones, las composiciones de materiales compuestos de la invención que comprenden un gel (por ejemplo, un componente de hidrogel) y una nanoestructura también pueden comprender componentes aditivos opcionales adicionales. Dichos componentes son conocidos en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, cargas, conservantes, reguladores del pH, suavizantes, espesantes, pigmentos, colorantes, partículas refractivas, estabilizantes, agentes endurecedores, separadores, agentes farmacéuticos (por ejemplo, antibióticos, promotores de la angiogénesis, agentes antifúngicos, agentes inmunosupresores, anticuerpos y similares) y potenciadores de la permeación. Estos aditivos, y sus cantidades, se seleccionan de manera que no interfieran significativamente con las propiedades químicas y físicas deseadas de la composición de hidrogel.

Los rellenos absorbentes pueden incorporarse ventajosamente para controlar el grado de hidratación cuando el adhesivo está sobre la piel u otra superficie corporal. Dichos rellenos pueden incluir celulosa microcristalina, talco, lactosa, caolín, manitol, sílice coloidal, alúmina, óxido de zinc, óxido de titanio, silicato de magnesio, silicato de magnesio y aluminio, almidón hidrófobo, sulfato de calcio, estearato de calcio, fosfato de calcio, fosfato de calcio dihidratado, papel tejido y no tejido y materiales de algodón. Otros rellenos adecuados son inertes, es decir, sustancialmente no adsorbentes, e incluyen, por ejemplo, polietilenos, polipropilenos, copolímeros de amida de poliéter de poliuretano, poliésteres y copolímeros de poliéster, nailon y rayón.

Las composiciones también pueden incluir uno o más conservantes. Los conservantes incluyen, a modo de ejemplo, p-cloro-m-cresol, alcohol feniletílico, alcohol fenoxietílico, clorobutanol, metilester del ácido 4-hidroxibenzoico, propilester del ácido 4-hidroxibenzoico, cloruro de benzalconio, cloruro de cetilpiridinio, diacetato o gluconato de clorohexidina, etanol y propilenglicol.

Las composiciones también pueden incluir compuestos reguladores del pH. También pueden incluirse compuestos útiles como reguladores del pH, entre otros, tampones de glicerol, tampones de citrato, tampones de borato, tampones de fosfato o tampones de ácido cítrico-fosfato, a fin de garantizar que el pH de la composición de hidrogel sea compatible con el de la superficie corporal de un individuo.

Las composiciones también pueden incluir agentes suavizantes adecuados. Los suavizantes adecuados incluyen ésteres de ácido cítrico, tales como trietilcitrato o acetil trietilcitrato, ésteres de ácido tartárico, tales como dibutiltartrato, ésteres de glicerol, tales como diacetato de glicerol y triacetato de glicerol; ésteres de ácido ftálico, tales como ftalato de dibutilo y ftalato de dietilo; y/o tensioactivos hidrofílicos, preferentemente tensioactivos no iónicos hidrofílicos, tal como, por ejemplo, ésteres parciales de ácidos grasos de azúcares, ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol, ésteres de alcoholes grasos de polietilenglicol y ésteres de ácidos grasos de sorbitán de polietilenglicol.

Las composiciones también pueden incluir agentes espesantes. Los espesantes preferidos en el presente documentos son compuestos naturales o derivados de los mismos, e incluyen, a modo de ejemplo: colágeno; galactomananos; almidones; derivados e hidrolizados de almidón; derivados de celulosa tales como metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa; ácidos silícicos coloidales; y azúcares tales como lactosa, sacarosa, fructosa y glucosa. También pueden utilizarse espesantes sintéticos tales como alcohol polivinílico, vinilpirrolidona-vinilacetato-copolímeros, polietilenglicoles y polipropilenglicoles.

En ciertas realizaciones, el material compuesto de hidrogel de la invención que comprende un hidrogel y una nanoestructura comprende además un componente que promueve la angiogénesis. Un reto para lograr la regeneración de tejidos blandos clínicamente relevante antes de la presente invención es que el tejido regenerado preferentemente debe revascularizarse. Por lo tanto, cualquier material que promueva la regeneración del tejido blando preferentemente también debería fomentar la angiogénesis. Una forma de lograrlo es mediante el uso de componentes de hidrogel que contengan heparina, que pueden servir como sitios de unión de factores de crecimiento para enriquecer y retener los factores de crecimiento que promueven la angiogénesis y la formación de tejido.

En diversas otras realizaciones, los materiales compuestos de la invención pueden basarse en ácido hialurónico (AH) como material de hidrogel. El AH es un polisacárido lineal no sulfatado con unidades disacáridas repetidas que forman el componente hidrogel. El AH también es un componente nativo no inmunogénico de la matriz extracelular de los tejidos humanos y se utiliza ampliamente como relleno dérmico en procedimientos estéticos y reconstructivos.

La descomposición de HA es facilitada por hialuronidasas nativas cuya expresión está aumentada en áreas de daño tisular e inflamación. Es importante destacar que los estudios han demostrado que los pequeños fragmentos de degradación de HA de 3-10 unidades de disacáridos son potentes reguladores de la proliferación de células endoteliales, la migración, la formación de túbulos y la angiogénesis. Se cree que estas funciones biológicas de la HA están mediadas por CD44 en una vía en la que participan Ras y PKC. El bloqueo de las interacciones CD44/HA mediante anticuerpos anti-CD44 redujo la proliferación y migración de células endoteliales microvasculares humanas in vitro. Los hidrogeles de HA se han investigado como posibles matrices para la liberación de células en diversos modelos de lesión celular y tisular. Estos hidrogeles pueden servir de andamiaje protector y de soporte para las células y también pueden reducir las cicatrices. Así pues, se cree que el HA desempeña un papel fundamental en la mejora de la regeneración tisular al favorecer la infiltración celular y promover la angiogénesis.

En primer lugar, el material tiene integridad tridimensional y una consistencia similar a la del tejido adiposo nativo. Esto hace que sea adecuado para la restauración inmediata del volumen de tejido blando faltante. En segundo lugar, el material puede depositarse preferentemente con una pluralidad de nanofibras flexibles que pueden servir como sustratos para la migración de adipocitos y progenitores endoteliales. En tercer lugar, el material tiene suficiente porosidad para permitir que estas células precursoras se infiltren e integren rápidamente en el andamiaje en lugar de formar una cápsula fibrosa a su alrededor. En cuarto lugar, el componente de hidrogel de HA proporciona compresibilidad y expansión volumétrica a la vez que aporta importantes señales angiogénicas. En quinto lugar, los componentes de nanofibra e hidrogel son

biodegradables, lo que permite sustituirlos por tejido blando regenerado. En sexto lugar, todos los materiales de los componentes tienen un sólido historial de seguridad en numerosos dispositivos aprobados por la FDA, lo que reduce potencialmente los obstáculos normativos para la traslación clínica.

Los materiales compuestos de gel/hidrogel/nanoestructura de la invención también pueden incluir agentes reparadores de tejidos, tales como, una serie de factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico (EDF), PDGF, y factores de crecimiento nervioso (NGF's). Por ejemplo, las composiciones pueden incluir EGF. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) se descubrió tras observar que las heridas cutáneas de los ratones de laboratorio parecían cicatrizar más rápidamente cuando se les dejaba lamerlas. Esto no se debía simplemente a algún agente antiséptico de la saliva (tal como la lisozima). Se demostró que un factor de crecimiento específico, ahora conocido como EGF, era el responsable. El EGF es idéntico a la urogastrona y tiene propiedades angiogénicas. El factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa.) es muy similar, se une al mismo receptor y es aún más eficaz para estimular la regeneración de las células epiteliales (epitelización).

Así, los hidrogeles de la presente invención que comprenden EGF/TGF pueden utilizarse ventajosamente en la aceleración de la cicatrización de heridas y quemaduras, la reducción de la formación de cicatrices queloides (especialmente para quemaduras), apósitos de injerto de piel y el tratamiento de úlceras crónicas de las piernas.

Los agentes reparadores de tejidos útiles en la presente invención incluyen un número de factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico (EDF), PDGF, y factores de crecimiento nervioso (NGF's). Por lo general, las hormonas promotoras del crecimiento afectan a entre uno y cuatro tejidos. Muchos de los productos desarrollados a partir de estas proteínas están destinados a reparar heridas de uno u otro tipo, aunque existen otras indicaciones. A continuación, se describen algunos de los factores de crecimiento tisular más importantes.

Las composiciones de gel/nanoestructura de la invención también pueden incluir uno o más factores de crecimiento que pueden ser útiles en los procedimientos de reparación de tejidos y otras aplicaciones de la invención.

Por ejemplo, la invención contempla incluir PDGF en las composiciones de la invención. El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es un mitógeno para casi todas las células derivadas del mesénquima, es decir, células sanguíneas, musculares, óseas, cartilaginosas y del tejido conjuntivo. Es una glicoproteína dimérica que existe como homodímero AA o BB, o como heterodímero AB. Como ocurre con muchos factores de crecimiento, actualmente se considera que el PDGF pertenece a una familia más amplia de factores. Además del PDGF, esta familia incluye los factores homodiméricos factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento placentario (PIGF), los heterodímeros VEGF/PIGF y el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), un factor similar al PDGF secretado por células endoteliales vasculares y fibroblastos humanos. Junto con el NGF, el TGF-beta. y las hormonas glicoproteicas tal como la hormona gonadotrópica coriónica humana (hCG), el PDGF se clasifica ahora como miembro de la superfamilia de factores de crecimiento cisteínicos. Todos estos factores pueden utilizarse junto con los hidrogeles de la presente invención.

El PDGF es producido por las plaquetas y liberado en el curso de la coagulación sanguínea. Es sólo uno de los factores de crecimiento que derivan de estas células. El PDGF atrae fibroblastos y glóbulos blancos al lugar de la lesión, además de estimular el crecimiento de tejido conjuntivo de sustitución (principalmente fibroblastos y células musculares lisas). Estimula la división celular en diversas células, incluidas las que producen colágeno, favoreciendo así la angiogénesis. También estimula la mitogénesis, la vasoconstricción, la quimiotaxis, la actividad enzimática y la movilización del calcio.

Los factores de crecimiento derivados de plaquetas sanguíneas pueden utilizarse para restaurar el recrecimiento óseo y de tejidos blandos durante ciertos tratamientos utilizando las composiciones de la invención y para acelerar el procedimiento de cicatrización de heridas crónicas y agudas. En consecuencia, las composiciones de hidrogel/nanoestructura de la presente invención pueden comprender ventajosamente un cóctel de factores de crecimiento derivados de plaquetas.

Las composiciones de hidrogel/nanoestructura de la presente invención pueden utilizarse en terapia génica para la administración local del gen PDGF, por ejemplo. El ADN plasmídico que codifica el PDGF se incorpora a la matriz de hidrogel y los fibroblastos del tejido de granulación, que se originan en el tejido viable que rodea la herida, proliferan y migran a la matriz, actuando como objetivos para la transferencia y expresión del gen plasmídico.

Las composiciones de hidrogel/nanoestructura de la invención también pueden incluir VEGF para promover la angiogénesis. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, también conocido como factor de permeabilidad vascular) es otro factor de crecimiento vascular y una citoquina angiogénica multifuncional. Contribuye a la angiogénesis (crecimiento de los vasos sanguíneos) tanto indirecta como directamente al estimular la proliferación de las células endoteliales a nivel de los microvasos, provocando su migración y alterando su expresión genérica. El VEGF también hace que estas células endoteliales sean hiperpermeables, provocando que liberen proteínas plasmáticas fuera del espacio vascular, lo que provoca cambios en la zona, contribuyendo a la angiogénesis.

Las composiciones de la invención también pueden incluir FGF. El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) es en realidad una familia de al menos 19 14 18 kD péptidos pertenecientes a la familia de los factores de crecimiento de unión a heparina, y son mitogénicos para los fibroblastos cultivados y las células endoteliales vasculares. También son angiogénicas in vivo y esta angiogenicidad se ve potenciada por el TNF. Los FGF pueden utilizarse de forma similar al EGF. El bFGF, también conocido como FGF-2, interviene en el control de la megacariocitopoyesis humana y se ha demostrado que los FGF son eficaces para estimular la formación de células endoteliales y contribuir a la reparación del tejido conjuntivo.

Las composiciones de hidrogel/nanoestructura también pueden comprender Factor de Crecimiento de Queratinocitos (KGF), también conocido como FGF-7, para su uso en la cicatrización de heridas y otros trastornos que implican la destrucción de células epiteliales.

Los Factores de Crecimiento Transformantes (TGF's) tienen la capacidad de transformar diversas líneas celulares, y pueden conferir, por ejemplo, la capacidad de crecer en cultivo durante más de un número limitado de generaciones, el crecimiento en múltiples capas en lugar de monocapas, y la adquisición de un cariotipo anormal. Existen al menos cinco miembros de la familia TGF, siendo los dos más estudiados el TGF-alfa y el TGF-beta. El primero es mitógeno para los fibroblastos y las células endoteliales, angiogénico y favorece la resorción ósea. Las composiciones también pueden incluir TGF. El TGF-beta es un mediador general de la regulación celular, un potente inhibidor del crecimiento celular e inhibe la proliferación de muchos tipos de células. El TGF-beta puede antagonizar los efectos mitogénicos de otros factores de crecimiento peptídicos, y también puede inhibir el crecimiento de muchas líneas celulares tumorales. El TGF-beta también tiene efectos angiogénicos y favorece la formación de colágeno en los fibroblastos. Las indicaciones para los hidrogeles de la presente invención incluyen úlceras cutáneas crónicas, tal como las úlceras neurotróficas del pie en pacientes diabéticos. Otros ámbitos son la cicatrización de heridas, la reparación ósea y las enfermedades inmunosupresoras.

Las composiciones de hidrogel/nanoestructura de la presente invención pueden utilizarse para transportar células adecuadas, por ejemplo. Pueden incorporarse al gel justo antes de su aplicación sobre una herida, u otra zona adecuada, para maximizar su eficacia. Las células adecuadas incluyen fibroblastos y queratinocitos autólogos, que son los principales responsables de la formación de la dermis y la epidermis. Pueden aplicarse geles separados, cada uno con un tipo de célula, de forma consecutiva o conjunta, o un gel puede contener ambos tipos de células, pero esto suele ser menos preferible.

Las composiciones de hidrogel/nanoestructura de la presente invención pueden comprender útilmente colágeno, por ejemplo. Aunque es improbable que el colágeno, en esta forma, cumpla una función estructural útil, sirve principalmente como proteína de sacrificio cuando la actividad proteolítica es indeseablemente alta, ayudando así a evitar la maceración del tejido sano, por ejemplo.

Las composiciones de hidrogel/nanoestructura también pueden incluir ciertas enzimas. Las enzimas se utilizan en el desbridamiento de heridas agudas y crónicas. El desbridamiento es la eliminación de tejidos no viables y cuerpos extraños de una herida y es un procedimiento natural en el procedimiento de reparación de heridas. Durante la fase inflamatoria, los neutrófilos y macrófagos digieren y eliminan las plaquetas "usadas", los restos celulares y el tejido lesionado avascular de la zona de la herida. Sin embargo, con la acumulación de cantidades importantes de tejido dañado, este procedimiento natural se ve desbordado y resulta insuficiente. La acumulación de tejido necrótico impone entonces una considerable demanda fagocítica a la herida y retrasa su cicatrización. En consecuencia, el desbridamiento del tejido necrótico es un objetivo particular de la terapia tópica y un componente importante del tratamiento óptimo de las heridas.

Las enzimas, por ejemplo, pueden incorporarse en hidrogeles de la presente invención para aplicación tópica para proporcionar un procedimiento selectivo de desbridamiento. Las enzimas adecuadas pueden proceder de diversas fuentes, tal como el krill, el cangrejo, la papaya, el extracto bovino y las bacterias. Entre las enzimas adecuadas disponibles comercialmente se encuentran la colagenasa, la papaína/urea y una combinación de fibrinolisisina y desoxirribonucleasa.

Las enzimas para su uso en la presente invención generalmente actúan de una de estas dos maneras: digiriendo directamente los componentes de la esfacelosis (por ejemplo, fibrina, bacterias, leucocitos, restos celulares, exudado seroso, ADN); o, disolviendo los "anclajes" de colágeno que fijan el tejido avascular al lecho de la herida subyacente.

Los hidrogeles de la presente invención pueden comprender solución de Dakin, si se desea, generalmente para ejercer efectos antimicrobianos y control de olores. Como agente de desbridamiento, la solución de Dakin no es selectiva debido a sus propiedades citotóxicas. La solución de Dakin desnaturaliza las proteínas, facilitando su eliminación de la herida. El aflojamiento de la esfacelosis también facilita el desbridamiento por otros procedimientos. Los hidrogeles que contienen solución de Dakin pueden cambiarse dos veces al día si el objetivo es el desbridamiento. Por lo general, la protección de la piel de la periferia debe proporcionarse con pomadas, apósitos líquidos de película de barrera cutánea u obleas sólidas de barrera cutánea, por ejemplo.

El gel de la presente invención puede administrarse por cualquier procedimiento adecuado, tal como mediante una jeringa o un envase de fuelle (sistemas de administración de dosis única) o un sistema multidosis, tal como un sistema de administración presurizado o administración mediante un sistema de tipo "bolsa en la lata" (tal como el publicado en el documento WO98/32675). Un ejemplo de un paquete de fuelles se muestra en el diseño británico publicado número 2082665.

Como tal, la presente invención también se extiende a un sistema de administración de dosis única que comprende un gel de acuerdo con la presente invención, para el tratamiento de heridas. La invención también se extiende a un sistema de suministro presurizado que comprende un gel de acuerdo con la presente invención, y un hidrogel presurizado de acuerdo con la presente invención en un recipiente de aerosol capaz de formar una pulverización al liberarse la presión del mismo. El uso de estos medios de administración permite administrar el gel en zonas del paciente que de otro modo serían difíciles de alcanzar mediante la aplicación directa, tal como la espalda del paciente cuando está tumbado.

En cierta realización, puede ser ventajoso hacer que las composiciones de hidrogel de la invención sean eléctricamente conductoras para su uso en electrodos biomédicos y otros contextos de electroterapia, es decir, para fijar un electrodo u otro miembro eléctricamente conductor a la superficie corporal. Por ejemplo, la composición de hidrogel puede utilizarse para fijar un electrodo de estimulación nerviosa transcutánea, un electrodo de retorno electroquirúrgico o un electrodo de electrocardiograma a la piel o al tejido mucoso de un paciente. Estas aplicaciones implican la modificación de la composición del hidrogel para que contenga una especie conductora. Las especies conductoras adecuadas son electrolitos conductores iónicos, en particular los que se utilizan normalmente en la fabricación de adhesivos conductores utilizados para su aplicación sobre la piel u otra superficie corporal, e incluyen sales inorgánicas ionizables, compuestos orgánicos o combinaciones de ambos. Ejemplos de electrolitos conductores iónicos incluyen, pero no se limitan a, sulfato de amonio, acetato de amonio, acetato de monoetanolamina, acetato de dietanolamina, lactato de sodio, citrato de sodio, acetato de magnesio, sulfato de magnesio, acetato de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, sulfato de calcio, cloruro de litio, perclorato de litio, citrato de sodio y cloruro de potasio, y parejas redox tal como una mezcla de sales férricas y ferrosas tales como sulfatos y gluconatos. Las sales preferidas son el cloruro potásico, el cloruro sódico, el sulfato magnésico y el acetato magnésico, y el cloruro potásico es el más preferido para las aplicaciones de EKG. Aunque prácticamente cualquier cantidad de electrolito puede estar presente en las composiciones adhesivas de la invención, es preferible que cualquier electrolito presente esté en una concentración en el rango de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 15 % en peso de la composición de hidrogel. El procedimiento descrito en Pat. EE. UU. No- 5,846,558 a Nielsen et al. para fabricar electrodos biomédicos puede adaptarse para su uso con las composiciones de hidrogel de la invención, y la divulgación de dicha patente se incorpora por referencia con respecto a los detalles de fabricación. También pueden utilizarse otros procedimientos de fabricación adecuados, como podrán apreciar los expertos en la técnica.

Reticulación

Para ciertas aplicaciones, particularmente cuando se desea una alta resistencia cohesiva, los polímeros de los geles/hidrogeles de la invención pueden reticularse covalentemente. La divulgación contempla que la reticulación puede desearse entre los polímeros del componente gel/hidrogel, pero también puede desearse entre los polímeros del gel/hidrogel y los componentes nanoestructurados de los materiales compuestos de la invención. La invención contempla cualquier medio adecuado para entrecruzar polímeros entre sí, y entrecruzar los polímeros de gel/hidrogel con los componentes de nanoestructura de la invención. Los polímeros del gel/hidrogel pueden reticularse covalentemente con otros polímeros o con las nanoestructuras, ya sea intramolecular o intermolecularmente o mediante enlaces covalentes. En el primer caso, no hay enlaces covalentes que unan los polímeros entre sí o con las nanoestructuras, mientras que, en el segundo caso, hay enlaces covalentes que unen los polímeros entre sí o con las nanoestructuras. Los enlaces cruzados pueden formarse utilizando cualquier medio adecuado, incluyendo el uso de calor, radiación o un agente químico de curado (reticulación). El grado de reticulación debe ser suficiente para eliminar o al menos minimizar el flujo frío bajo compresión. La reticulación también incluye el uso de una tercera molécula, un "reticulante" utilizado en el procedimiento de reticulación.

Para la reticulación térmica, se utiliza un iniciador de polimerización de radicales libres, y puede ser cualquiera de los iniciadores generadores de radicales libres conocidos utilizados convencionalmente en la polimerización de vinilo. Los iniciadores preferidos son peróxidos orgánicos y compuestos azoicos, generalmente utilizados en una cantidad de aproximadamente 0,01 % en peso a 15 % en peso, preferentemente de 0,05 % en peso a 10 % en peso, más preferentemente de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 5 % y más preferentemente de aproximadamente 0,5 % en peso a aproximadamente 4 % en peso del material polimerizable. Los peróxidos orgánicos adecuados incluyen peróxidos de dialquilo tal como el peróxido de t-butilo y el 2,2bis(t-butilperoxi)propano, peróxidos de diacilo tal como el peróxido de benzoilo y el peróxido de acetilo, perésteres tales como el perbenzoato de t-butilo y el per-2-etilhexanoato de t-butilo, perdicarbonatos tales como el peroxidicarbonato de dietilo y el peroxidicarbonato de dicitlohexilo, peróxidos de cetona tal como el peróxido de ciclohexanona y el peróxido de metiletilcetona, e hidroperóxidos tales como el hidroperóxido de cumeno y el hidroperóxido de terc-butilo. Entre los compuestos azoicos adecuados se encuentran el azo bis (isobutironitrilo) y el azo bis (2,4-dimetilvaleronitrilo). La temperatura para la reticulación térmica dependerá de

los componentes reales y puede deducirse fácilmente por un experto en la técnica, pero normalmente oscila entre aproximadamente 80 C. a aproximadamente 200 C.

La reticulación también puede realizarse con radiación, típicamente en presencia de un fotoiniciador. La radiación puede ser ultravioleta, alfa, beta, gamma, haz de electrones y rayos X, aunque se prefiere la radiación ultravioleta. Los fotosensibilizadores útiles son sensibilizadores de tripletes del tipo "abstracción de hidrógeno", e incluyen benzofenona y benzofenona sustituida y acetofenonas tal como bencil dimetil cetal, 4-acriloxibenzofenona (ABP), 1-hidroxi-ciclohexil fenil cetona, 2,2-dietoxiacetofenona y 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona, alfa-cetoles sustituidos tales como 2-metil-2-hidroxiopropiofenona, éteres de benzoína tales como benzoína metil éter y benzoína isopropil éter, éteres de benzoína sustituidos, tales como el éter metílico de anisoína, cloruros de sulfonilo aromáticos, tal como el cloruro de 2-naftaleno sulfonilo, oximas fotoactivas, tal como la 1-fenil-1,2-propanediona-2-(O-etoxicarbonil)-oxima, tioxantonas, incluyendo las tioxantonas sustituidas por alquilo y halógenos, tales como la 2-isopropiltioxantona, la 2-clorotioxantona, la 2,4-dimetiltioxanona, la 2,4 diclorotioxanona y la 2,4-dietiltioxanona, y óxidos de acilfosfina. La radiación que tiene una longitud de onda de 200 a 800 nm, preferentemente de 200 a 500 nm, se prefiere para su uso en el presente documento, y la luz ultravioleta de baja intensidad es suficiente para inducir la reticulación en la mayoría de los casos. Sin embargo, con fotosensibilizadores del tipo de abstracción de hidrógeno, puede ser necesaria una exposición UV de mayor intensidad para lograr una reticulación suficiente. Dicha exposición puede ser proporcionada por un procesador de lámpara de mercurio tal como los disponibles en PPG, Fusion, Xenon y otros. La reticulación también puede inducirse irradiando con radiación gamma o un haz de electrones. Los parámetros de irradiación adecuados, es decir, el tipo y la dosis de radiación utilizados para efectuar la reticulación, serán evidentes para los expertos en la técnica.

Agentes químicos de curado adecuados, también denominados "promotores" químicos de reticulación, incluyen, sin limitación, polimercaptodietéres tales como 2,2-dimercaptodietéter, hexa(3-mercaptopropionato) de dipentaeritritol, bis(3-mercaptopropionato) de etileno, tetra(3-mercaptopropionato) de pentaeritritol, tetratioglicolato de pentaeritritol, dimercaptacetato de polietilenglicol, di(3-mercaptopropionato) de polietilenglicol, tri(3-mercaptopropionato) de trimetiletano, trimetiletano tritioglicolato, trimetilolpropano tri(3-mercaptopropionato), trimetilolpropano tritioglicolato, ditioetano, di- o tritiopropano y 1,6-hexano ditiol. El promotor de la reticulación se añade al polímero hidrofílico no reticulado para promover la reticulación covalente del mismo, o a una mezcla del polímero hidrofílico no reticulado y el oligómero complementario, para proporcionar la reticulación entre los dos componentes.

Los polímeros y/o nanoestructuras también pueden reticularse antes de la mezcla con el oligómero complementario. En tal caso, puede preferirse sintetizar el polímero en forma reticulada, mezclando un precursor monomérico del polímero con un comonomero multifuncional y copolimerizando. Ejemplos de precursores monoméricos y productos poliméricos correspondientes son los siguientes: Precursores de N-vinilamida para un producto de poli(N-vinilamida); N-alquilacrilamidas para un producto de poli(N-alquilacrilamida); ácido acrílico para un producto de ácido poliacrílico; ácido metacrílico para un producto de ácido polimetacrílico; acrilonitrilo para un producto de poli(acrilonitrilo); y N-vinilpirrolidona (NVP) para un producto de poli(vinilpirrolidona) (PVP). La polimerización puede realizarse a granel, en suspensión, en solución o en emulsión. Se prefiere la polimerización en solución, y se prefieren particularmente los disolventes orgánicos polares tales como el acetato de etilo y los alcanosoles inferiores (por ejemplo, etanol, alcohol isopropílico, etc.). Para la preparación de polímeros vinílicos hidrofílicos, la síntesis tendrá lugar típicamente mediante un procedimiento de polimerización por radicales libres en presencia de un iniciador de radicales libres como se ha descrito anteriormente. El comonomero multifuncional incluye, por ejemplo, bisacrilamida, ésteres acrílicos o metacrílicos de dioles tales como butanodiol y hexanodiol (se prefiere el diacrilato de 1,6-hexano diol), otros acrilatos tales como tetraacrilato de pentaeritritol y diacrilato de 1,2-etilenglicol, y diacrilato de 1,12-dodecanodiol. Otros monómeros reticulantes multifuncionales útiles son los (met)acrilatos multifuncionales oligoméricos y poliméricos, por ejemplo, diacrilato de poli(óxido de etileno) o dimetacrilato de poli(óxido de etileno); agentes reticulantes polivinílicos tal como el divinilbenceno sustituido y no sustituido; y acrilatos de uretano difuncionales tal como EBECRYL 270 y EBECRYL 230 (uretanos acrilados de peso molecular promedio 1500 y peso molecular promedio 5000, respectivamente—ambos disponibles en UCB de Smyrna, Ga.), y combinaciones de los mismos. Si se emplea un agente reticulante químico, la cantidad utilizada será preferentemente tal que la relación en peso entre el agente reticulante y el polímero hidrofílico esté en el intervalo de 1:100 a 1:5 aproximadamente. Para conseguir una mayor densidad de reticulación, si se desea, se combina la reticulación química con el curado por radiación.

Nanoestructuras

Los componentes de nanoestructura de la invención pueden estar en cualquier forma adecuada, incluyendo fibras, filamentos, secciones de malla, filamentos o redes ramificados, láminas o partículas conformadas. Las nanoestructuras también pueden comprender cualquier grupo funcional químico adecuado para facilitar la reticulación covalente o no covalente entre las nanoestructuras y los polímeros de los hidrogeles de la invención. Los procedimientos, técnicas y materiales para fabricar y funcionalizar nanoestructuras son bien conocidos en la técnica.

En ciertas realizaciones, se utilizan procedimientos de microfabricación para fabricar las nanoestructuras de la invención. En diversas realizaciones, los dispositivos divulgados pueden ensamblarse y/o fabricarse utilizando cualquier técnica de microfabricación adecuada. Tales procedimientos y técnicas son ampliamente conocidos en la técnica.

- 5 Los procedimientos de microfabricación que pueden utilizarse en la fabricación de las nanoestructuras divulgadas en el presente documento incluyen litografía; técnicas de grabado, tales como láser, grabado por plasma, fotolitografía o grabado químico, tal como químico húmedo, seco y eliminación de fotoresistencia; o mediante técnicas de forma libre sólida, incluyendo la impresión tridimensional (3DP), la estereolitografía (SLA), el sinterizado selectivo por láser (SLS), la fabricación de partículas balísticas (BPM) y el modelado por deposición de fusión (FDM); mediante micromecanizado; oxidación térmica del silicio; galvanoplastia y galvanoplastia química; procedimientos de difusión, tal como la difusión de boro, fósforo, arsénico y antimonio; implantación de iones; deposición de películas, tal como la evaporación (filamento, haz de electrones, flash y cobertura de sombra y escalón), pulverización catódica, deposición química en fase vapor (CVD), epitaxia (fase vapor, fase líquida y haz molecular), galvanoplastia, serigrafía, laminación o mediante combinaciones de los mismos. Véase Jaeger, *Introduction to Microelectronic Fabrication* (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1988); Runyan, et al., *Semiconductor Integrated Circuit Processing Technology* (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1990); *Proceedings of the IEEE Micro Electro Mechanical Systems Conference 1987-1998*; Rai-Choudhury, ed., *Handbook of Microlithography, Micromachining & Microfabrication* (SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, Wash. 1997). La selección del material que se utiliza como molde determina cómo se configura la superficie para formar la estructura ramificada.

- Por ejemplo, se pueden utilizar procedimientos del estado de la técnica para la fabricación de Sistemas Micro Electro Mecánicos (MEMS) que utilizan procedimientos fotolitográficos y procedimientos derivados de la industria de semiconductores. Entre los procedimientos desarrollados más recientemente se incluye la "litografía blanda" (Whitesides et al, *Angew chem. Int ed*, 37; 550-575, (1998)) y tectónica microfluídica (Pat. EE.UU. No. 6,488,872, Beebe et al., *Nature*; 404:588-59 (2000)). Entre las revisiones y otras discusiones sobre la fabricación de microdispositivos de polímeros se incluyen Madou, M. J. *Fundamentals of Microfabrication. The Science of Miniaturization*; 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, 1997; Becker, H., y Locascio, L. E. "Polymer microfluidic devices." *Talanta*, 56(2):267-287, 2002; Quake, S. R., y Scherer, A. "From micro- to nanofabrication with soft materials." *Science*, 290(5496):1536-1540, 2000; y Whitesides, G. M., y Stroock, A. D. "Flexible methods for microfluidics." *Physics Today*, 54(6):42-48, 2001, cada uno de los cuales se incorporan en el presente documento como referencia.

- Las nanoestructuras de la invención también pueden fabricarse mediante hilado electrostático (también denominado electrohilado). La técnica de electrohilado de líquidos y/o soluciones capaces de formar fibras, es bien conocida y ha sido descrita en un número de patentes, tales como, por ejemplo, Pat. EE. UU. Nos. 4,043,331 y 5,522,879. El procedimiento de electrohilado implica generalmente la introducción de un líquido en un campo eléctrico, de modo que se provoca que el líquido produzca fibras. Por lo general, estas fibras son atraídas hacia un conductor con un potencial eléctrico atractivo para su recogida. Durante la conversión del líquido en fibras, éstas se endurecen y/o secan. Este endurecimiento y/o secado puede producirse por enfriamiento del líquido, es decir, cuando el líquido es normalmente un sólido a temperatura ambiente; por evaporación de un disolvente, por ejemplo, por deshidratación (endurecimiento inducido físicamente); o por un mecanismo de curado (endurecimiento inducido químicamente).

- El procedimiento de hilado electrostático se ha dirigido típicamente hacia el uso de las fibras para crear una estera u otro material no tejido, como se divulga, por ejemplo, en Pat. EE. UU. No. 4,043,331. Las nanofibras de entre 50 nm y 5 micrómetros de diámetro pueden electrohilarse para formar un no tejido o una malla de nanofibras alineadas. Debido a los pequeños diámetros de las fibras, los textiles electrohilados poseen intrínsecamente una superficie muy elevada y un tamaño de poro pequeño. Estas propiedades hacen de los tejidos electrohilados candidatos potenciales para una serie de aplicaciones, entre ellas: membranas, andamiaje de tejidos y otras aplicaciones biomédicas.

- Las fibras hiladas electrostáticamente pueden producirse teniendo diámetros muy finos. Los parámetros que influyen en el diámetro, la consistencia y la uniformidad de las fibras electrohiladas incluyen la concentración (carga) de material polimérico y de reticulante en la combinación de formación de fibras, la tensión aplicada y la distancia del colector de agujas. De acuerdo con una realización de la presente invención, una nanofibra tiene un diámetro que oscila entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 100 µm. En otras realizaciones, la nanofibra tiene un diámetro comprendido entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 1000 nm. Además, la nanofibra puede tener una relación de aspecto en un rango de al menos aproximadamente 10 a aproximadamente al menos 100. Se apreciará que, debido al diámetro muy pequeño de las fibras, éstas tienen una gran superficie por unidad de masa. Esta elevada relación superficie/masa permite que las soluciones o líquidos formadores de fibras se transformen de materiales formadores de fibras líquidos o solvatados en nanofibras sólidas en fracciones de segundo.

- El material polimérico utilizado para formar las nanofibras/nanoestructuras de la invención puede seleccionarse de entre cualquier material de formación de fibras que sea compatible con los agentes reticulantes.

Dependiendo de la aplicación prevista, el material polimérico formador de fibras puede ser hidrofílico, hidrófobo o anfifílico. Además, el material polimérico formador de fibras puede ser un material polimérico térmicamente sensible.

Los polímeros sintéticos o naturales, biodegradables o no biodegradables pueden formar las nanofibras/nanoestructuras de la invención. Un "polímero sintético" se refiere a un polímero preparado sintéticamente y que incluye unidades monoméricas no naturales. Por ejemplo, un polímero sintético puede incluir unidades monoméricas no naturales tales como unidades de acrilato o acrilamida. Los polímeros sintéticos suelen formarse mediante reacciones de polimerización tradicionales, tales como polimerizaciones por adición, condensación o radicales libres. Los polímeros sintéticos también pueden incluir los que tienen unidades monoméricas naturales, tales como las unidades monoméricas de péptidos, nucleótidos y sacáridos de origen natural en combinación con unidades monoméricas no naturales (por ejemplo, derivados sintéticos de péptidos, nucleótidos y sacáridos). Estos tipos de polímeros sintéticos pueden producirse mediante técnicas sintéticas estándar, tal como la síntesis en fase sólida, o de forma recombinante, cuando esté permitido.

Un "polímero natural" se refiere a un polímero que está preparado de forma natural, recombinante o sintética y que consta de unidades monoméricas naturales en el esqueleto polimérico. En algunos casos, el polímero natural puede modificarse, procesarse, derivatizarse o tratarse de otro modo para cambiar las propiedades químicas y/o físicas del polímero natural. En estos casos, el término "polímero natural" se modificará para reflejar el cambio en el polímero natural (por ejemplo, un "polímero natural derivatizado", o un "polímero natural deglicosilado").

Los materiales de nanofibra, por ejemplo, pueden incluir tanto materiales de polímero de adición como de polímero de condensación tales como poliolefina, poliacetato, poliamida, poliéster, éter y éster de celulosa, polisulfuro de alquileno, óxido de poliarileno, polisulfona, polímeros de polisulfona modificados y mezclas de los mismos. Los materiales ejemplares dentro de estas clases genéricas incluyen polietileno, poli(epsilon-caprolactona), poli(lactato), poli(glicolato), polipropileno, poli(cloruro de vinilo), polimetilmetacrilato (y otras resinas acrílicas), poliestireno y sus copolímeros (incluyendo los copolímeros en bloque de tipo ABA), poli(fluoruro de vinilideno), poli(cloruro de vinilideno), alcohol polivinílico en diversos grados de hidrólisis (87% a 99,5%) en formas reticuladas y no reticuladas. Los polímeros de adición ejemplares tienden a ser vítreos (una Tg superior a la temperatura ambiente). Este es el caso del cloruro de polivinilo y el polimetilmetacrilato, las composiciones poliméricas de poliestireno o las aleaciones, o de baja cristalinidad en el caso del fluoruro de polivinilideno y los materiales de alcohol polivinílico.

En algunas realizaciones de la invención los materiales de nanofibra/nanoestructura son polímeros de condensación de poliamida. En realizaciones más específicas, el polímero de condensación de poliamida es un polímero de nailon. El término "nailon" es un nombre genérico para todas las poliamidas sintéticas de cadena larga. Otro nailon puede fabricarse por policondensación de caprolactama epsilon en presencia de una pequeña cantidad de agua. Esta reacción forma un nailon-6 (fabricado a partir de una lactama cíclica, también conocida como ácido epsilon-aminocaproico) que es una poliamida lineal. Además, también se contemplan los copolímeros de nailon. Los copolímeros pueden fabricarse combinando diversos compuestos diamínicos, diversos compuestos diácidos y diversas estructuras de lactama cíclica en una mezcla de reacción y, a continuación, formando el nailon con materiales monoméricos colocados aleatoriamente en una estructura de poliamida. Por ejemplo, un material de nailon 6,6-6,10 es un nailon fabricado a partir de hexametildiamina y una mezcla de diácidos C6 y C10. Un nailon 6-6,6-6,10 es un nailon fabricado por copolimerización de ácido epsilon-aminocaproico, hexametildiamina y una mezcla de un material diácido C6 y otro C10.

Los copolímeros en bloque también pueden utilizarse como materiales de nanofibras. Al preparar una composición para la preparación de nanofibras, puede elegirse un sistema disolvente tal que ambos bloques sean solubles en el disolvente. Un ejemplo es un polímero ABA (estireno-EP-estireno) o AB (estireno-EP) en disolvente de cloruro de metileno. Ejemplos de tales copolímeros en bloque son un tipo Kraton de polímeros en bloque AB y ABA que incluyen estireno/butadieno y estireno/butadieno hidrogenado (etileno propileno), un tipo Pebax de epsilon-caprolactama/óxido de etileno y un tipo Sympatex de poliéster/óxido de etileno y poliuretanos de óxido de etileno e isocianatos.

Polímeros de adición tales como fluoruro de polivinilideno, poliestireno sindiotáctico, copolímeros de fluoruro de vinilideno y hexafluoropropileno, alcohol polivinílico, acetato de polivinilo, polímeros de adición amorfos, tal como el poli(acrilonitrilo) y sus copolímeros con ácido acrílico y metacrilatos, el poliestireno, el poli(cloruro de vinilo) y sus diversos copolímeros, el poli(metacrilato de metilo) y sus diversos copolímeros, pueden hilarse en disolución con relativa facilidad porque son solubles a bajas presiones y temperaturas. Los polímeros muy cristalinos, como el polietileno y el polipropileno, suelen requerir disolventes a alta temperatura y alta presión si se van a hilar en disolución.

Las nanofibras también pueden formarse a partir de composiciones poliméricas que comprenden dos o más materiales poliméricos en mezcla polimérica, formato de aleación o en una estructura reticulada unida químicamente. Se pueden mezclar dos materiales poliméricos relacionados para dotar a la nanofibra de propiedades beneficiosas. Por ejemplo, un policloruro de vinilo de alto peso molecular puede mezclarse con un

policloruro de vinilo de bajo peso molecular. Del mismo modo, un material de nailon de alto peso molecular puede mezclarse con un material de nailon de bajo peso molecular. Además, pueden mezclarse diferentes especies de un género polimérico general. Por ejemplo, un material de estireno de alto peso molecular puede mezclarse con un poliestireno de bajo peso molecular y alto impacto. Un material de nailon-6 puede mezclarse con un copolímero de nailon, tal como un copolímero de nailon-6; 6,6; 6,10. Además, un alcohol polivinílico con un bajo grado de hidrólisis, tal como un alcohol polivinílico hidrolizado al 87%, puede mezclarse con un alcohol polivinílico totalmente hidrolizado o superhidrolizado con un grado de hidrólisis de entre el 98 y el 99,9% o superior. Todos estos materiales en mezcla pueden reticularse utilizando mecanismos de reticulación adecuados. Los nilones pueden reticularse utilizando agentes reticulantes reactivos con el átomo de nitrógeno del enlace amida. Los materiales de alcohol polivinílico pueden reticularse utilizando materiales reactivos al hidroxilo tal como monoaldehídos, tal como formaldehído, ureas, resina de melamina-formaldehído y sus análogos, ácidos bóricos y otros compuestos inorgánicos, dialdehídos, diácidos, uretanos, epóxidos y otros agentes reticulantes conocidos. El reactivo reticulante reacciona y forma enlaces covalentes entre las cadenas poliméricas para mejorar sustancialmente el peso molecular, la resistencia química, la resistencia general y la resistencia a la degradación mecánica.

También pueden utilizarse polímeros biodegradables en la preparación de las nanoestructuras de la invención. Ejemplos de clases de polímeros sintéticos que se han estudiado como materiales biodegradables son los poliésteres, las poliamidas, los poliuretanos, los polioctoésteres, la policaprolactona (PCL), los poliminocarbonatos, los carbonatos alifáticos, los polifosfazenos, los polianhídridos y sus copolímeros. Ejemplos específicos de materiales biodegradables que pueden utilizarse en relación con, por ejemplo, dispositivos médicos implantables incluyen polilactida, poliglicolida, polidioxanona, poli(lactida-co-glicolida), poli(glicolida-co-polidioxanona), polianhídridos, poli(glicolida-co-trimetileno carbonato) y poli(glicolida-co-caprolactona). También pueden utilizarse mezclas de estos polímeros con otros polímeros biodegradables.

En algunas realizaciones, las nanofibras son polímeros no biodegradables. No biodegradable se refiere a polímeros que generalmente no son capaces de degradarse no enzimática, hidrolítica o enzimáticamente. Por ejemplo, el polímero no biodegradable es resistente a la degradación que pueden causar las proteasas. Los polímeros no biodegradables pueden incluir polímeros naturales o sintéticos.

La inclusión de agentes reticulantes dentro de la composición que forma la nanofibra, permite que la nanofibra sea compatible con una amplia gama de superficies de soporte. Los agentes reticulantes pueden utilizarse solos o en combinación con otros materiales para proporcionar una característica superficial deseada.

Los agentes reticulantes adecuados incluyen materiales monoméricos (materiales de molécula pequeña) o poliméricos que tienen al menos dos grupos activables reactivos latentes que son capaces de formar enlaces covalentes con otros materiales cuando se someten a una fuente de energía tal como radiación, energía eléctrica o térmica. En general, los grupos activables reactivos latentes son entidades químicas que responden a energía o estímulos externos específicos aplicados para generar especies activas con enlace covalente resultante a una estructura química adyacente. Los grupos reactivos latentes son aquellos que conservan sus enlaces covalentes en condiciones de almacenamiento, pero que forman enlaces covalentes con otras moléculas al ser activados por una fuente de energía externa. En algunas realizaciones, los grupos reactivos latentes forman especies activas tales como radicales libres. Estos radicales libres pueden incluir nitrenos, carbinas o estados excitados de cetonas tras la absorción de energía eléctrica, electroquímica o térmica aplicada externamente. Se recogen diversos ejemplos de grupos reactivos latentes conocidos o disponibles comercialmente en Pat. EE.UU. Nos. 4,973,493; 5,258,041; 5,563,056; 5,637,460; o 6,278,018.

Por ejemplo, pueden utilizarse los fotocruzantes multifuncionales disponibles comercialmente basados en triclorometil triazina disponibles bien en Aldrich Chemicals, Produits Chimiques Auxiliaires et de Syntheses, (Longjumeau, Francia), Shin-Nakamura Chemical, Midori Chemicals Co., Ltd. o Panchim S. A. (Francia). Los ocho compuestos incluyen 2,4,6-tris(triclorometil)-1,3,5-triazina, 2-(metil)-4,6-bis(triclorometil)-1,3,5-triazina, 2-(4-metoxinaftil)-4,6-bis(triclorometil)-1,3,5-triazina, 2-(4-metoxinaftil)-4,6-bis(triclorometil)-1,3,5-triazina, 4-(4-carboxilfenil)-2,6-bis(triclorometil)-1,3,5-triazina, 2-(4-metoxifenil)-4,6-bis(triclorometil)-1,3,5-triazina, 2-(1-et-2'-furyl)-4,6-bis(triclorometil)-1,3,5-triazina y 2-(4-metoxiestiril)-4,6-bis(triclorometil)-1,3,5-triazina.

Procedimientos de uso y realizaciones ejemplares

Las composiciones de gel/hidrogel/nanoestructura de la invención pueden utilizarse ventajosamente en numerosas situaciones de reparación de tejidos, así como en otras aplicaciones, tales como proporcionar recubrimientos en catéteres y otros dispositivos quirúrgicos e implantes. Las composiciones de gel/hidrogel/nanoestructura de la invención también pueden utilizarse para administrar agentes activos descritos en el presente documento, tal como antibióticos, factores de crecimiento y agentes inmunosupresores.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para curar un defecto de tejido blando que comprende aplicar un material compuesto a un defecto de tejido blando, en el que el material compuesto incluye un gel y una nanoestructura dispuesta dentro del gel.

Se apreciará que las propiedades ventajosas de las composiciones de hidrogeles/nanoestructuras descritas en el presente documento incluyen la capacidad de: 1) facilitar la caracterización y el control de calidad; 2) integrarse en las matrices tisulares existentes; 3) incorporarse directamente a matrices de nueva formación; 4) incluir directamente células y factores bioactivos; 5) mantener la biocompatibilidad; 6) controlar la biorreabsorción; 7) moldearse fácilmente en formas anatómicas complicadas debido a la mayor rigidez estructural debida a las nanoestructuras; y 8) presentar las propiedades mecánicas de los tejidos nativos, tal como el cartílago articular.

En una aplicación, las composiciones de material compuesto de hidrogel/nanoestructura de la invención pueden utilizarse para reparar tejido cartilaginoso. Entre los procedimientos quirúrgicos actuales de base biológica para la reparación del cartílago figuran la implantación de condrocitos autólogos, la perforación, la condroplastia por abrasión, la microfractura y la artroplastia en mosaico. Todos estos procedimientos tratan únicamente lesiones focales del cartílago articular, y no superficies articulares denudadas de cartílago tal como las que se observan en la artrosis grave y la artritis reumatoide. Además, utilizan tapones de tejido cartilaginoso o condrocitos expandidos extraídos del paciente para rellenar los defectos cartilaginosos. Se espera que estos tejidos o condrocitos rellenen el defecto sintetizando material totalmente de novo, tal como cartílago hialino de nueva síntesis, que se haya integrado con las matrices cartilaginosas existentes y tenga las propiedades biomecánicas del cartílago normal. Sin embargo, todos estos procedimientos promueven la formación de un tejido reparador (fibrocartílago) en lugar de verdadero cartílago hialino, y se cree que el daño mecánico adicional al fibrocartílago predispone a la articulación a la osteoartritis. Además, la disponibilidad de cartílago endógeno como material de reparación es bastante limitada y su adquisición presenta sus propios riesgos y morbilidad para el paciente. Como se desprende de la discusión anterior, las composiciones de hidrogel/nanoestructura resultantes divulgadas en el presente documento presentan materiales prácticos para nuevas terapias prometedoras en pacientes que padecen enfermedades degenerativas del cartílago.

Como se describe en el presente documento, las presentes composiciones de hidrogel/nanoestructura pueden prepararse teniendo propiedades ampliamente variables que son adecuadas para cualquier número de implantación o aumento de tejido sintético, así como otras aplicaciones clínicas. Como ya se ha descrito, los presentes materiales pueden utilizarse para reparar defectos del cartílago producidos como consecuencia de lesiones o enfermedades. Los defectos debidos a lesiones que pueden repararse de este modo pueden estar relacionados con el deporte o con accidentes, y pueden afectar sólo a la capa superficial del cartílago o incluir el hueso subcondral subyacente. Entre los defectos debidos a enfermedades que pueden repararse utilizando las composiciones descritas en el presente documento se incluyen los resultantes de la osteoartritis y la artritis reumatoide. Ya sea por lesión o enfermedad, estos defectos pueden producirse en el cartílago maduro o en el cartílago de crecimiento. Las formulaciones de hidrogeles para el cartílago sintético de la placa de crecimiento pueden requerir la inclusión de material de andamiaje no sustituido para permitir la biorreabsorción controlada del biomaterial durante el crecimiento.

Otro campo en el que las composiciones de hidrogel/nanoestructura descritas en el presente documento pueden ser útiles es la reparación, reconstrucción o aumento de tejidos cartilaginosos, así como blandos de la cabeza y el cuello. La disponibilidad de biomateriales para el aumento de tejidos blandos y la reconstrucción de cabeza y cuello ha seguido siendo un reto fundamental en el campo de la cirugía plástica y reconstructiva. Se han realizado importantes investigaciones e inversiones para desarrollar un material con una compatibilidad biológica y una vida útil adecuadas. Los resultados de esta investigación no han sido prometedores. Cuando se colocan en animales inmunocompetentes, se ha demostrado que la integridad estructural de los materiales propuestos actualmente falla a medida que se absorbe la estructura. Además, aunque los materiales sintéticos convencionales ofrecen una vida útil excelente, presentan ciertos escollos inevitables. Por ejemplo, las siliconas han estado plagadas de problemas de seguridad y efectos inmunitarios a largo plazo. Los polímeros sintéticos PTFE (gortex) y silastic ofrecen menor reactividad tisular pero no ofrecen integración tisular y pueden representar riesgos a largo plazo de infecciones por cuerpos extraños y extrusión. Los materiales descritos en esta solicitud serán útiles para preparar un material sintético de andamiaje de tejidos blandos para el aumento o la reparación de defectos de tejidos blandos de la cabeza y el cuello. En particular, las composiciones de hidrogel/nanoestructura, que son no inflamatorias, no inmunogénicas y que pueden prepararse con el grado apropiado de viscoelasticidad (véase la descripción en el presente documento), podrían utilizarse como un material de andamiaje implantable eficaz.

Además, las presentes composiciones de hidrogel/nanoestructura pueden utilizarse, por ejemplo, como materiales novedosos, biocompatibles y biocomplacientes para preparar implantes de cartílago que se utilizan frecuentemente en procedimientos reconstructivos de la cabeza y el cuello para reparar defectos cartilaginosos u óseos secundarios a traumatismos o anomalías congénitas. Las aplicaciones específicas de la oreja incluyen la otoplastia y la reconstrucción auricular, que a menudo se realizan para reparar defectos cartilaginosos debidos a traumatismos, neoplasias (es decir, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales y melanoma) y defectos congénitos tal como la microtia. Las aplicaciones específicas de la nariz incluyen procedimientos cosméticos y reconstructivos de la nariz y el tabique nasal. El aumento de la giba dorsal y los injertos de punta, escudo y separador se utilizan con frecuencia en la rinoplastia estética. La reconstrucción nasal tras traumatismos, neoplasias, enfermedades autoinmunes tal como la granulomatosis de Wegeners o defectos congénitos requiere cartílago para su reparación. Las perforaciones septales son difíciles de tratar y

a menudo fracasan. Los injertos de cartílago serían ideales para estas aplicaciones, ya que a menudo no se dispone de cartílago autólogo o de donante. Las aplicaciones específicas de la garganta incluyen la reconstrucción laringotraqueal, que en los niños suele requerir la extracción de cartílago costal, lo que no está exento de morbilidad. El cartílago auricular y septal suele ser inadecuado para esta aplicación. Los materiales cartilaginosos sintéticos preparados a partir de los hidrogeles aquí divulgados pueden sintetizarse para adaptarse a cada una de las aplicaciones anteriores, basándose en el ajuste de parámetros de la síntesis de hidrogeles tal como la concentración de reactivos, la sustitución y las tasas de reticulación. La reconstrucción laringotraqueal suele realizarse en caso de estrechamiento de las vías respiratorias debido a estenosis subglótica o traqueal. La etiología puede ser traumática (por ejemplo, traumatismo por intubación o traqueotomía) o idiopática. Otras posibilidades incluyen el aumento del mentón y las mejillas, y el uso en la reparación del ectropión del párpado inferior, además de numerosas aplicaciones craneofaciales. Cabe señalar que estas aplicaciones pueden no necesitar un cartílago con las propiedades mecánicas exactas del cartílago articular. También puede ser deseable la inclusión de una población celular o de agentes bioactivos.

Las composiciones de hidrogel/nanoestructura descritas en el presente documento también pueden utilizarse para la reparación y el estrechamiento de la cavidad nasal, normalmente tras una resección quirúrgica demasiado agresiva, para evitar la acumulación crónica de líquido en los conductos nasales que conduce a la infección y la incrustación. Otra aplicación prometedora es la reconstrucción laringotraqueal tanto en niños como en adultos, como resultado de una lesión laringotraqueal debida, por ejemplo, a la intubación durante un procedimiento quirúrgico tal como la cirugía cardiovascular. Las composiciones de hidrogel/nanoestructura descritas en el presente documento también pueden utilizarse para proporcionar sustituciones de anillos cricoideos para proteger la arteria carótida tras la resección del cuello por cáncer; la composición de la invención puede colocarse entre la arteria carótida y la piel como barrera protectora de la arteria carótida frente a la pérdida de la barrera cutánea. Como capa protectora durante la repoblación neuronal de un nervio resecado: a menudo, el tejido fibroso se forma más rápidamente que la repoblación neuronal, impidiendo su eventual formación. La colocación de las terminaciones nerviosas dentro de un tubo prefabricado con una composición de hidrogel/nanoestructura de la invención podría excluir la formación de tejido fibroso del lugar de la repoblación.

Las composiciones de hidrogel/nanoestructura de la invención también pueden utilizarse para la reparación de defectos de tejidos blandos de cualquier órgano interno o externo. Por ejemplo, los materiales de la invención pueden utilizarse para el aumento del mentón y las mejillas, y en la reparación del ectropión del párpado inferior, además de numerosas aplicaciones craneofaciales. Con fines cosméticos y reconstructivos en zonas distintas de la cabeza y el cuello, por ejemplo, tal como implantes mamarios para el aumento de mamas, como sellador de heridas, por ejemplo, para rellenar el vacío dejado tras la extirpación de ganglios linfáticos (por ejemplo, debido a un cáncer) en la mama o el cuello, para sellar los linfáticos y reducir el drenaje incontrolado de fluidos en la zona de resección que puede provocar infecciones y otras complicaciones.

Además de los usos anteriores, las composiciones de hidrogel/nanoestructura descritas en el presente documento pueden usarse en otras aplicaciones de ingeniería tisular para producir tejidos ortopédicos sintéticos, incluyendo, pero sin limitarse a, hueso, tendón, ligamento, menisco y disco intervertebral, usando estrategias y metodologías similares a las descritas anteriormente para la síntesis de formas artificiales de cartílago. Las composiciones de hidrogel/nanoestructura también pueden utilizarse para fabricar tejidos sintéticos no ortopédicos, incluyendo, entre otros, cuerdas vocales, vítreo, válvulas cardíacas, hígado, páncreas y riñón, utilizando estrategias y metodologías similares a las descritas anteriormente para la síntesis de formas artificiales de cartílago.

Otro campo en el que pueden utilizarse las composiciones de hidrogel/nanoestructura divulgadas en el presente documento es en aplicaciones gastrointestinales en las que es necesario tratar o prevenir la formación de tejido cicatricial o estenosis en órganos abdominales o gastrointestinales. Ya existen varios productos en diversas fases de aprobación clínica y por la FDA, que generalmente se denominan "hidrogeles", que están diseñados o destinados a ser útiles en el tratamiento y la prevención de la formación de cicatrices y/o estenosis. Los materiales de la presente invención son superiores a otros hidrogeles conocidos en el sentido de que los aquí divulgados pueden incluir una nanoestructura que puede proporcionar soporte, forma y resistencia a los materiales de hidrogel. Las composiciones de hidrogel/nanoestructura divulgadas en el presente documento pueden utilizarse en aplicaciones similares a las que se utilizan o pretenden utilizar los hidrogeles ya conocidos, incluyendo las siguientes: para el tratamiento de estenosis o cicatrices del tracto gastrointestinal. El tratamiento consiste en inyectar el material de hidrogel en el lugar de una estenosis prevista para evitar la cicatrización, o en un lugar de estenosis existente después de la terapia para ampliar el tracto GI estrechado y evitar que la estenosis vuelva a producirse.

Los materiales de la invención también pueden utilizarse para el tratamiento de estenosis esofágicas. Las estenosis esofágicas son una complicación frecuente de la enfermedad por reflujo gastroesofágico (GERD). La GERD está causada por el reflujo de ácido, bilis y otros contenidos gástricos perjudiciales hacia el esófago, que lesionan las células de revestimiento esofágico. Aproximadamente el 7-23% de los pacientes con GERD desarrollan una estenosis esofágica, o cicatrización fibrosa del esófago. Las cicatrices esofágicas también pueden estar causadas por terapias ablativas utilizadas para tratar el esófago de Barrett. La principal

complicación de estas terapias ablativas es que la lesión ablativa se extiende demasiado profundamente en la pared esofágica y da lugar a una cicatriz o estenosis esofágica. Las estenosis esofágicas impiden la deglución normal y son una causa importante de morbilidad en los pacientes. Los materiales descritos en el presente documento pueden utilizarse para tratar o prevenir las estenosis esofágicas resultantes de la GERD, el esófago de Barrett y las terapias ablativas esofágicas.

Los materiales compuestos de la invención también pueden utilizarse para el tratamiento de la enfermedad de Crohn. La enfermedad de Crohn provoca estenosis o cicatrices que bloquean o estrechan el lumen del intestino, impidiendo su funcionamiento normal. Los presentes materiales pueden ser útiles para tratar o prevenir dichas estenosis.

Los materiales compuestos también pueden utilizarse en procedimientos para tratar la colangitis esclerosante primaria (PSC). La PSC es una enfermedad rara de los conductos biliares del hígado. Los conductos biliares forman una red ramificada dentro del hígado y salen de éste a través de dos ramas principales que se combinan en el conducto biliar común que drena la bilis del hígado y la vesícula biliar hacia el duodeno. Los conductos biliares tienen un diámetro muy estrecho, ya que normalmente sólo miden hasta 2 mm en sus porciones más distales, y sin embargo deben drenar litros de bilis cada día desde el hígado hasta el duodeno. Cualquier obstrucción de estos conductos puede provocar una afección grave conocida como ictericia, que permite que se acumulen en el organismo muchas toxinas y, sobre todo, productos de descomposición de la hemoglobina. La PSC es una enfermedad cicatricial o de estructuración de los conductos biliares dentro del hígado y en los conductos biliares extrahepáticos descritos anteriormente que conectan el hígado con el intestino delgado. Las estenosis del conducto biliar de la PSC pueden tratarse o prevenirse con las presentes composiciones de hidrogel/nanoestructura.

Los materiales compuestos de la invención también pueden utilizarse para tratar la pancreatitis crónica. La pancreatitis crónica es una enfermedad inflamatoria crónica del páncreas que puede complicarse con cicatrices o estenosis de los conductos pancreáticos. Estas estenosis bloquean el drenaje del jugo pancreático, que normalmente debe salir del páncreas a través de un sistema de conductos o conductos de drenaje hacia el intestino delgado. El jugo pancreático contiene muchas enzimas digestivas y otros elementos importantes para la digestión normal y la absorción de nutrientes. La obstrucción o estrechamiento de los conductos pancreáticos por pancreatitis crónica puede dar lugar a complicaciones graves en las que el páncreas se autodigiere y forma infecciones y/o abscesos abdominales potencialmente mortales. Las estenosis pancreáticas de la pancreatitis crónica pueden tratarse o prevenirse con los presentes hidrogeles.

Las composiciones descritas en la actualidad también pueden utilizarse para el tratamiento de estenosis de conductos biliares y pancreáticos inducidas por cálculos biliares. Los cálculos biliares son un trastorno muy común, una de cuyas principales complicaciones es la formación de estenosis de los conductos biliares y pancreáticos, que pueden tratarse o prevenirse con los hidrogeles para el tratamiento de la enfermedad intestinal isquémica. Los intestinos son propensos a la formación de cicatrices o estenosis cuando su riego sanguíneo se ve comprometido. La alteración del flujo sanguíneo se denomina isquemia y puede estar causada por muchas patologías, tal como enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, hipotensión, hipovolemia, hipoalbuminemia inducida por enfermedades renales o hepáticas, vasculitis, enfermedades inducidas por fármacos y muchas otras. El resultado final de todas estas etiologías puede dar lugar a estenosis intestinales que bloquean el intestino e impiden su funcionamiento normal. Los presentes materiales compuestos de hidrogel/nanoestructura pueden utilizarse para tratar o prevenir las estenosis intestinales isquémicas.

Las composiciones de la invención también pueden usarse para el tratamiento de estenosis intestinales inducidas por radiación. La radioterapia para el cáncer se asocia a numerosas morbilidades, entre las que destaca la formación de estenosis intestinales. Los presentes materiales compuestos de hidrogel pueden utilizarse para tratar o prevenir las estenosis intestinales inducidas por la radiación.

Además de fabricar tejidos sintéticos o reparar tejidos nativos, los materiales compuestos de hidrogel/nanoestructura aquí divulgados también pueden utilizarse para proporcionar un recubrimiento para estructuras o dispositivos no biológicos que se utilizarán en cirugía o de otro modo para la implantación in vivo, tales como instrumentos quirúrgicos, o prótesis de cerámica o metal. Dicho recubrimiento proporcionaría una barrera entre el material no biológico del dispositivo y el tejido vivo. La función de los hidrogeles como barrera para dispositivos no biológicos incluye, entre otras cosas: 1) prevención de la absorción de macromoléculas y/o células en las superficies de dispositivos no biológicos, que puede dar lugar a incrustaciones de proteínas o trombosis en la superficie del dispositivo; 2) presentación de una superficie no tóxica, no inflamatoria, no inmunogénica y biológicamente compatible para dispositivos fabricados con materiales que de otro modo no serían biológicamente compatibles; 3) compatibilidad con la función del dispositivo, tal como la difusión de glucosa para un sensor de glucosa, la transmisión de fuerza mecánica para un sensor de presión, o la endotelización de un injerto vascular o stent; 4) mejora de la función del dispositivo, por ejemplo proporcionando una barrera de carga a una barrera de tamaño existente en un nefrón artificial basado en MEMS; 5) incorporación a dispositivos no biológicos de una población celular viable atrapada en un entorno acuoso fisiológicamente compatible; y 6) inclusión de fármacos o factores bioactivos tales como factores de crecimiento,

agentes antivirales, antibióticos o moléculas de adhesión diseñados para fomentar la vascularización, epitelización o endotelización del dispositivo.

Basándose en lo anterior, los materiales compuestos de hidrogel/nanoestructura de la presente invención pueden usarse para proporcionar un recubrimiento no alergénico para una variedad de dispositivos implantables, incluyendo un sensor de glucosa implantable para la gestión de la diabetes. Además, los materiales compuestos de hidrogel/nanoestructura pueden utilizarse para proporcionar: una barrera de carga para el desarrollo de nefronas artificiales basadas en MEMS; un entorno acuoso y fisiológicamente compatible en el que las células renales incrustadas, tal como los podocitos, puedan incorporarse al diseño de una nefrona artificial basada en MEMS; y un recubrimiento para dispositivos MEMS implantables diseñados para diversos fines, entre los que se incluyen la administración de fármacos, la detección mecánica y como sistema de biodetección.

Los materiales compuestos de hidrogel/nanoestructura divulgados, y en particular un hidrogel basado en hialuronano, también pueden unirse covalentemente a dispositivos basados en silicio, por ejemplo, mediante la primera unión covalente de la amina primaria de tiramina a la superficie de silicio para proporcionar una química de superficie recubierta de hidroxifenilo. Para ello se puede utilizar la misma química empleada para unir ADN modificado con una amina libre a superficies de silicio. A continuación, el hidrogel a base de HA se acopla covalentemente a la superficie recubierta de hidroxifenilo mediante la misma química impulsada por peroxidasa utilizada en su modo de reticulación preferido descrito anteriormente.

Los materiales compuestos de hidrogel/nanoestructura también pueden utilizarse para el recubrimiento de dispositivos cardiovasculares no biológicos tales como catéteres, stents e injertos vasculares. Entre ellos se incluirían los dispositivos fabricados con materiales que convencionalmente no se utilizan debido a su incompatibilidad biológica, pero que presentan características de diseño superiores a las de los dispositivos actualmente en uso. Podrían incorporarse factores bioactivos a los hidrogeles para promover la endotelización o epitelización del hidrogel y, por tanto, del dispositivo implantado.

Aunque en el presente documento se han descrito ejemplos y usos particulares para los materiales compuestos de hidrogel/nanoestructura de la invención, dichos usos específicos no pretenden ser limitativos. Los materiales compuestos de hidrogel/nanoestructura de la invención pueden utilizarse para cualquier aplicación generalmente utilizada para hidrogeles conocidos, y en particular, son útiles para la reparación y/o regeneración de tejidos blandos en cualquier parte del cuerpo.

Se hará referencia ahora a los dibujos en los que números de referencia similares identifican características estructurales o aspectos similares de la divulgación objeto. A efectos de explicación e ilustración, y no de limitación, en la Fig. 1A se muestra una vista ilustrativa de una realización de un material compuesto biodegradable de acuerdo con la divulgación y se designa generalmente con el carácter de referencia 100. Los sistemas y procedimientos descritos en el presente documento pueden utilizarse para mejorar la cicatrización de los defectos de los tejidos blandos.

Haciendo referencia en general a las Figs. 1A-1D, el material 100 compuesto biodegradable puede incluir un gel 103 reforzado con nanofibras 101 que combina las ventajas tanto del gel 103 como de las nanofibras 101. El gel 103 puede incluir cualquier material adecuado, tal como, pero no limitado a, hidrogel. Las nanofibras 101 pueden estar hechas de cualquier nanomaterial adecuado, por ejemplo, policaprolactona (PCL) o cualquier otro material adecuado, y pueden adoptar cualquier forma y/o tamaño adecuados. El material 100 compuesto incluye una alta porosidad (por ejemplo, para mediar en la adhesión y migración celular) manteniendo al mismo tiempo suficientes propiedades mecánicas (por ejemplo, para mantener la integridad y el soporte tisular).

En al menos algunas realizaciones, las nanofibras 101 se conjugan covalentemente con el hidrogel 103 formando una o más cadenas poliméricas. La unión covalente de los hidrogeles 103 a las nanofibras 101 puede dar lugar a un material con un conjunto combinado de propiedades ideales superior al de los materiales constituyentes utilizados solos o como simple mezcla.

La Fig. 2A representa curvas de tensión-deformación de una realización del material compuesto de la Fig. 1 trazadas frente al hidrogel de HA solo, revelando un módulo elástico mejorado en comparación con el hidrogel a la misma densidad de reticulación. Como se muestra, el módulo elástico del material 100 compuesto ensayado (4,5 mg/ml HA, 10 mg/ml PEG-DA, 6,75 mg/ml fibras PCL) fue de 750 Pa, y el hidrogel solo con la misma densidad fue de 320 Pa. La Fig. 2B representa un ensayo de fatiga que muestra que el material compuesto ilustrado en la Fig. 1 conserva un grado similar de solidez de la integridad mecánica en comparación con el hidrogel normal.

En referencia a la Fig. 3A-3B, se demostró que el material 100 compuesto soporta la migración de células madre derivadas de tejido adiposo (ASC). Las ASC marcadas con GFP procedentes de aspirados de liposucción se cultivaron en esferoides y luego se sembraron en material compuesto o hidrogel.

Las Figs. 3A y 3B muestran fluorescencia y superposición (Fig. 3A) con imágenes de contraste de fase (Fig. 3B) de ASCs cultivadas en material compuesto de hidrogel de nanofibra-HA durante 4 días. Las células

migraron hacia el exterior con largos procedimientos y trayectorias extendidas. Por el contrario, las ASC cultivadas en hidrogel de HA solo se muestran en las Figs. 3C y 3D no mostraron una migración celular significativa.

- 5 Las Figs. 4A y 4B muestran una imagen de fluorescencia y superposición (Fig. 4A) con imagen de contraste de fase (Fig. 4B) contrastando ASCs migrando desde esferoides a lo largo de nanofibras 101 alineadas de 650 nm, mostrando su fuerte respuesta migratoria a la presencia de nanofibras 101.

Ejemplo 1: Preparación de un material compuesto de nanofibras-hidrogel.

- 10 Las nanofibras se produjeron mediante electrohilado de PCL (policaprolactona, 80k de Sigma Aldrich). Las nanofibras se hilaron formando una malla aleatoria. Los parámetros de hilado fueron una solución al 10% en peso de PCL en DCM-DMF al 90%/1% en peso, a un caudal de 0,6 ml/h a través de una aguja roma de calibre 27 a 15 cm de la placa metálica objetivo. El voltaje de la aguja fue de +10kV, con la placa objetivo sesgada negativamente con un voltaje de -3kV. Se centrifugó 1mL de solución por ronda.

- 15 A continuación, las fibras se funcionalizan con un procedimiento de varios pasos. Brevemente, las fibras se tratan con plasma para tener grupos reactivos en la superficie de la fibra, a los que se conjuga el ácido acrílico por fotoiniciación UV. A continuación, los grupos acrilato reaccionan con EDC y diazimina para formar aminas primarias. A continuación, estas aminas pueden reaccionar con SMCC para unir grupos maleimida, que pueden reaccionar fácilmente con los grupos tiol del hidrogel.

- 20 La malla de fibra funcionalizada se cortó en secciones de 60 mg o menos. Se empapa una muestra de 60 mg en etanol y se añade al mortero cerámico que se ha llenado parcialmente con nitrógeno líquido. La muestra de fibra se volverá muy rígida. Manteniendo la muestra lo suficientemente fría para conservar la rigidez, se corta la lámina de fibra en secciones de ~5mmx5mm con unas tijeras. Una vez cortada la hoja completa, las fibras se muelen con el mortero durante ~20min, manteniendo el mortero parcialmente lleno con nitrógeno líquido. A continuación, la pasta de fibra se vierte en etanol. Se añade ~1mg de tensioactivo a la pasta para ayudar a prevenir el enredo de las fibras. La suspensión se centrifuga durante min a 300G y se desecha el sobrenadante. Las fibras se dejan secar toda la noche. A continuación, las fibras se pesan en un tubo de centrifugado secundario, para poder suspender una concentración precisa de fibras. A continuación, las fibras se empapan en etanol para esterilizarlas, se centrifugan, se desecha el sobrenadante y se dejan secar toda la noche en una cabina de bioseguridad. A continuación, las fibras se resuspenden hasta alcanzar la concentración deseada en agua desionizada, normalmente 15mg/mL.

- 30 Para formar el material compuesto de hidrogel, se utiliza 1mL de la suspensión de fibras para rehidratar 1 vial de ácido hialurónico Glycosil, dando como resultado una solución de 15mg/mL de fibras y 10mg/mL de ácido hialurónico. A 900µL de esta solución, se añaden 100µL de solución madre de PEG-DA al 10%, para obtener una concentración final de 13,6mg/mL de fibra, 9mg/mL de ácido hialurónico y 10mg/mL de PEG-DA. Esta es la formulación de los primeros ejemplos in vivo, pero se han elaborado otras formulaciones variando las concentraciones de los componentes.

- 40 Los materiales compuestos resultantes eran de color blanco lechoso (Fig. 1C), a diferencia de los hidrogeles transparentes sin las fibras. Los geles de materiales compuestos mantuvieron su forma y se manipularon bien, mientras que el grupo de hidrogel solo era más propenso al desgarro. Las fibras del hidrogel estaban dispersas y su longitud oscilaba entre decenas y cientos de micrómetros (Fig. 1B). Una imagen SEM de sección transversal de un material compuesto de muestra fracturado y liofilizado muestra la estrecha asociación entre las fibras y el componente de hidrogel, así como la alta densidad de fibras dispersas (Fig. 1D).

Materiales y procedimientos

Materiales

- 45 El ácido hialurónico tiolado (AH) se adquirió de ESI BIO (Alameda, CA). Los diacrilatos de poli(etilenglicol) se adquirieron de Laysan Bio, Inc (Arab, AL). Los siguientes se obtuvieron de Sigma; poli(e-caprolactona), etilaminomaleimida, ácido acrílico, azul de toluidina O, N-hidroxisuccinimida (NHS), cisteína, albúmina sérica bovina (BSA), ácido acético y Triton™ X-100. El medio águila modificado por Dulbecco (DMEM), el suero fetal bovino (FBS), la penicilina/estreptomina, la faloidina Alexa Fluor® 568 y el 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) se adquirieron de Invitrogen Life Technologies. La etil(dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) se obtuvo de AnaSpec, Inc. (Fremont, CA). Todos los demás productos químicos y reactivos eran de calidad analítica.

Procedimientos

Electrohilado de nanofibras de PCL para experimentos reológicos:

- 55 Para fabricar dos diámetros diferentes de fibras de PCL, se prepararon soluciones de PCL al 11,0 y 8,5 % (p/v) en una mezcla de diclorometano y dimetilformamida (9:1, v/v) y una mezcla de cloroformo y metanol (3:1, v/v), respectivamente. Cada solución homogénea de PCL se cargó en una jeringa con una aguja metálica de 27 G. A continuación, se realizó el electrohilado con los siguientes parámetros: 1,0 ml/h de velocidad de alimentación,

15 kV de tensión positiva aplicada a la aguja metálica y 12 cm de distancia entre el extremo de la aguja y el suelo. La morfología de las fibras se observó con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM, JEOL 6700F) y el diámetro de las fibras se midió con imágenes FESEM utilizando el software ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, MD).

5 Electrohilado para materiales compuestos *in vivo* :

Condiciones de hilado: 16%p/v PCL (95% 45.000 Mn PCL, 5% 80.000 Mn PCL, ambos de Sigma) en una mezcla disolvente de diclorometano y dimetilformamida (9:1, p/p). Las fibras se hilaron a un ritmo de 5,25ml/hr a través de una aguja roma de calibre 27 separada 10cm de la cara de la rueda esmerilada, hilando a 1000rpm. El voltaje aplicado fue de 15kV y la bomba de electrohilado se rastrelló hacia adelante y hacia atrás a través de la distancia de recorrido de 85 mm durante 140 pasadas a 2 mm/seg (aproximadamente 4 horas). A continuación, la lámina de fibra se cortó en láminas individuales de 14 cm de diámetro para su funcionalización.

Preparación de fibras funcionalizadas en superficie con MAL:

Para funcionalizar superficialmente en fibras con MAL, se indujeron grupos carboxilo en una superficie de fibras injertando poli(ácido acrílico) (PAA) de acuerdo con la bibliografía con una modificación menor [Interface Focus 2011, 1, 725-733]. Brevemente, las fibras se trataron con plasma bajo 280 mmHg con atmósfera de oxígeno a temperatura ambiente durante 10 min para inducir radicales libres en una superficie de las fibras. A continuación, 70 mg de fibras en 10 ml de solución de ácido acrílico al 3 o al 10 % (v/v) en NaIO₃ 0,5 mM se expusieron a UV (36 mW/cm², DYMAX Light Curing Systems 5000 Flood, Torrington, CT) durante 90 s para la fotopolimerización de PAA en la superficie de las fibras (PAA-fibras). Tras incubar las fibras de PAA a temperatura ambiente durante 20 minutos, se lavaron tres veces con 20 ml de agua desionizada para eliminar el ácido acrílico sin reaccionar. Después de secar completamente al aire las fibras de PAA, se determinó la densidad de grupos carboxilo en las fibras de PAA mediante el ensayo de azul de toluidina O (TBO), suponiendo que el TBO interactúa con un grupo carboxilo en las fibras a una relación molar de 1:1 [J Biomed Mater Res 2003, 67, 1093-1104]. Brevemente, las PAA-fibras (1 x 1 cm²) se sumergieron completamente en 1 ml de solución de 0,5 mM de TBO en 0,1 mM de NaOH (pH 10) después de empapar 20 µl de etanol al 50 % (v/v) y reaccionaron con agitación suave a temperatura ambiente durante 5 h. Después de lavarlas con 0.1 mM de NaOH (pH 10), se adsorbió la TBO adsorbida en la superficie de las fibras PAA utilizando 1 ml de ácido acético al 50 % (v/v) con agitación enérgica a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, se midió la densidad óptica del sobrenadante a 633 nm utilizando un lector de microplacas (BioTeck Synergy2, Winooski, VT). Como patrón se utilizó TBO en ácido acético al 50 % (v/v).

Las fibras de PAA se molieron para preparar fragmentos de fibra utilizando un molino criogénico (Freezer/Mill 6770, SPEX SamplePrep, Metuchen, NJ) con los siguientes parámetros; 10 ciclos de 1 min para moler y 3 min para enfriar en nitrógeno líquido. Tras recoger los fragmentos de fibras de PAA en un tubo cónico de 50 ml, los fragmentos de fibras de PAA se dispersaron completamente en 10 ml de una mezcla de isopropilalcohol y agua destilada (1:1, v/v) para modificarlos con aminoetil-MAL en una superficie de fibras. Brevemente, a las fibras de PAA se les añadió NHS y EDC para activar los grupos carboxilo del PAA en las fibras. La relación molar entre el grupo carboxilo y el NHS y el EDC fue de 1 a 4 y 4, respectivamente. La activación se realizó con agitación suave a temperatura ambiente. Después de 1 h, se añadió aminoetil-MAL a las fibras activadas con grupos carboxilo con una proporción molar de 1 a 2 de grupos carboxilo a aminoetil-MAL. A continuación, la reacción se llevó a cabo con agitación suave a temperatura ambiente durante 12 h. Las fibras funcionalizadas superficialmente con MAL se liofilizaron después de lavarlas con agua destilada tres veces. En este caso, la densidad de MAL en las fibras se basaba en el supuesto de que todos los grupos carboxilo de la superficie de las fibras estaban completamente sustituidos por MAL.

Preparación de materiales compuestos de hidrogel de fibra-HA:

Para preparar un material compuesto de hidrogel de fibra-HA, el HA tiolado y el PEGDA se disolvieron completamente en PBS (pH 7,4) hasta la concentración deseada de 12,5 mg/mL y 100 mg/mL, respectivamente. Las fibras MAL con la concentración deseada de 25 mg/mL se dispersaron completamente en PBS (pH 7,4). A continuación, la suspensión de nanofibras, HA, PEG-DA y PBS se añade en serie hasta alcanzar la concentración final deseada de la formulación. Después de mezclar homogéneamente la solución de precursor de material compuesto, para los estudios reológicos, se vertieron 100 µl de la solución de precursor de material compuesto en un molde (ϕ = 8 mm) y se incubaron a 37 °C durante 2 h para la gelificación. Para los estudios de compresión, se añaden 200 µl de solución de precursor a un molde cilíndrico de teflón (ϕ = 6,35 mm, h = 6,35 mm) y se incubó como se ha indicado anteriormente. Para observar la morfología de la sección transversal de un material compuesto de hidrogel de fibra-HA mediante FESEM, se deshidrataron un material compuesto de hidrogel de HA mediante lavados seriados con etanol (10 minutos cada uno a 50%, 70%, 80%, 90%, 100% y 100% de etanol) antes del secado en punto crítico (Samdri-795, Tousimis, Rockville, MD) o el secado químico (HDMS). Las muestras se fracturaron por congelación en nitrógeno líquido para revelar la estructura interna de los poros. La estructura se recubrió por pulverización catódica con una capa de 10 nm de platino (Hummer 6.2 Sputter System, Anatech UDA, Hayward, CA) y, a continuación, se tomaron imágenes con un SEM de emisión de campo (JEOL 6700F, Tokio, Japón).

Para la preparación de los materiales compuestos para los estudios *in vivo* en animales el AH tiolado se reconstituyó a 12,5 mg/mL en PBS. El PEG-DA se disolvió a 100 mg/mL en PBS. Las fibras MAL se resuspendieron a 25mg/mL en PBS estéril. Las fibras se combinaron primero con la solución de HA y se dejaron reaccionar durante 10 min antes de combinarlas con el PEG-DA para obtener las concentraciones finales

5

A continuación, la suspensión se pipeteó inmediatamente en los moldes cilíndricos de teflón (McMaster-Carr, Robbinsville, NJ), con 300 μ L en moldes cilíndricos de 11,125 mm de diámetro y 3 mm de altura para las muestras *in vivo*. A continuación, los geles se colocaron en la incubadora a 37 °C para que gelificaran durante toda la noche.

10

15 **Propiedades mecánicas de los materiales compuestos de hidrogel de fibras-HA:**

Ensayo de compresión. La suspensión de precursor de hidrogel se pipeteó en los moldes cilíndricos de teflón (McMaster-Carr, Robbinsville, NJ), con 200 μ L en moldes cilíndricos de 6,35 mm de diámetro y 6,35 mm de altura para las pruebas de compresión. A continuación, los geles se colocaron en la incubadora a 37 °C para que gelificaran durante toda la noche. Los geles se extrajeron de sus moldes y se sometieron inmediatamente a pruebas de compresión uniaxial no confinada entre dos placas paralelas con el comprobador mecánico Endura TEC Serie ELF 3200, BOSE ElectroForce, Eden Prairie, MN). Las muestras se comprimieron hasta una deformación del 50%, y el módulo elástico se determinó a partir de la pendiente de la porción lineal de la curva tensión-deformación entre el 10% y el 20% de deformación. Las muestras se probaron tres veces cada una, y se probaron tres muestras por grupo para determinar el módulo de compresión medio. Para medir el módulo de compresión de los materiales compuestos de hidrogel de fibra-HA rehidratados, los materiales compuestos se liofilizaron y rehidrataron con 1 ml de PBS (pH 7,4) a 37 °C durante 24 h. Para las pruebas de fatiga, las muestras de compresión se sometieron a ciclos repetidos del 0% al 25% de deformación a 0,1 Hz.

20

25

Prueba reológica. Se midió el módulo de almacenamiento al cizallamiento (G') de diversos materiales compuestos de fibra-HA utilizando un reómetro oscilante (ARES-G2 Rheometer, TA Instruments, New Castle, DE) con una placa paralela ($\phi = 8$ mm). Se empleó un barrido de frecuencia oscilatoria para controlar la variación de G' de 1 Hz a 10 Hz con una deformación constante del 10 %.

30

Migración de hASCs en materiales compuestos de hidrogel de fibra-HA:

Las células madre humanas derivadas de tejido adiposo (hASCs) se cultivaron en DMEM de alta glucosa que contenía 10 % de FBS, 1 % de penicilina/estreptomicina y 1 ng/ml de bFGF. El medio de cultivo se cambió tres veces por semana para un crecimiento óptimo. Para preparar los esferoides de hASC, se vertieron 50 μ L de solución de hASCs ($5,6 \times 10^5$ células/ml) en un gel de agarosa micromoldeado fundido (MicroTissues® 3D Petri Dish® micro-moldes esferoides, 96-orificios) para preparar esferoides hASCs y se incubaron con agitación suave a 37 °C durante 24 h.

35

HA y PEGDA se disolvieron completamente en PBS (pH 7,4) con una concentración final de 4,5 y 2,5 mg/ml para HA y 5,0 mg/ml para PEGDA. Las fibras previamente humedecidas con 20 μ L de etanol al 50 % (v/v) se dispersaron completamente en PEGDA con una concentración final de 10,0 mg/ml, y a continuación se añadió HA a una mezcla de fibras y PEGDA. Se vertieron 30 μ L de solución de precursor de material compuesto en cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos y se incubaron para reticular a 37 °C durante 1 h para evitar alcanzar esferoides de hASCs en una superficie de la placa de cultivo tisular. A continuación, se vertieron 50 μ L de solución de precursor de material compuesto con 3 ~ 5 esferoides de hASCs en cada pocillo. Tras la reticulación a 37 °C durante 1 hora, se añadieron 200 μ L de medio fresco en cada pocillo y se cambiaron los medios cada dos días. Para observar las células migradas de los esferoides de hASCs dentro de los materiales compuestos, la F-actina y los núcleos de las hASCs se tiñeron con Alexa Fluor® 568 Phalloidin y DAPI, respectivamente. Brevemente, tras 4 días de cultivo, los materiales compuestos con esferoides hASCs se fijaron con 100 μ L de paraformamida al 4 % (v/v) a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación, tras lavar tres veces con PBS (pH 7,4), los materiales compuestos se incubaron con 100 μ L de BSA al 1 % (p/v) en PBS para inhibir la tinción inespecífica a 4 °C durante toda la noche y se lavaron tres veces con PBS. Posteriormente, los materiales compuestos se incubaron con 100 μ L de Triton-X 100 al 0,1 % (v/v) en PBS a temperatura ambiente durante 1 h. Tras lavar tres veces con PBS, se añadieron 100 μ L de 160 nM de Alexa Fluor® 568 Phalloidin a cada material compuesto y se incubaron a temperatura ambiente durante 4 h. A continuación, tras eliminar el sobrenadante, se incubaron con 100 μ L de 0,5 μ g/ml de DAPI a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, tras eliminar el sobrenadante, los materiales compuestos se incubaron con 100 μ L de 0,5 μ g/ml de DAPI a temperatura ambiente durante 1 h. Tras lavar tres veces con PBS, las hASC migradas se observaron con un microscopio confocal de barrido láser (CLSM, Carl Zeiss LSM780, Alemania) a ej. 561 nm y em. 570-600 nm para Alexa Fluor® 568 Phalloidin, y ej. 405 nm y em. 385-420 nm para DAPI.

40

45

50

55

60

Rendimiento de un material compuesto de fibra-hidrogel *in vivo*:

El HA tiolado se reconstituyó a 12,5mg/mL en PBS. El PEG-DA se disolvió a 100 mg/mL en PBS. Las fibras MAL se resuspendieron a 25mg/mL en PBS estéril. Las fibras se combinaron primero con la solución de HA y se dejaron reaccionar durante 10 min antes de combinarlas con el PEG-DA para obtener las concentraciones finales deseadas. A continuación, la suspensión se pipeteó inmediatamente en los moldes cilíndricos de teflón (McMaster-Carr, Robbinsville, NJ), con 300 µl en moldes cilíndricos de 11,125 mm de diámetro y 3 mm de altura. A continuación, los geles se colocaron en la incubadora a 37 °C para que gelificaran durante toda la noche. Las dos formulaciones se seleccionaron de modo que coincidieran con la rigidez de 2 kPa del tejido adiposo. La formulación de HA sola era de 10mg/mL de PEG-DA y 9mg/mL de HA-SH, y la formulación de material compuesta de HA-fibra era de 5mg/mL de PEG-DA, 5mg/mL de HA-SH y 12,5mg/mL de nanofibras dispersas.

Para estudiar la biocompatibilidad de los andamiajes de nanomaterial compuesto, se implantaron bajo las almohadillas de grasa inguinal de ratas Sprague-Dawley y se observaron durante periodos de tiempo variables. Bajo anestesia volátil, se practicó una incisión de 1 cm justo proximal al pliegue inguinal bilateralmente. Tras la disección roma de los tejidos subcutáneos, se expuso la almohadilla de grasa inguinal. Se elevó con hemostasia meticulosa utilizando electrocauterio y con preservación cuidadosa de los vasos de alimentación. Los andamiajes se implantaron bajo la almohadilla de grasa del lado derecho del animal. El lado izquierdo no recibió ningún implante y sirvió como control de cirugía simulada. Ambos lados se cerraron de forma estándar por capas. Se observó a los animales durante 7, 14, 30 y 90 días. En los puntos temporales de recogida, los animales fueron sacrificados y la almohadilla de grasa inguinal con y sin andamiajes fue expuesta y fijada en 4%PFA. Los especímenes se incrustaron y seccionaron para la tinción estándar con hematoxilina y eosina.

Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan en valores medios y la desviación estándar. La significación estadística entre un par de grupos se determinó realizando un ANOVA de una vía con el programa SigmaPlot 12.0 (SPSS); un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Se contempla en el presente documento cualquier otro procedimiento adecuado para realizar realizaciones del material 100 compuesto según se divulga en el presente documento.

Ejemplo 2: Ensayo de compresión del material compuesto de nanofibras-hidrogel.

Para las pruebas de compresión, las muestras de fibra-hidrogel se formaron como cilindros de 8,5 mm de diámetro y ~4 mm de altura, y se dejaron fraguar durante la noche en moldes a 37 °C. Los módulos elásticos se determinaron mediante ensayos de compresión con un Bose EnduraTEC ELF 3200 (Eden Prairie, MN). La muestra se sometió a compresión uniaxial entre dos placas paralelas, comprimidas al 50% de deformación. Los módulos elásticos se determinaron midiendo la pendiente de la región lineal inicial. Se probaron dos grupos de muestras, con las mismas formulaciones de hidrogel, con y sin fibras. La muestra de hidrogel solo se formó con 4,5mg/mL de ácido hialurónico tiolado (Glycosan Glycosil) y 10mg/mL de PEG-DA (diacrilato de polietilglicol, peso molecular 3350). El grupo de material compuesto de fibra-hidrogel tenía las mismas concentraciones de hidrogel, pero además tiene 6,75mg/mL de nanofibras de PCL que tienen una superficie funcionalizada con grupos maleimida que pueden reaccionar fácilmente con el ácido hialurónico tiolado.

En la Fig. 2A pueden verse trazas representativas de tensión-deformación. El grupo de hidrogel solo tenía un módulo elástico de 320 Pa, mientras que el material compuesto de fibra-hidrogel tenía un módulo superior de 750 Pa. La mayor rigidez del material compuesto de fibra-hidrogel se aprecia en los mayores valores de tensión en cada valor de deformación. La presencia de nanofibras funcionalizadas aumentó considerablemente la resistencia y rigidez del material. Así, la estructura global del material compuesto puede tener una rigidez adaptada al tejido objetivo, mientras que el componente de hidrogel puede tener una densidad de reticulación inferior a la que sería necesaria para lograr la misma rigidez sin el beneficio de las nanofibras. Esto debería dar lugar a una mejor respuesta celular para una rigidez de implante dada.

A continuación, los grupos de muestras se ensayaron mediante compresión repetida a una deformación del 25% (20 ciclos) a 0,1 Hz. En la Fig. 2B pueden verse trazos representativos. Esto demuestra que los hidrogeles y los materiales compuestos pueden tolerar la compresión repetida, y que el material compuesto es persistentemente más rígido que el grupo sin fibras.

Ejemplo 3: Interacción célula-material.

Para probar la respuesta celular al hidrogel de material compuesto, se probó el potencial migratorio de células madre derivadas de adiposo (ASCs) en formulaciones variables de hidrogeles, con y sin fibras.

Las ASC se transfectaron para expresar GFP y luego se formaron en racimos esferoides sembrando las células durante la noche en moldes de alginato fabricados por moldes Microtissues. Las células se sembraron como esferoides para evaluar mejor la motilidad celular, ya que los esferoides son una fuente puntual distinta a partir de la cual se pueden medir fácilmente las células migratorias. Los esferoides se mezclaron con el hidrogel antes de pipetearlos en una placa de 96 pocillos y dejarlos endurecer. A continuación, se tomaron imágenes de

las células durante varios días para observar su migración. Las células fueron capaces de migrar progresivamente más a medida que se reducían las concentraciones de ácido hialurónico y PEG-DA, debido al aumento respectivo del tamaño de los poros. A las mismas densidades de hidrogel (4,5mg/mL de ácido hialurónico y 2,5mg/mL de PEG-DA), las células pudieron migrar mejor en las muestras con nanofibras dispersas (12mg/mL, Figs. 3A y 3B) que sin (como se muestra en las Figs. 3C y 3D). Esto indica que la presencia de nanofibras funcionalizadas no sólo mejoró las propiedades mecánicas de las nanofibras, sino que también puede ayudar a mejorar la migración celular.

Para demostrar claramente que las ASC estaban fuertemente influenciadas por la presencia de nanofibras, se cultivaron esferoides de ASC sobre láminas de nanofibras alineadas, sin hidrogel. Tras 96 horas, las células (verdes en las Figs. 3C y 3D) emigraron claramente fuera del esferoide a lo largo del mismo eje de las nanofibras alineadas (mostradas en la Fig. 3D).

Ejemplo 4: Compatibilidad tisular del material compuesto de nanofibra-hidrogel.

Para estudiar la biocompatibilidad de los andamiajes de nanomaterial compuesto, se implantaron bajo las almohadillas de grasa inguinal de ratas Sprague-Dawley y se observaron durante periodos de tiempo variables. Bajo anestesia volátil, se practicó una incisión de 1 cm justo proximal al pliegue inguinal bilateralmente.

La Fig. 5A es una fotografía que muestra el aspecto del material compuesto de nanofibra-hidrogel *in situ* bajo la almohadilla de grasa inguinal de rata. La Fig. 5B muestra imágenes de tinción H&E de secciones de tejidos alrededor del material compuesto recogidas a las 2 semanas de la implantación. Se muestran frondas de células mesenquimales eosinófilas teñidas de rosa oscuro que migran hacia el nanomaterial (teñido de rosa claro).

La Fig. 5C muestra imágenes de tinción H&E de secciones de tejido recogidas de la interfaz de material compuesto-tejido a las 4 semanas, mostrando infiltración celular. El tejido mesenquimal que rodea el lugar de implantación se tiñe de rosa oscuro con eosina. El nanomaterial aparece de color rosa claro. En la interfaz pueden observarse células mesenquimales rosadas infiltrantes, así como adipocitos putativos con vacuolas redondas claras.

Tras la disección roma de los tejidos subcutáneos, se expuso la almohadilla de grasa inguinal. Se elevó con hemostasia meticulosa utilizando electrocauterio y con preservación cuidadosa de los vasos de alimentación. Los andamiajes se implantaron bajo la almohadilla de grasa del lado derecho del animal. El lado izquierdo no recibió ningún implante y sirvió como control de cirugía simulada. Ambos lados se cerraron de forma estándar por capas. Se observó a los animales durante 2, 4 y 6 semanas. En los puntos temporales de recogida, los animales fueron sacrificados y la almohadilla de grasa inguinal con y sin andamiajes fue expuesta y fijada en PFA al 4%. Los especímenes se incrustaron y seccionaron para la tinción estándar con hematoxilina y eosina. En los primeros puntos temporales (2 semanas), se encontraron células mesenquimales del lecho de la herida infiltradas en el material, lo que sugiere que el material tiene suficiente porosidad para permitir el crecimiento interior celular nativo (tinción rosa oscuro en la Fig. 5B).

Es importante destacar que el crecimiento celular se consiguió incluso en ausencia de factores de crecimiento exógenos. La presencia de células infiltradas en el material, en lugar de simplemente rodearlo, distingue a este nanomaterial compuesto de otros materiales aloplásticos de uso corriente. Estos últimos materiales están amurallados por una cápsula fibrosa y, por tanto, son menos deseables para la reconstrucción de tejidos blandos. En momentos posteriores (4 semanas), el crecimiento interior celular es aún más evidente con la aparición de áreas vacuolares que pueden representar una diferenciación adipocitaria incipiente (tinción rosa oscuro y círculos claros en la Fig. 5C).

Ejemplo 5: Diseño de un material compuesto de hidrogel de fibra-HA

Las fibras podrían formar la arquitectura fibrosa que a menudo puede observarse en la matriz extracelular nativa, ayudando a la migración celular y reforzando las propiedades mecánicas inicialmente bajas del hidrogel. Al introducir la unión interfacial entre el hidrogel y las fibras (Fig. 6A, Fig. 6B), el material compuesto se refuerza sin disminuir el tamaño medio de los poros ni la porosidad (Fig. 6), lo que dificultaría significativamente la migración celular. También se esperaba que las propiedades mecánicas pudieran ajustarse controlando la densidad de la unión interfacial entre el hidrogel y la superficie de las fibras. En este caso, se prepararon fibras funcionalizadas en superficie con maleimida (MAL) para introducir la unión interfacial con ácido hialurónico tiolado (HA-SH) (Fig. 6). La superficie de las fibras de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) electrohiladas se trató con plasma de O₂ para inducir radicales libres en su superficie antes de injertar poli(ácido acrílico) (PAA). Los grupos carboxilo se activaron mediante reactivos de acoplamiento, NHS y EDC, y a continuación se hizo reaccionar N-(2-aminoetil)maleimida con los grupos carboxilo activados (Figura 13). Posteriormente, las fibras funcionalizadas con MAL se introdujeron en una solución de precursor de hidrogel compuesta de HA-SH y PEGDA para fabricar un material compuesto de fibra-hidrogel. Los grupos tiol de la HA se emplearon para formar un gel reaccionando tanto con los grupos MAL de las fibras como con los grupos DA del enlazador PEG. Curiosamente, una sección transversal de un material compuesto de fibra-hidrogel mostraba una estructura tridimensional fibrosa con una elevada porosidad (Fig. 6), en comparación con una sección transversal de

hidrogel de HA con una densidad de reticulación similar. Los materiales compuestos resultantes mostraban una distribución uniforme de las nanofibras tanto a lo ancho como a lo alto del material compuesto, lo que permitía un refuerzo isotrópico. Asimismo, un material compuesto de hidrogel de fibra-HA rehidratada mostró un 99,34 % de recuperación de volumen tras la liofilización, mientras que el hidrogel de HA mostró un 70,17 % de recuperación de volumen (Fig. 6D).

Ejemplo 6: Módulo de compresión de un material compuesto de hidrogel de fibra-HA

En primer lugar, se verificó que el material compuesto poseía su rigidez máxima (bajo cizallamiento) cuando los grupos reactivos eran iguales sobre una base molar. Los grupos tiol de la HA pueden reaccionar con los grupos MAL de las nanofibras o con los grupos acrilato del PEG-DA, de modo que cuando la relación molar de SH a (DA+MAL) era aproximadamente de 1 a 1, los geles mostraban un módulo de almacenamiento por cizallamiento óptimo. Por lo tanto, esta proporción se mantuvo en todos los estudios posteriores. Los geles se sometieron a ensayos de compresión no confinada para evaluar el módulo elástico del hidrogel de HA y de los materiales compuestos de hidrogel de fibra-HA (Fig. 7). El efecto de refuerzo de las nanofibras funcionalizadas puede observarse en la tensión de compresión cuando se tensan al 50% (Fig 7A). La tensión de compresión fue 3,1 veces mayor en el grupo de fibras de 1,0 μm que en el grupo de sólo hidrogel, lo que demuestra el efecto del refuerzo mecánico. El grupo de fibras de 286 nm mostró un efecto de refuerzo aún más pronunciado, con una tensión de compresión 4,2 veces superior en la deformación del 50%. Curiosamente, el efecto de rigidez de las fibras de 286 nm se redujo en gran medida a sólo 1,3 veces sobre el hidrogel cuando los grupos maleimida se apagaron antes de la gelificación, lo que confirma que la unión interfacial de la fibra al hidrogel es crucial para el efecto de refuerzo de las fibras funcionalizadas. Además, cuando las fibras de 286 nm no se funcionalizaban antes de formar el material compuesto, el efecto de refuerzo desaparecía, dando lugar a materiales compuestos apenas más rígidos que el hidrogel solo. El mismo efecto de refuerzo puede observarse al formular geles más rígidos mediante la formulación de materiales compuestos con mayores concentraciones de HA y PEG-DA (Figura 7). La unión interfacial también muestra una respuesta a la dosis en su rigidez del gel de material compuesto, ya que la adición progresiva de más grupos maleimida a la superficie de la nanofibra da lugar a materiales progresivamente más rígidos, lo que proporciona más pruebas de la importancia de la unión interfacial. También se comprobaron los cambios en las propiedades mecánicas de los materiales compuestos antes y después de la deshidratación y rehidratación. Los geles, con y sin nanofibras funcionalizadas de dos densidades diferentes de maleimida, se sometieron a pruebas mecánicas de compresión. A continuación, los geles se liofilizaron, se dejaron rehidratar completamente y se volvió a comprobar su compresión. Todas las muestras mantuvieron su rigidez tras la rehidratación, lo que indica que los materiales compuestos pueden ser adecuados para su uso clínico como producto liofilizado. Mientras que el gel con HA solo aparentemente mantenía su rigidez, el propio gel se había compactado significativamente durante el procedimiento de deshidratación-rehidratación, a diferencia de los grupos que contenían fibras. Los geles de materiales compuestos también se sometieron a cargas cíclicas para comprobar los efectos de la fatiga; en la Figura 10 se muestran trazas representativas. Con cargas repetidas al 25% de tensión, los geles de materiales compuestos mantuvieron su rigidez a lo largo del tiempo y fueron sistemáticamente más rígidos que el hidrogel solo.

Ejemplo 7: Módulo de almacenamiento al cizallamiento de un material compuesto de hidrogel de fibra-HA

Además del mayor módulo de compresión, los materiales compuestos de hidrogel de Fibra-HA mostraron un módulo de almacenamiento al cizallamiento significativamente mayor que el hidrogel de HA solo (Fig. 8A). El módulo de almacenamiento al cizallamiento de un material compuesto con fibras de 286 nm fue mayor que el de un material compuesto con fibras de 686 nm (Fig. 8C). También se confirmó que el módulo de almacenamiento de cizallamiento de los materiales compuestos aumentaba al aumentar la densidad de la superficie de maleimida en las fibras de 286 nm, de forma similar al módulo en las pruebas de compresión (Fig. 8D). Al introducir fibras con 62 nmol/mg de MAL en su superficie, el material compuesto mostró un aumento de 1,3 veces en su módulo de almacenamiento al cizallamiento en comparación con el del hidrogel de HA solo. Además, el módulo de almacenamiento de cizallamiento de un material compuesto con 147 nmol/mg de MAL en sus fibras se multiplicó por 1,8 con respecto al módulo del grupo de 62 nmol/mg de MAL, lo que muestra una clara respuesta de la dosis al correspondiente aumento de 2,4 veces en la densidad de la superficie de MAL en las fibras. Cuando los grupos MAL de las fibras se apagaron antes de la gelificación, el módulo de almacenamiento de cizallamiento disminuyó en comparación con el de las fibras no apagadas, de forma similar a lo observado en las pruebas de compresión. Además, el módulo de almacenamiento de cizallamiento de los materiales compuestos se mantuvo cuando la frecuencia aumentó a 10 Hz, mientras que tanto el hidrogel de HA solo como el material compuesto con fibras apagadas mostraron una disminución de los módulos de almacenamiento al cizallamiento a 10 Hz con respecto a los de 1 Hz. El módulo de almacenamiento de cizallamiento de los materiales compuestos se incrementó con el aumento de la densidad superficial de MAL en las fibras, independientemente del área superficial (diámetro) de las fibras, lo que indica que el efecto observado anteriormente del diámetro de la fibra sobre la rigidez puede haber sido una función de la densidad de maleimida (Fig. 8D). Se obtuvo una regresión lineal de la correlación entre la densidad de la superficie de la MAL y el módulo de almacenamiento de cizallamiento con $R^2=0,93$. Además, los materiales compuestos mostraron una respuesta a la dosis de carga de fibra, ya que el módulo de almacenamiento de cizallamiento

de los materiales compuestos aumentó con una relación de peso creciente de fibras funcionalizadas a los componentes de hidrogel (Fig. 9).

Ejemplo 8: Migración celular en un material compuesto de hidrogel de fibra-HA *in vitro*.

Se planteó la hipótesis de que el material compuesto de hidrogel de fibra-HA mejoraba la migración celular en comparación con el hidrogel de HA debido a (i) una mayor porosidad del material compuesto con un mayor tamaño de poro, proporcionando una espacialidad para la migración celular cuando tienen las mismas propiedades mecánicas y (ii) una arquitectura fibrosa imitada de ECM en el material compuesto, permitiendo guiar intrínsecamente la migración celular. Por lo tanto, para demostrar la hipótesis actual, se sembraron esferoides de células madre derivadas del tejido adiposo humano (hASCs) como célula modelo y se colocó un trozo de tejido imitado dentro del hidrogel de HA y los materiales compuestos, después se cultivaron los esferoides de hASCs durante 27 días (Fig. 11). Se eligieron las ASC por su presencia en los tejidos adiposos y su importancia tanto en la angiogénesis como en la formación de adipocitos. Aunque los materiales compuestos tienen un módulo de Young similar, 1,9 kPa, al hidrogel de HA, el tamaño de los poros de los materiales compuestos es 2,08 veces mayor que el del hidrogel de HA (Fig. 16). Por lo tanto, se observó claramente que las hASCs migraban tridimensionalmente dentro de los materiales compuestos (Fig. 11B-11E) porque los poros más grandes podían acomodar para migrar las células, mientras que las hASCs mantenían su forma esferoide sin ninguna migración celular en el hidrogel de HA (Fig. 11A). En particular, la migración celular fue magníficamente mejorada cuando las fibras se modificaron con el péptido de adhesión celular, RGD, para el material compuesto (Fig. 11C). Sin embargo, en el entorno *in vivo*, la difusión de factores en el material compuesto desde el medio local debería proporcionar claves adhesivas adicionales, disminuyendo esta diferencia. En algunos casos, las fibras parciales formaron ligeramente un racimo durante la gelificación debido a la interacción hidrofóbica entre las fibras de PCL, y se observó que los cuerpos celulares agarraban preferentemente los racimos de fibras dentro de los materiales compuestos (Fig. 11D y 11E). Además, a las mismas concentraciones de HA y PEG-DA (Fig. 19), los materiales compuestos mostraron una mayor migración celular en comparación con el grupo sin fibras, lo que demuestra que las propias nanofibras podrían ayudar intrínsecamente a guiar la migración celular independientemente de la porosidad.

Ejemplo 9: Respuesta tisular e infiltración tisular del huésped

Para determinar el potencial terapéutico de estos implantes de material compuesto, los implantes de material compuesto se probaron *in vivo* en un modelo de almohadilla adiposa de rata. Las fórmulas de los grupos de implantes se formularon para alcanzar la misma rigidez inicial de 2 kPa que el gel de material compuesto y el tejido adiposo objetivo. Así, la formulación del implante de HA-gel solo tenía una mayor concentración tanto de HA tiolado como de PEG-DA para igualar la rigidez del grupo de fibra-material compuesto. A pesar de las mayores concentraciones, los implantes de HA solo fueron incapaces de mantener su forma y volumen a lo largo del estudio. Bajo observación macroscópica después de 4 semanas, los implantes de HA solo estaban estirados y su volumen era significativamente menor. Teniendo en cuenta su aspecto macroscópico y su falta de infiltración histológica, el sistema de HA solo no puede optimizarse para favorecer la infiltración celular y mantener una forma predeterminada. Sin embargo, los implantes de material compuesto de fibra-gel mantuvieron bien su forma original bajo observación macroscópica después de 90 días *in vivo*. Sorprendentemente, sin embargo, bajo observación histológica los materiales compuestos se habían infiltrado tan profundamente que la frontera entre el implante y el tejido nativo se había vuelto difícil de determinar.

Se ha desarrollado un modelo de defecto de tejido blando en ratas Lewis, en el que la almohadilla de grasa inguinal se expone y eleva mediante técnicas microquirúrgicas y los materiales compuestos preformados se colocan debajo. Este modelo bien definido es ideal para abordar todos los elementos de la hipótesis del Objetivo 3 y la escala susceptible del estudio R21. Aunque esto no demuestre directamente la capacidad de dicho material compuesto para restaurar grandes defectos, establecerá la prueba de principio y confirmará todas las funcionalidades esenciales del diseño del material compuesto, además de sentar las bases para un modelo animal de mayor tamaño para probar la restauración de grandes defectos en modelos clínicamente más relevantes.

En un estudio piloto, se implantaron materiales compuestos de hidrogel de nanofibras de PCL-HA e hidrogeles de HA con módulos similares bajo la almohadilla de grasa inguinal de ratas Lewis macho de 8-12 semanas de edad ($n = 3$ por punto temporal). Tanto el grupo de hidrogel de HA como el de material compuesto mostraron una buena compatibilidad tisular en los días 14 y 30 tras el trasplante (Fig. 12, POD 14, observaciones similares en el POD 30. POD = Fecha postoperatoria). La histología en el POD 30 no mostró un mayor nivel de respuesta inflamatoria que el grupo de cirugía simulada. Las tinciones con H&E y tricrómico de Masson mostraron septación e infiltración celular por grasa nativa a través del material compuesto, formación de capilares alrededor del perímetro y regeneración de porciones glandulares y adipocitarias de grasa nativa (Fig. 12). Por otro lado, el control con hidrogel de HA carecía de infiltración celular y formaba una fina lámina de tejido fibrótico y respuesta de cuerpo extraño. Este hidrogel de HA se preparó con 2 kPa para garantizar una propiedad mecánica suficiente. Este resultado pone de relieve la importancia de la porosidad del andamiaje para la infiltración celular.

En un primer momento (2 semanas), se encontraron células mesenquimales del lecho de la herida infiltradas en el material, lo que sugiere que el material tiene suficiente porosidad para permitir el crecimiento interior celular nativo (tinción rosa oscuro en la Figura 12). Cabe destacar que el crecimiento interior celular se logró incluso en ausencia de factores de crecimiento exógenos. La presencia de células infiltradas en el material, en lugar de simplemente rodearlo, distingue a este nanomaterial compuesto de otros materiales aloplásticos de uso corriente. Estos últimos materiales están amurallados por una cápsula fibrosa y, por tanto, son menos deseables para la reconstrucción de tejidos blandos. En momentos posteriores (4 semanas), el crecimiento interior celular es aún más evidente con la aparición de zonas vacuolares que pueden representar una diferenciación adipocitaria incipiente.

Ejemplo 10: Formulación heparinizada

También se ha preparado una formulación de material compuesto con heparina conjugada con el ácido hialurónico. Esta formulación se probó in vivo de forma idéntica al andamiaje preformado anterior. El tejido se recogió (n=3) a los 7, 14, 30 y 90 días. Muchos factores de crecimiento relevantes tienen dominios de unión a heparina, tal como el bFGF, el PDGF y el VEGF. La heparina conjugada puede servir para dos propósitos: en primer lugar, puede unirse a muchos de los factores de crecimiento endógenos que estarán presentes en el lugar de la inyección y servir como depósito local y señal atractiva para el tejido en regeneración. En segundo lugar, el material compuesto heparinizado puede utilizarse para precargar el andamiaje con factores de crecimiento para potenciar mejor la regeneración. Los andamiajes heparinizados mostraron una mayor angiogénesis a los 7 y 14 días en comparación con los andamiajes de materiales compuestos no heparinizados, pero resultados similares a los 30 y 90 días.

Ejemplo 11: Formulación inyectable

El material compuesto de hidrogel-nanofibra también se ha formulado en una variante inyectable. Se mezclaron 200 µl de la misma composición utilizada para el material compuesto preformado utilizado in vivo (5 mg/mL de HA tiolado, 5 mg/mL de PEG-DA, 12,5 mg/mL de fibras) y se dejaron fraguar parcialmente en la jeringa durante 8-10min. En este momento, el material compuesto es un líquido viscoso y fluido que puede inyectarse a través de una aguja quirúrgica (Fig. 20). Una vez inyectado, el material compuesto mantiene su forma cuando se invierte y es no dispersivo, mantiene su forma y no se hincha cuando se sumerge en agua. Para comprobar la biocompatibilidad del material compuesto inyectable, la suspensión se inyecta en la almohadilla de grasa inguinal de la rata a través de una aguja de calibre 21. A continuación, se recogió el tejido (n=3) a los 7, 14, 30 y 90 días y se analizó de forma idéntica a los ejemplos anteriores. El material compuesto demostró una amplia remodelación celular a los 30 días, manteniendo el volumen y sin causar encapsulación fibrótica. Los adipocitos en fase inicial pueden verse claramente desarrollándose dentro del material compuesto.

Ejemplo 12: Discusión de los Ejemplos 5-11

Los hidrogeles han sido ampliamente estudiados como material de relleno para la regeneración de defectos tisulares debido a su entorno hidratado 3D y alta porosidad, que facilitan la migración celular. Sin embargo, los hidrogeles han demostrado ser malos sustitutos de los defectos volumétricos, porque las propiedades mecánicas relativamente débiles del hidrogel son insuficientes para mantener su volumen durante todo el periodo de regeneración tisular, ya que el hidrogel puede degradarse y colapsarse fácilmente por los fluidos corporales y las tensiones internas y externas. Para mejorar las propiedades mecánicas del hidrogel, las principales estrategias en este campo han sido (i) aumentar la concentración de los precursores del hidrogel, (ii) aumentar la densidad de la red de reticulación dentro del hidrogel, e (iii) introducir materiales de refuerzo tal como, por ejemplo, incrustando partículas de hidroxiapatita o laminando con láminas de fibra. [Mater Chem Physics, 2008, 107, 364-369, Biomaterials 2006, 27, 505-518, Acta Biomaterialia 2010, 6, 1992-2002]. Desgraciadamente, estas estrategias de refuerzo reducen inherentemente el tamaño medio de los poros y la porosidad del hidrogel resultante, impidiendo que las células pudieran migrar a estos hidrogeles. Por lo tanto, se buscó reforzar los hidrogeles mediante un nuevo mecanismo que siguiera conservando la alta porosidad que permite la rápida infiltración celular. Se diseñó un material compuesto mediante la introducción de nanofibras funcionalizadas que pudieran reforzar el material compuesto de hidrogel global, dejando al mismo tiempo la fase de hidrogel prácticamente intacta, incluyendo la porosidad. El material compuesto de fibra-hidrogel resultante mejora los anteriores materiales compuestos de tejidos blandos gracias a dos componentes clave. En primer lugar, las nanofibras debían dispersarse uniformemente con un alto nivel de carga dentro del hidrogel para conseguir un refuerzo isotrópico. En el campo de la ingeniería tisular se han utilizado generalmente nanofibras electrohiladas en forma de láminas planas o esteras de fibras. A continuación, se suelen convertir en materiales compuestos impregnando las esteras con una solución de precursor de hidrogel.

Esto restringe en gran medida la dispersión de las nanofibras por todo el hidrogel y limita la geometría de los materiales compuestos a láminas o tubos 2D. Aunque estas geometrías son útiles para determinadas aplicaciones, tal como la reparación de nervios o los apósitos para heridas, no son buenas opciones para reparar defectos volumétricos. Criomoliendo las láminas de fibra, fue posible reducir la longitud media de las fibras a la longitud suficientemente corta que les permite permanecer en suspensión en soluciones acuosas. Así, las muestras se pipetearon fácilmente en soluciones precursoras de hidrogel, creando una dispersión

uniforme de fragmentos de nanofibras en todo el volumen del hidrogel antes de la gelificación. A continuación, la solución puede utilizarse directamente como formulación inyectable o añadirse a moldes para formar geles de andamiaje de cualquier geometría arbitraria, a diferencia de la geometría plana limitada de la mayoría de las mallas de nanofibras electrohiladas. La estructura de material compuesto de fibras dispersas dentro de un hidrogel también recapitula la arquitectura fibrosa de la matriz extracelular (Fig. 6G), proporcionando sitios de adhesión que pueden ayudar a la migración celular dentro del material compuesto.

En segundo lugar, la simple dispersión de las nanofibras dentro del hidrogel es insuficiente para formar un material compuesto resistente. Estos datos indicaban que la mera inclusión de las nanofibras por sí mismas proporcionaba muy poca mejora en el módulo elástico del material compuesto, produciéndose mejoras únicamente cuando se introducía la unión interfacial. La unión interfacial es necesaria porque sin la formación de un enlace fuerte entre los componentes de hidrogel y fibra, los componentes de agua e hidrogel podrían deslizarse más allá de los componentes de fibra sin transferir las cargas al material más rígido. Además, la interfaz entre materiales tan dispares podría provocar la delaminación y el fallo del material compuesto. Además, la hidrofobicidad inicial del PCL dificulta su dispersión en soluciones acuosas, ya que las fibras se agrupan preferentemente y forman coágulos que se salen de la suspensión. El tratamiento con plasma y la posterior funcionalización con grupos de ácido carboxílico y grupos de amina aumentan enormemente la hidrofiliidad de las fibras y permiten la dispersión. El espectacular aumento de las propiedades mecánicas sólo se produjo cuando se produjo la unión interfacial entre los grupos maleimida de las superficies de las fibras y los grupos tiol de las moléculas de ácido hialurónico. Esta unión covalente transfiere las cargas de forma más eficaz a las fibras durante la compresión o la tensión, lo que se traduce en un material más rígido y resistente. Además, los materiales compuestos muestran una fuerte tendencia al aumento de los módulos elásticos con el aumento de la densidad de maleimida, lo que pone de relieve su primacía en el mecanismo de refuerzo, así como la naturaleza sintonizable del refuerzo.

En este estudio, se identificó que era posible sintonizar las propiedades mecánicas del material compuesto de fibra-hidrogel mediante diversos factores, incluyendo la superficie total de las fibras, la densidad de los grupos funcionales maleimida en la superficie de las fibras y la cantidad de fibras cargadas en el hidrogel. En primer lugar, los materiales compuestos con un menor diámetro de fibras mostraron un mayor módulo de almacenamiento a compresión y cizallamiento que los materiales compuestos con un mayor diámetro de fibras (Fig. 7A y Fig. 8C). Del mismo modo, en la bibliografía, una sola fibra de polietileno de peso molecular ultraalto (UHMWPE) (~25µm), que se activó con plasma utilizando glutaraldehído, mostró un aumento de aproximadamente 2,36 veces de la resistencia al cizallamiento interfacial en un hidrogel de poli(alcohol vinílico) en comparación con ella de un haz de fibras de UHMWPE de 60 [Acta Biomaterialia 2014, 10, 3581-3589]. Por lo tanto, es posible que la disminución del diámetro de la fibra y, por lo tanto, el aumento de la superficie específica de la fibra sea eficaz para mejorar las propiedades mecánicas del material compuesto. Sin embargo, cada grupo de fibras tenía una densidad superficial de MAL ligeramente diferente en las fibras (aproximadamente 10-15nmol/mg), por lo que no puede determinarse definitivamente el efecto de la superficie de las fibras por sí sola. Así pues, en segundo lugar, se fabricaron materiales compuestos con fibras del mismo diámetro, pero con distintas densidades de superficie de MAL sobre las fibras (Fig. 8). Los módulos de almacenamiento de compresión y cizallamiento de los materiales compuestos aumentaron con el incremento de la densidad superficial de MAL en las fibras. Se confirmó que un material compuesto sin la unión interfacial mostraba sólo un ligero aumento de su módulo de compresión (Fig. 7) utilizando fibras modificadas mediante el paso PAA (grupos carboxilo en las fibras), pero no los pasos posteriores de conjugación MAL. La importancia de la unión interfacial se confirmó además apagando los grupos MAL de las fibras con cisteína antes de la gelificación. La cisteína se conjuga con el grupo maleimida e impide la unión interfacial entre las fibras y el hidrogel, lo que nos permite aislar sólo el efecto de la unión interfacial, ya que, por lo demás, las fibras se procesaron de forma idéntica a los grupos de unión interfacial. Curiosamente, las propiedades mecánicas de los materiales compuestos con las fibras apagadas con MAL disminuyeron drásticamente (Fig. 7A y Fig. 8B), mostrando el grupo de fibras apagadas con MAL un módulo de compresión inferior al del hidrogel de HA solo cuando la concentración de HA era de 10mg/ml (Fig. 7). Es posible que las fibras apagadas con MAL debilitaran el material compuesto global al deslaminar fácilmente en la interfaz de las fibras y el hidrogel, como se observa en estudios anteriores [Acta Biomaterialia 2014, 10, 3581-3589]. Además, las fibras sin grupos funcionales pueden estar actuando como una sustancia extraña que inhibe la gelificación en comparación con un hidrogel puro compuesto por un componente o sin ninguna sustancia extraña durante la gelificación [JMC B 2015, DOI: 10.1039/C3TB21830A, Journal of Biomedical Materials Research Part A 2010, 95 (2), 564-573]. Además, se verificó una correlación significativa entre el módulo de almacenamiento de cizallamiento y la densidad de la unión interfacial por materiales compuestos con diversas densidades superficiales de MAL (Fig. 8C). Estos estudios proporcionan pruebas sólidas de que las propiedades mecánicas del hidrogel podrían reforzarse y ajustarse mediante la unión interfacial. En tercer lugar, el módulo de almacenamiento de cizallamiento de los materiales compuestos mejoró con el aumento de la proporción de peso de las fibras con respecto al hidrogel (Fig. 9). De este modo, se confirmó que la relación de peso era otra variable que podía utilizarse para ajustar las propiedades mecánicas de un material compuesto de fibra-hidrogel. Sin embargo, aquí se confirmó que, con el aumento de la carga de fibra, los aumentos del módulo de almacenamiento de cizallamiento comenzaron a nivelarse e incluso disminuyeron ligeramente por encima de 0,6 de la relación de peso. Una posibilidad para este efecto de saturación puede ser que la densidad de unión interfacial de un material compuesto se viera

disminuida por la forma en que el exceso de fibras con MAL reaccionó con una gran fracción de los grupos tiol de HA, impidiéndoles reaccionar con el PEGDA para la gelificación. Teniendo en cuenta que el mayor módulo de almacenamiento al cizallamiento del hidrogel de HA se obtuvo con una cantidad equimolar de cada grupo funcional de HA-SH y PEGDA, así como el módulo de almacenamiento al cizallamiento decreciente con cantidades excesivas de HA-SH o DA (Fig. 14A), el exceso de MAL en las fibras con el aumento de la cantidad de fibras podría interrumpir la unión SH-DA dentro de un material compuesto.

Generalmente, los biomateriales implantados tienen que soportar numerosas tensiones internas y externas durante la regeneración del defecto tisular. Aunque la tensión no es severa y continua, se realizaron pruebas de resistencia a la tensión bajo una condición de repetición y una alta frecuencia (10 Hz) para imitar dichas tensiones (Fig. 10 y Fig. 8). Tanto el hidrogel de HA como el material compuesto de hidrogel de fibra-HA resistieron sin sufrir daños ni reducir su resistencia mecánica durante la repetición de la tensión de compresión. Cabe destacar que los materiales compuestos con la unión interfacial conservaron su módulo de almacenamiento al cizallamiento a 10 Hz de frecuencia, mientras que el módulo de almacenamiento al cizallamiento del hidrogel de HA y del material compuesto sin la unión interfacial disminuyó a 10 Hz. Esta tendencia indica que la unión interfacial con las fibras dispersas es crucial para el refuerzo de las propiedades mecánicas del material compuesto. Además, los materiales compuestos de fibra-HA mantuvieron sus dimensiones y sus módulos de Young tras someterse a liofilización y posterior rehidratación, mientras que el gel de HA solo se encogió sustancialmente bajo el mismo procedimiento (Fig. 6C y Fig 10). Este mantenimiento de la forma, el volumen y la rigidez tras la deshidratación y rehidratación es una característica importante para la traslación clínica de esta tecnología, ya que disponer de una forma liofilizada del material compuesto facilitaría la esterilización y el almacenamiento del producto comercial.

Para la reconstrucción de tejidos blandos, el andamiaje implantado ideal rellenaría inmediatamente el vacío del defecto, pero también serviría de sustrato para que las células del propio organismo crecieran en el andamiaje, proliferaran y se diferenciaban en el fenotipo tisular adecuado, sustituyendo finalmente el andamiaje artificial por tejido normal y sano. Por lo tanto, es de vital importancia que las células relevantes puedan migrar dentro del hidrogel o del andamiaje del material compuesto. Para determinar el potencial de migración de los tipos celulares relevantes dentro de los andamiajes, se sembraron esferoides de hASC en el interior de hidrogeles de HA y materiales compuestos de hidrogel de fibra-HA y se evaluó su migración celular. Las hASCs no pudieron migrar dentro del hidrogel de HA solo porque el hidrogel de HA era demasiado blando para servir a las fuerzas de tracción para la migración celular (Fig. 11A) [Biomaterials 2015, 42, 134-143]. Curiosamente, aunque el módulo de almacenamiento de cizallamiento de los materiales compuestos fue similar al del hidrogel de HA, las hASCs fueron capaces de migrar significativamente lejos de un esferoide dentro de los materiales compuestos (Fig. 11). Una hipótesis es que las fibras del interior de un material compuesto pueden estar proporcionando sitios de adhesión para guiar la migración celular de forma similar a los componentes de las fibrillas de la ECM nativa del tejido adiposo. Anteriormente se demostró que las fibras alineadas y aleatorias podrían ser un factor crítico para la adhesión, proliferación, diferenciación y migración celular en diversos tipos celulares [Biomaterials 2005, 26, 2537-2547/2006, 27, 6043-6051/2009, 30, 556-564/2010, 31, 9031-9039, Acta Biomaterialia 2013, 9, 7727-7736]. Especialmente, se observó que las células reconocían las fibras como una matriz guía, ya que sus citoesqueletos se alineaban con las fibras subyacentes y las seguían [Biomaterials 2006, 30, 6043-6051/2009,30, 556-564]. Sin embargo, el diámetro de las fibras en el interior de los materiales compuestos no afectó a las células migratorias, ya que éstas migraron sólidamente en los materiales compuestos con nanofibras de 1000 nm o 286 nm (Figura 19).

Los efectos de porosidad y migración celular observados en las pruebas de banco y en el cultivo celular in vitro se tradujeron en profundas diferencias durante las pruebas in vivo de los materiales compuestos. Los hidrogeles formulados con una rigidez que imita la grasa de 2 kPa sin fibras tenían una porosidad demasiado baja para la infiltración celular. La respuesta celular fue tapar el hidrogel con una gruesa capa de colágeno, con la ausencia de infiltración o remodelación típica de una respuesta a cuerpo extraño. Sin embargo, el material compuesto de nanofibras-hidrogel tenía suficiente porosidad para facilitar el crecimiento interior celular, la vascularización y la remodelación celular sin la respuesta de cuerpo extraño. Esto ofrece la perspectiva de rellenar permanentemente el defecto volumétrico del cuerpo con lo que en última instancia se tejerá del propio cuerpo. Los resultados fueron aún más pronunciados en la formulación inyectable, que puede formar una interfaz más estrecha con el tejido huésped y mostró signos de adipogénesis robusta.

Conclusiones

La dispersión de nanofibras funcionalizadas dentro de un hidrogel forma una estructura de material compuesto con las resistencias combinadas de los dos componentes. La unión interfacial entre las nanofibras y los componentes del hidrogel es fundamental para obtener un material compuesto resistente, al tiempo que se mantiene una porosidad y un tamaño de poro elevados para facilitar el crecimiento interior de tejidos y células. Las propiedades del material compuesto resultante pueden ajustarse fácilmente variando el diámetro de la fibra, el nivel de carga de la fibra, el nivel de densidad de maleimida y los niveles de carga de los componentes del hidrogel. Esto permite una menor reticulación y una mayor porosidad con una rigidez global específica, lo que aumenta la infiltración celular y la consiguiente remodelación tisular. Las propias fibras también pueden mejorar directamente la migración celular al proporcionar sitios de adhesión similares a los observados en la ECM

- 5 nativa. El implante de material compuesto resultante puede ajustarse para igualar la rigidez del tejido adiposo nativo, pero manteniendo la permeabilidad para la infiltración celular y la remodelación. Este novedoso material compuesto es lo suficientemente resistente como para rellenar inmediatamente un defecto volumétrico de cualquier forma arbitraria. A continuación, el implante de material compuesto sirve de andamiaje permisivo para que las células del propio organismo se infiltren en el material compuesto, formen vasos sanguíneos y se diferencien en células como los adipocitos. El andamiaje se degradará lentamente durante la remodelación tisular, hasta que el vacío inicial del defecto haya sido sustituido completamente por tejido normal y sano. La estructura de material compuesto tiene un gran potencial para la cirugía reconstructiva y estética.

REIVINDICACIONES

1. Un complejo de andamiaje isotrópico como formulación inyectable que comprende una fibra polimérica o fragmentos de la misma con un diámetro medio de 100 nm a 8000 nm unidos covalentemente a un material hidrogel,
- 5 en el que la fibra polimérica o sus fragmentos comprenden una policaprolactona, y el material de hidrogel comprende ácido hialurónico,
en el que el material de hidrogel es capaz de formar una red funcional y en el que la relación entre la fibra polimérica y el material de hidrogel es de 1:10 a 10:1 con base en la masa del componente, o de 1 a 50mg/mL con base en la concentración, en el que el complejo de andamiaje comprende una pluralidad de poros presentes en o dentro de una superficie del complejo de andamiaje, en el que los poros están presentes en una
10 concentración de al menos aproximadamente 50 poros por cm² de la superficie, y en el que al menos el 80% de los poros tienen un diámetro medio de poro en la superficie de al menos aproximadamente 5 µm (micrómetros) y en el que la fibra polimérica o fragmentos de la misma están uniformemente dispersos.
2. El complejo de andamiaje de la reivindicación 1, en el que el material de hidrogel está unido a la superficie exterior de la fibra polimérica.
15
3. El complejo de andamiaje de la reivindicación 1, en el que la fibra polimérica o fragmentos de la misma comprenden una policaprolactona electrohilada.
4. El complejo de andamiaje de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la fibra polimérica o fragmentos de la misma comprenden además un material polimérico sintético que comprende un poli(ácido láctico-co-glicólico), y/o un ácido poliláctico o una combinación de los mismos.
20
5. El complejo de andamiaje de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el material de hidrogel comprende además un poli(etilenglicol), un colágeno, un dextrano, una elastina, un alginato, un poli(alcohol vinílico), o una combinación de los mismos.
6. El complejo de andamiaje de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el material de hidrogel comprende una matriz extracelular de tejido procesado, en el que la matriz extracelular de tejido procesado es derivable de un tejido adiposo.
25
7. Un dispositivo médico para retener la forma del tejido en un sujeto sometido a un procedimiento quirúrgico, que comprende el complejo de andamiaje de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en una cantidad eficaz para proporcionar la retención de la forma de un tejido cuando se administra al sujeto.
8. Un procedimiento para preparar un implante para reparación de tejido o cartílago que comprende un complejo de andamiaje isotrópico de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento los pasos de: proporcionar un andamiaje acelular tridimensional que comprende fibras poliméricas orientadas para producir una pluralidad de poros, en el que al menos una porción de las fibras poliméricas están reticuladas a una red formadora de hidrogel para formar un material compuesto reticulado; y reaccionar o estabilizar el complejo para
30 formar un implante estabilizado preparando así el implante.
9. Un complejo de andamiaje o un dispositivo médico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en un procedimiento de reducción o reversión de un defecto tisular resultante de un traumatismo, una intervención quirúrgica o una enfermedad, trastorno o afección asociada a la edad.
10. Un complejo de andamiaje o dispositivo médico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en un procedimiento de promoción del crecimiento interior tisular en un tejido objetivo de un sujeto humano.
40

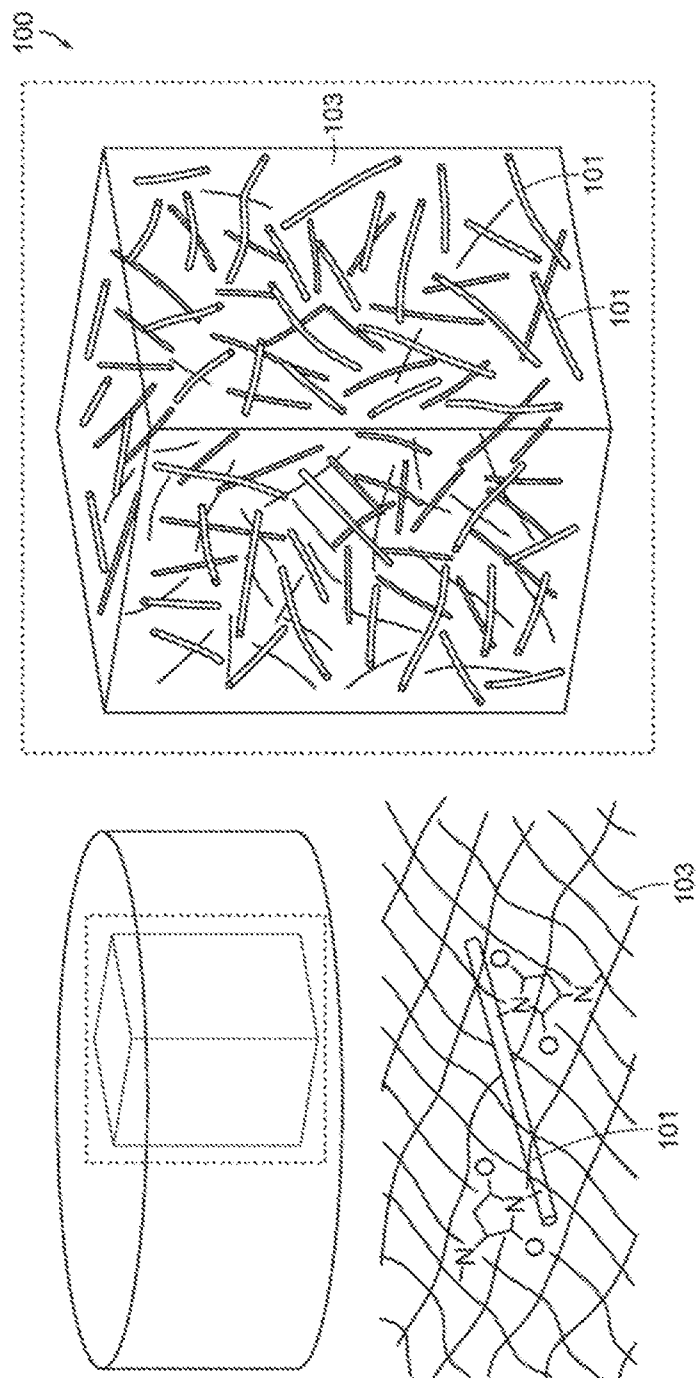


FIG. 1A

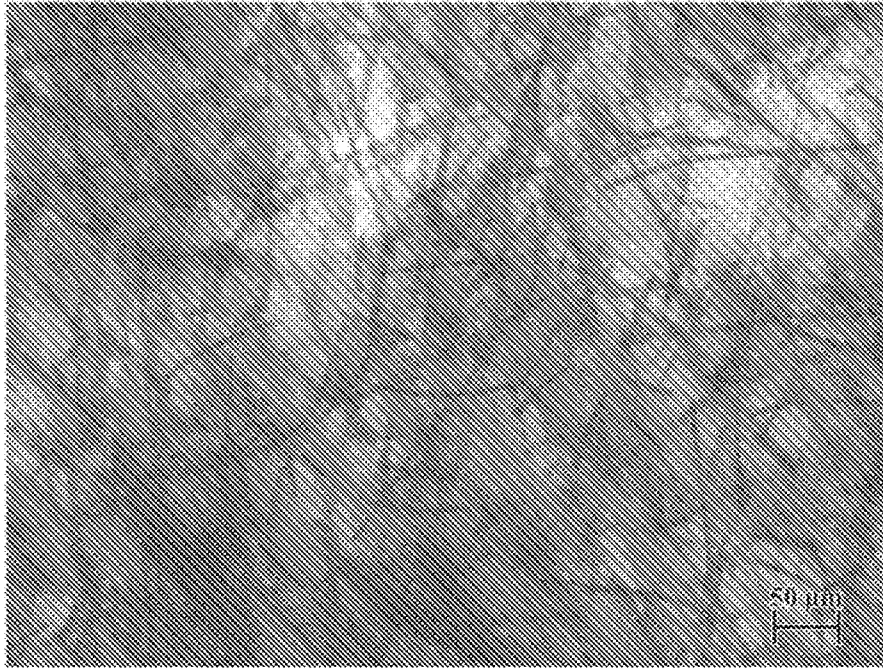


FIG. 1B

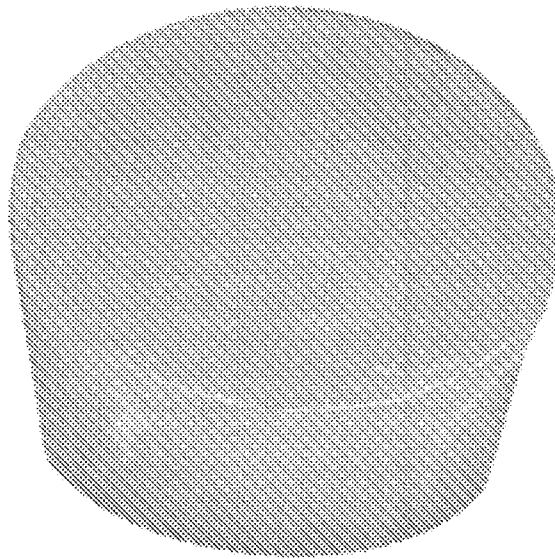


FIG. 1C

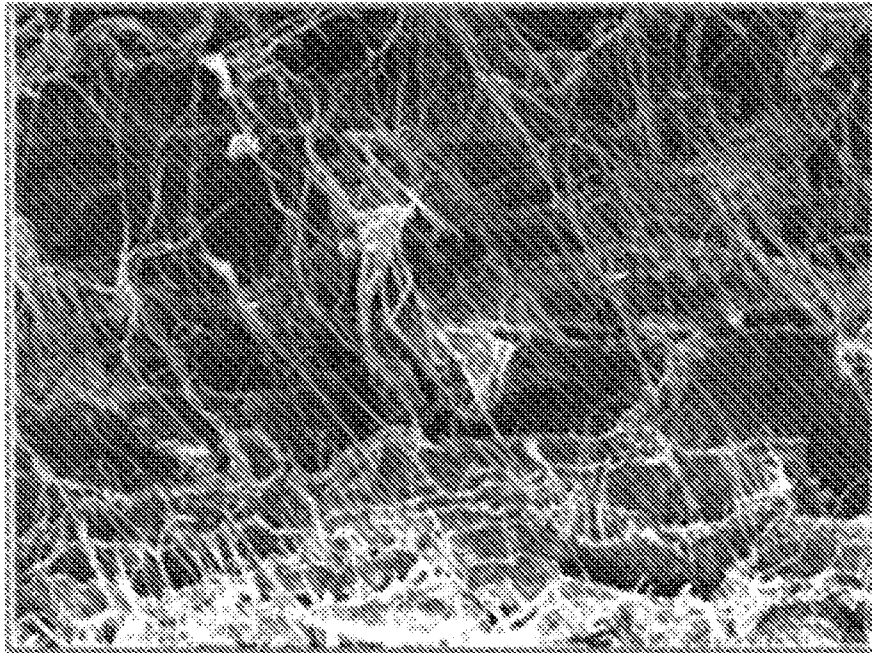


FIG. 1D

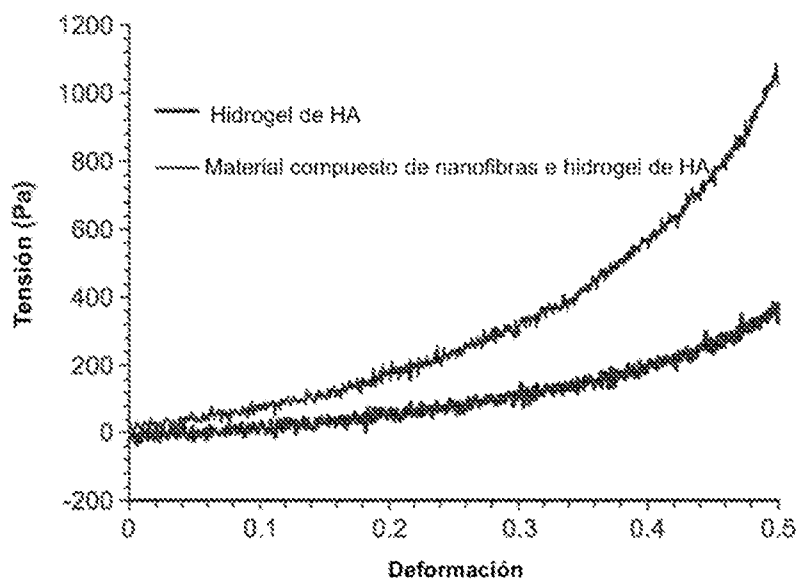


FIG. 2A

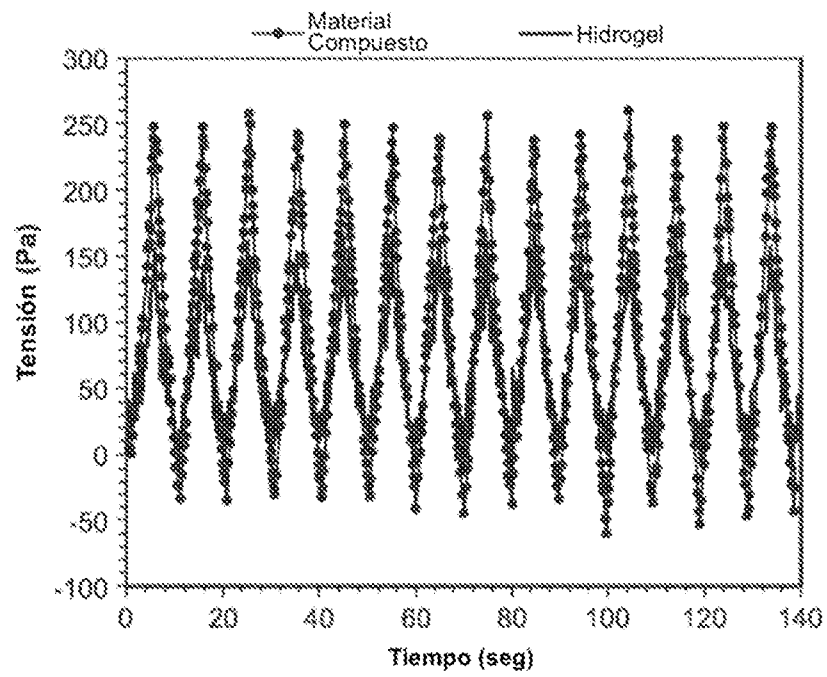


FIG. 2B

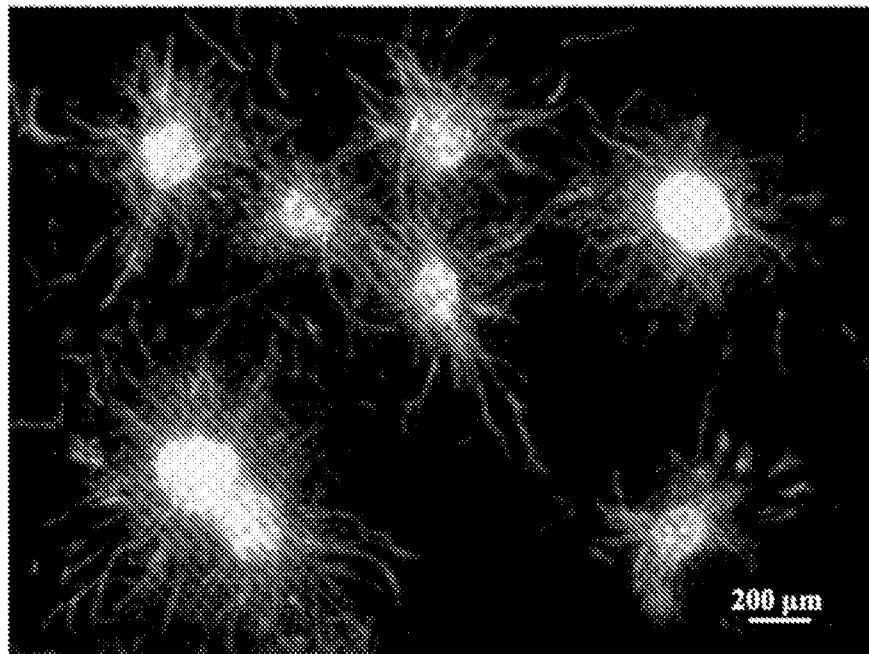


FIG. 3A

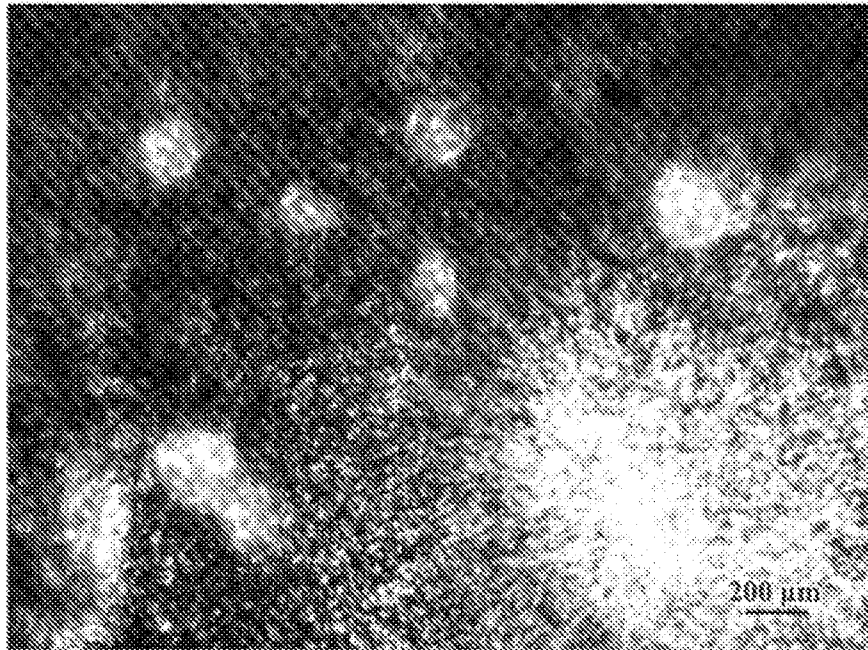


FIG. 3B

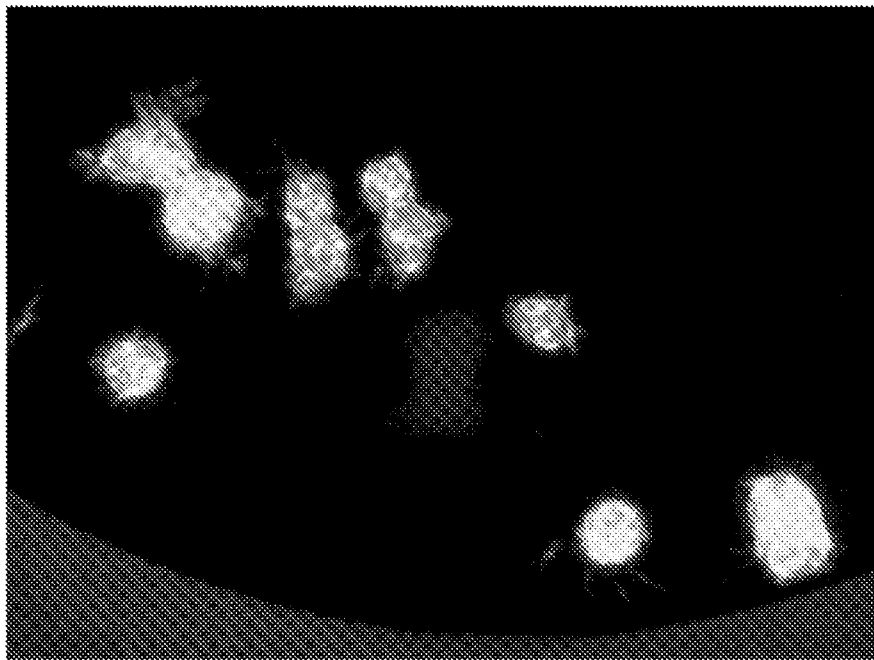


FIG. 3C

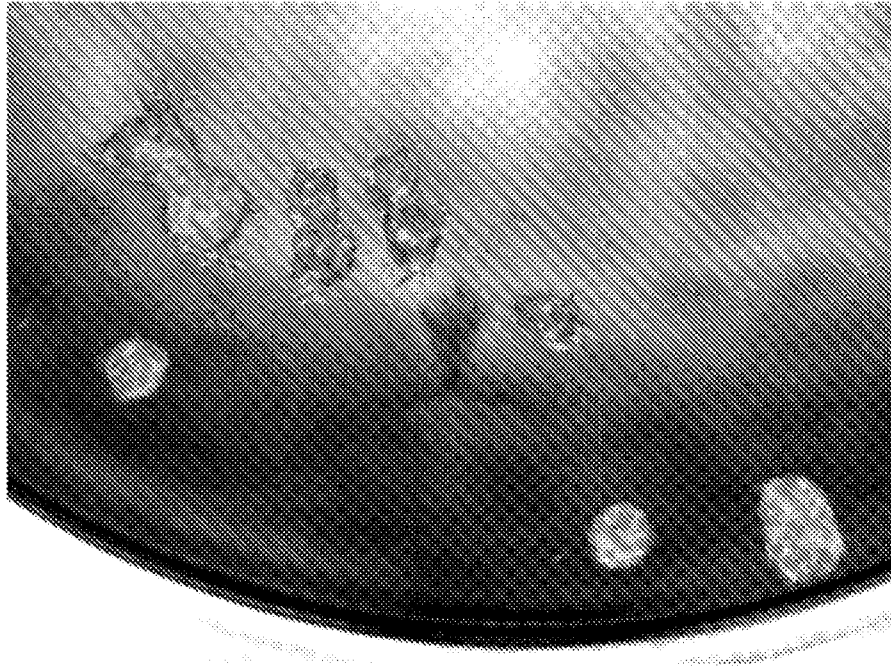


FIG. 3D

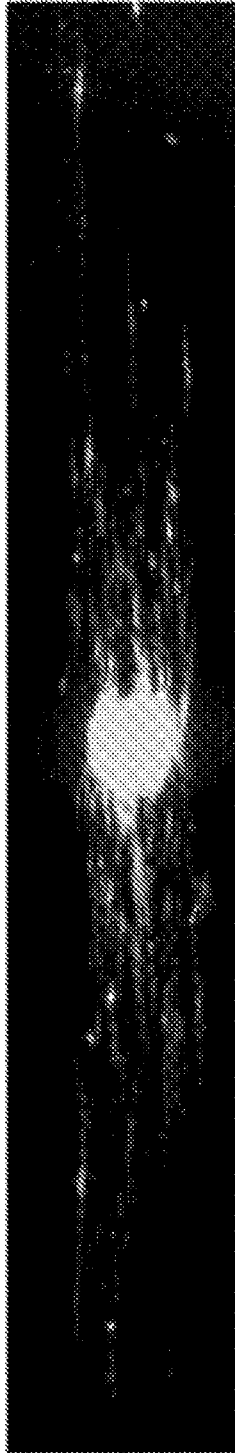


FIG. 4A



FIG. 4B

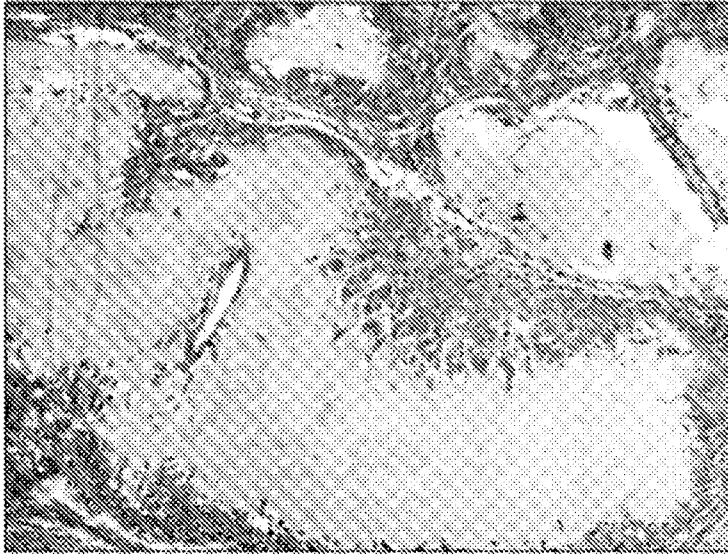


FIG. 5B

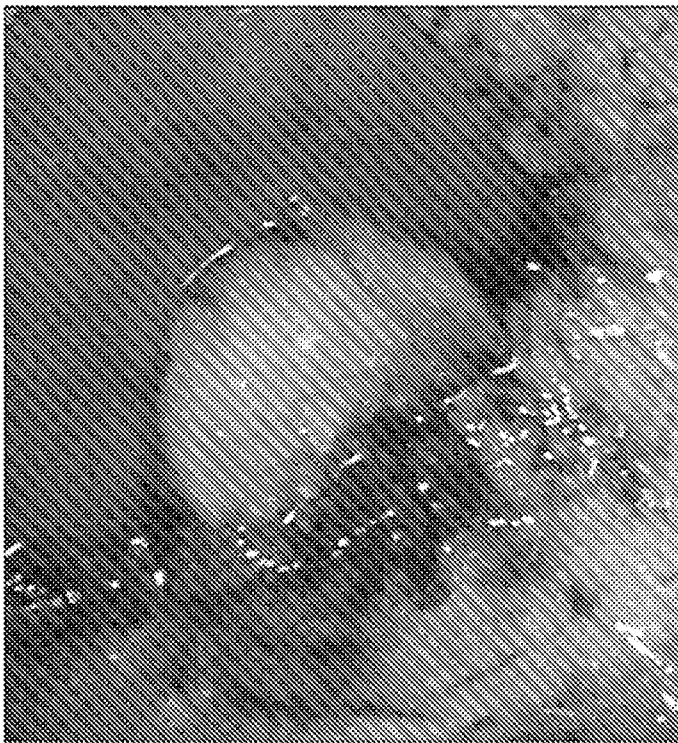


FIG. 5A

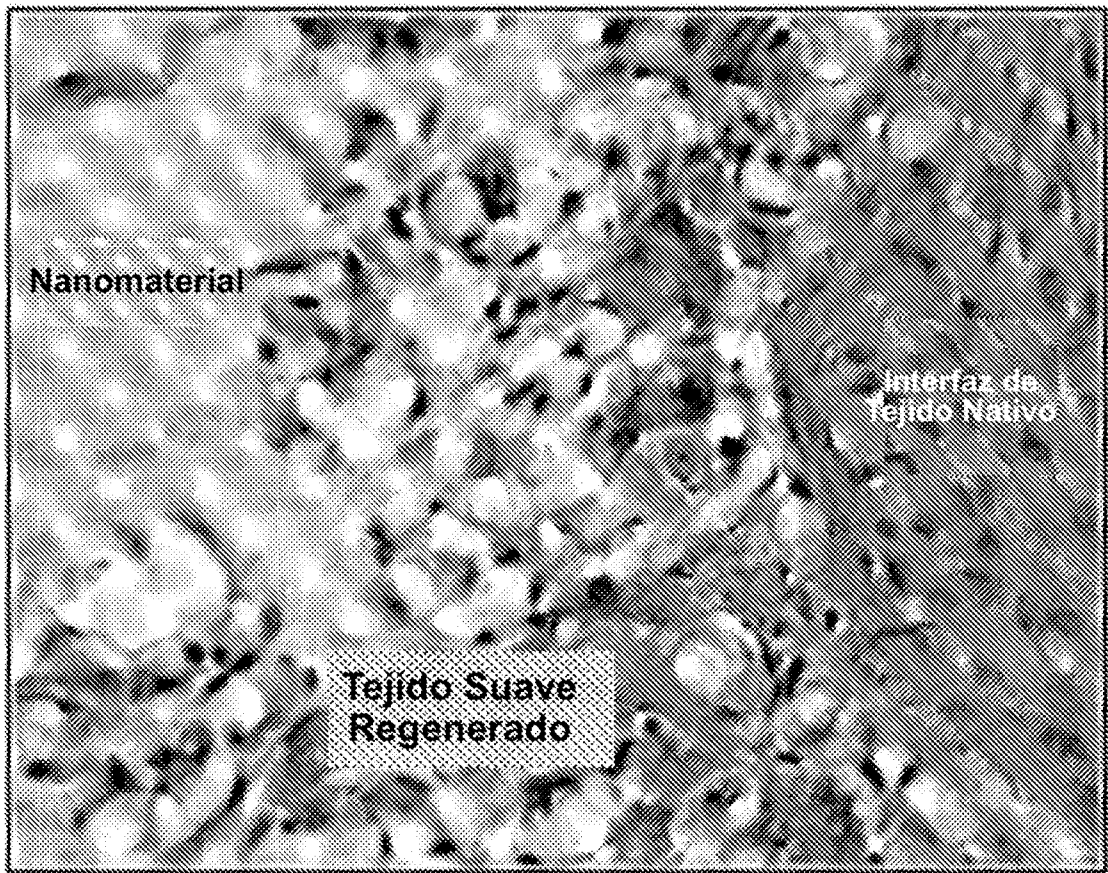
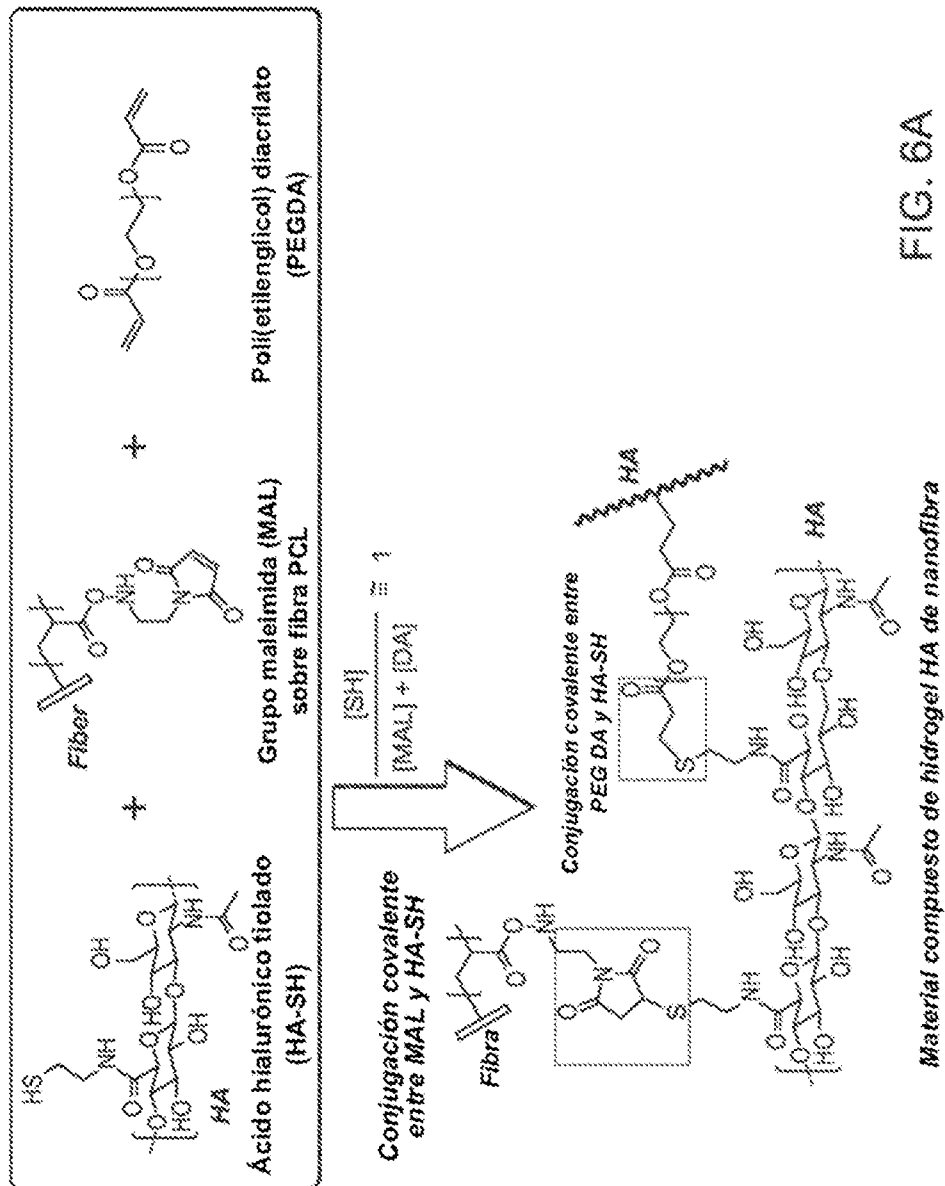


FIG. 5C



66

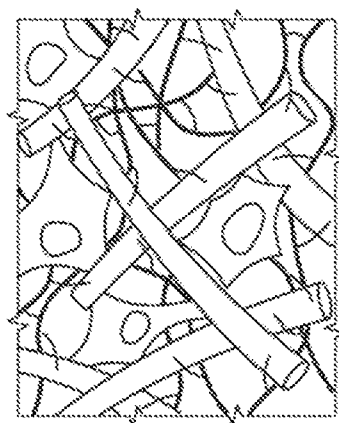


FIG. 6B

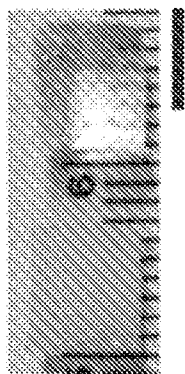


FIG. 6C

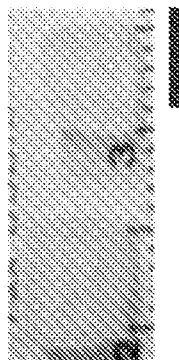


FIG. 6D

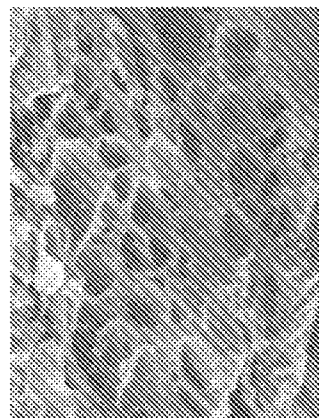


FIG. 6E

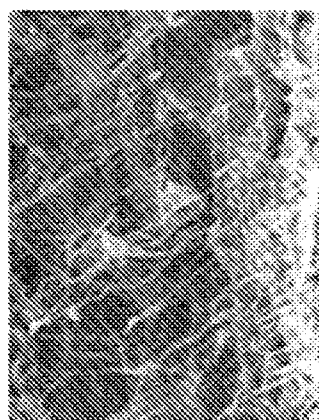


FIG. 6F

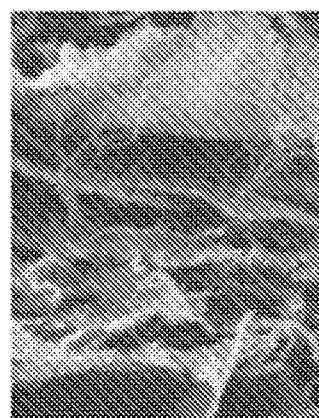


FIG. 6G

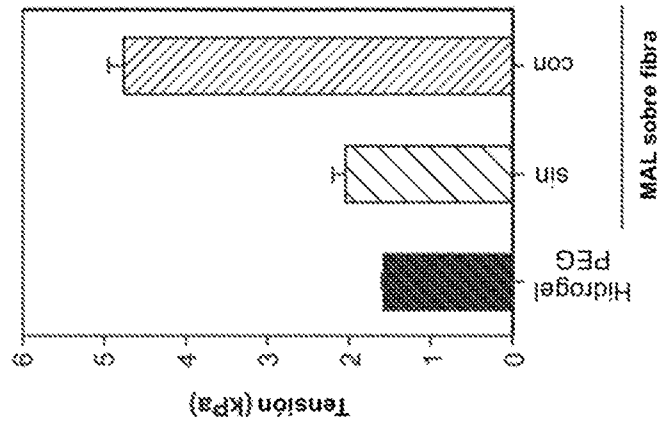


FIG. 7B

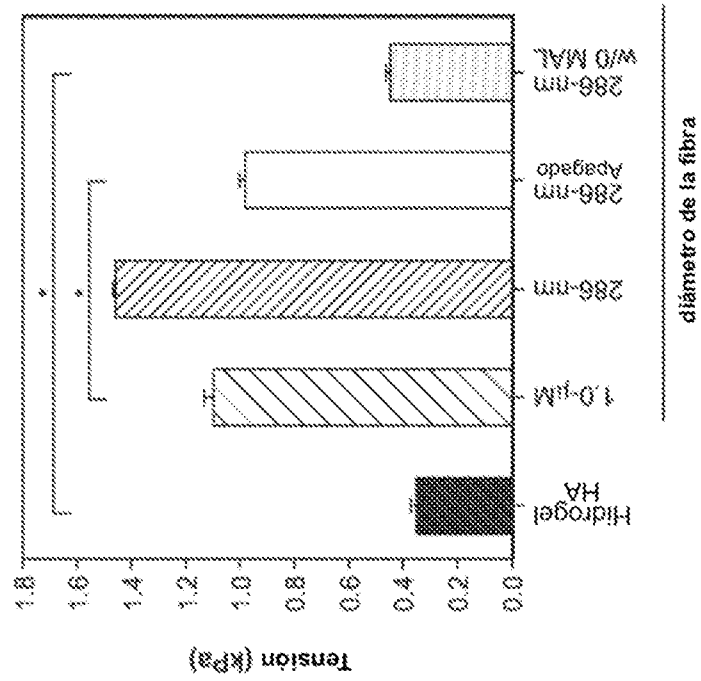


FIG. 7A

FIG. 8A

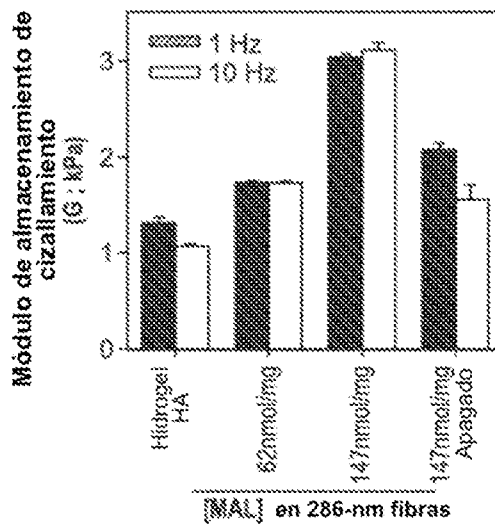


FIG. 8B

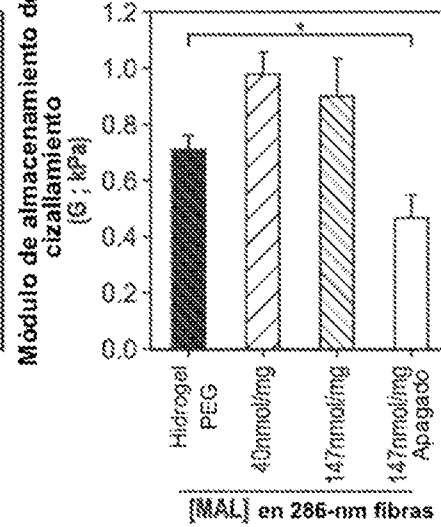


FIG. 8C

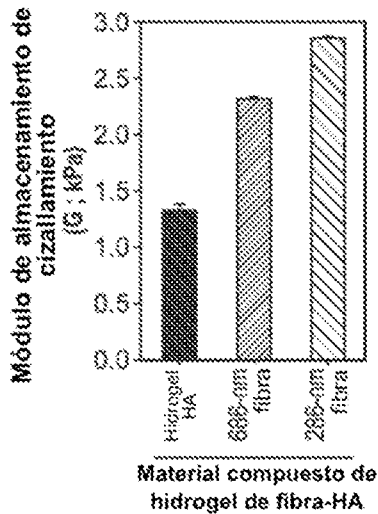
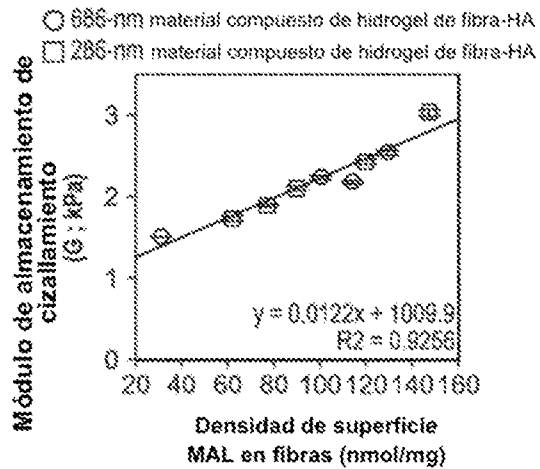


FIG. 8D



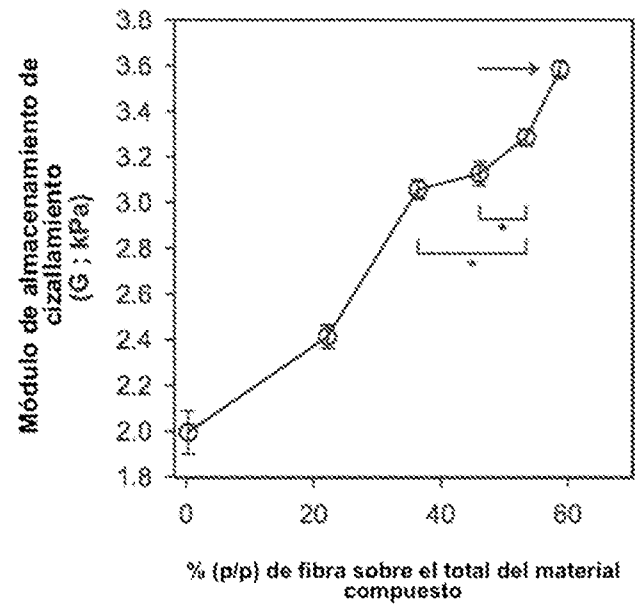


FIG. 9A

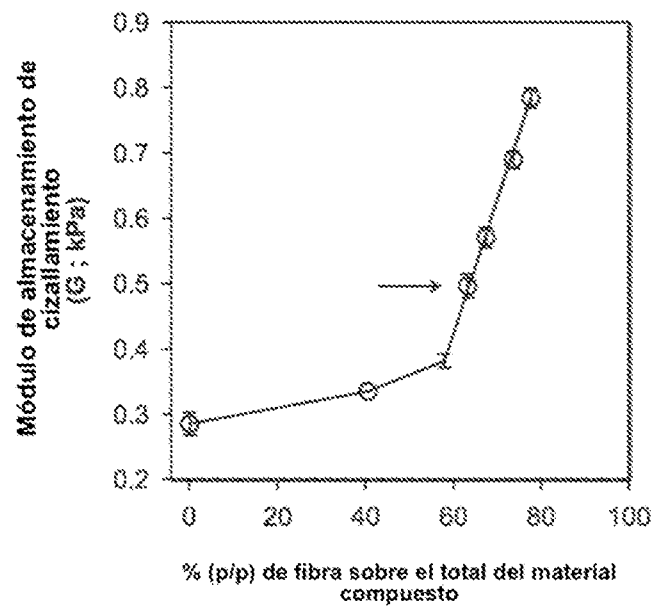


FIG. 9B

FIG. 10A

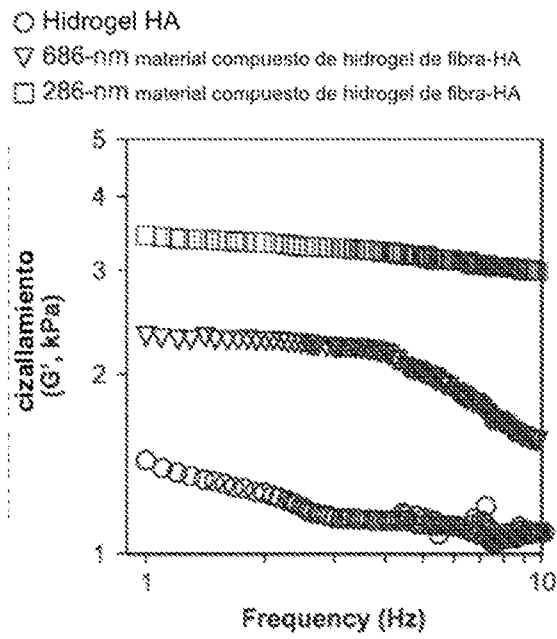


FIG. 10B

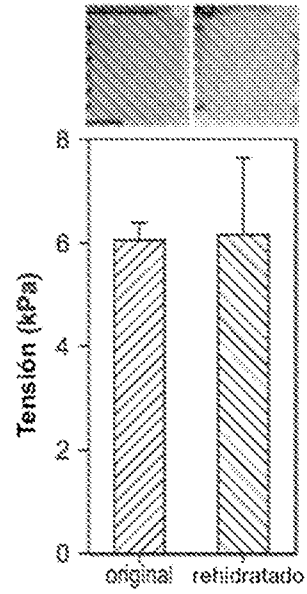
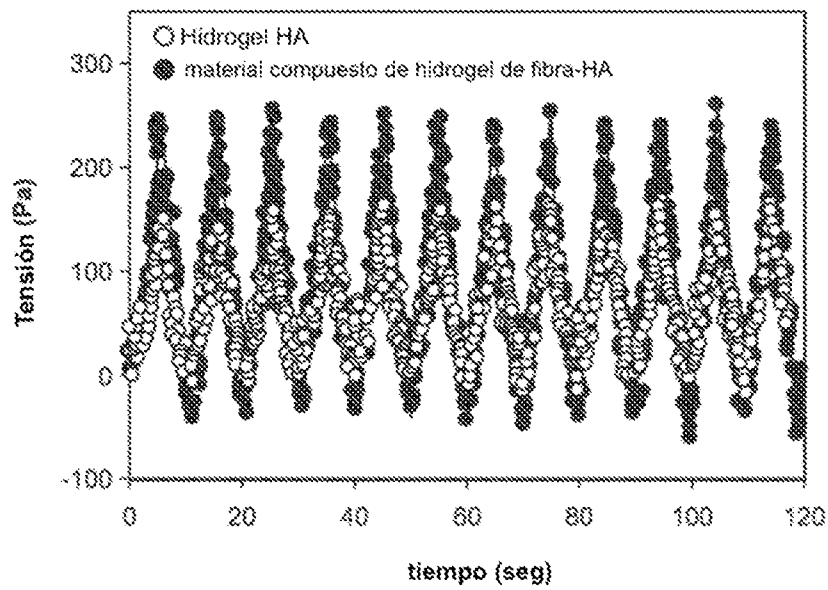


FIG. 10C



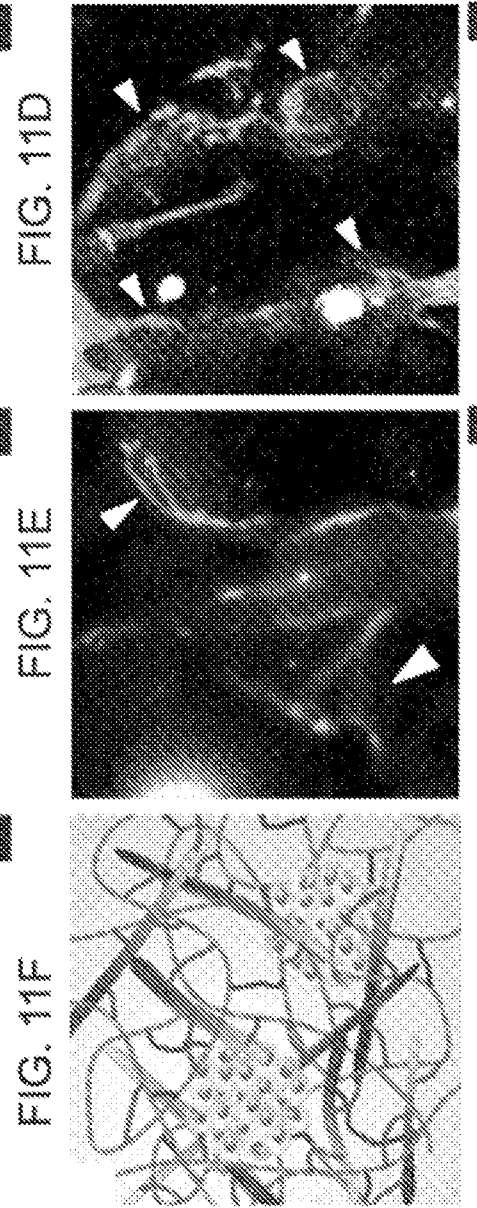
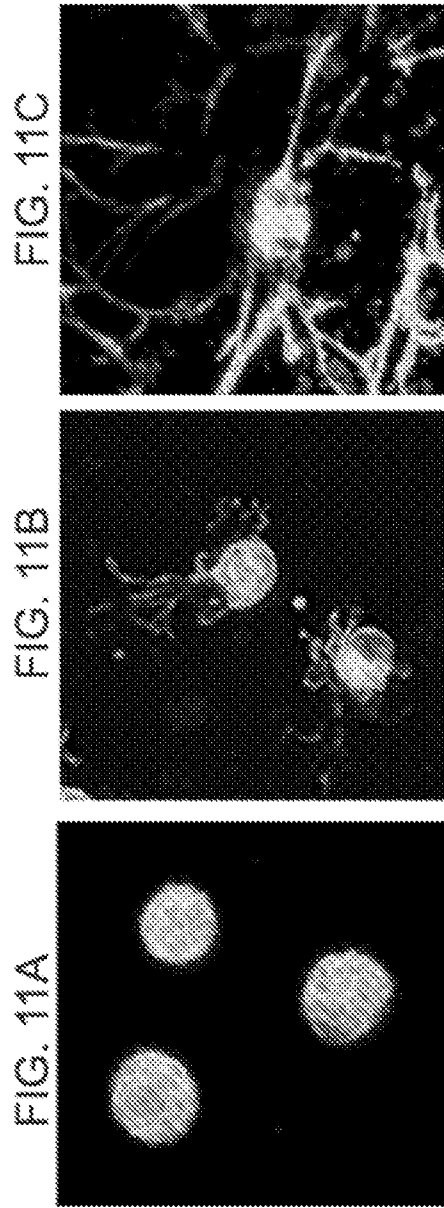


FIG. 12A

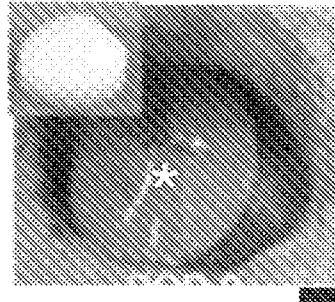


FIG. 12B

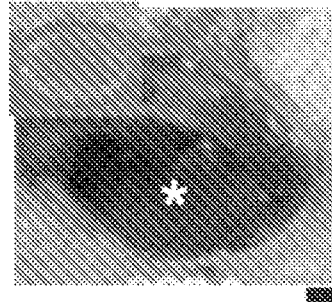


FIG. 12C

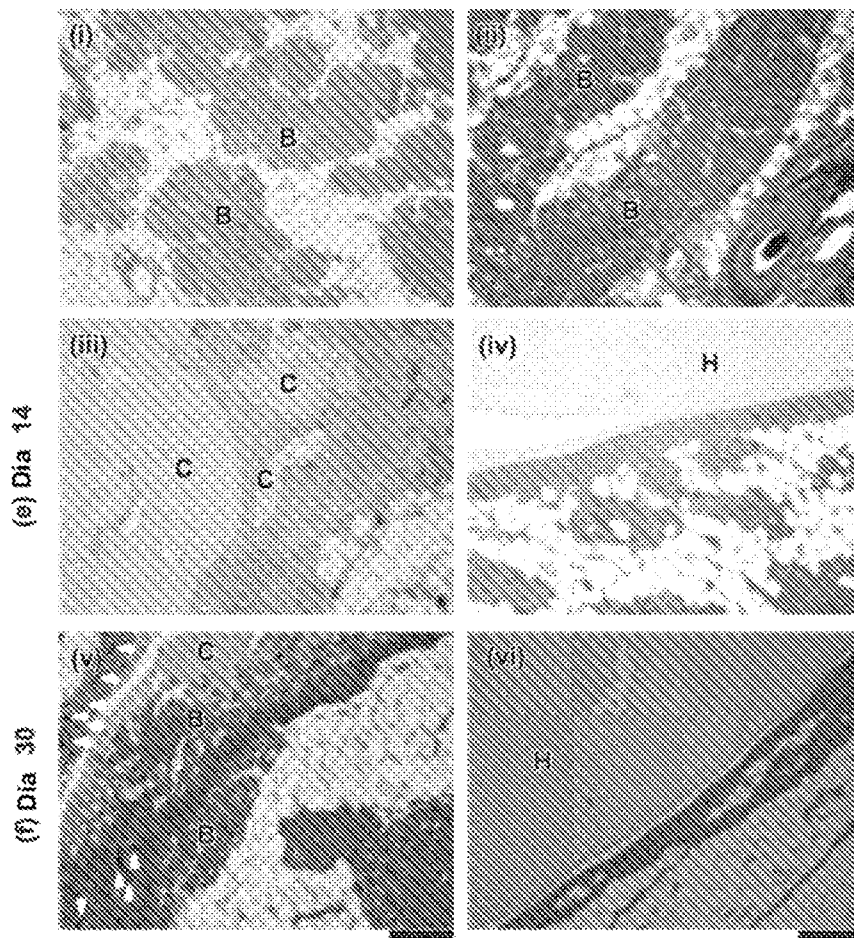


FIG. 12D

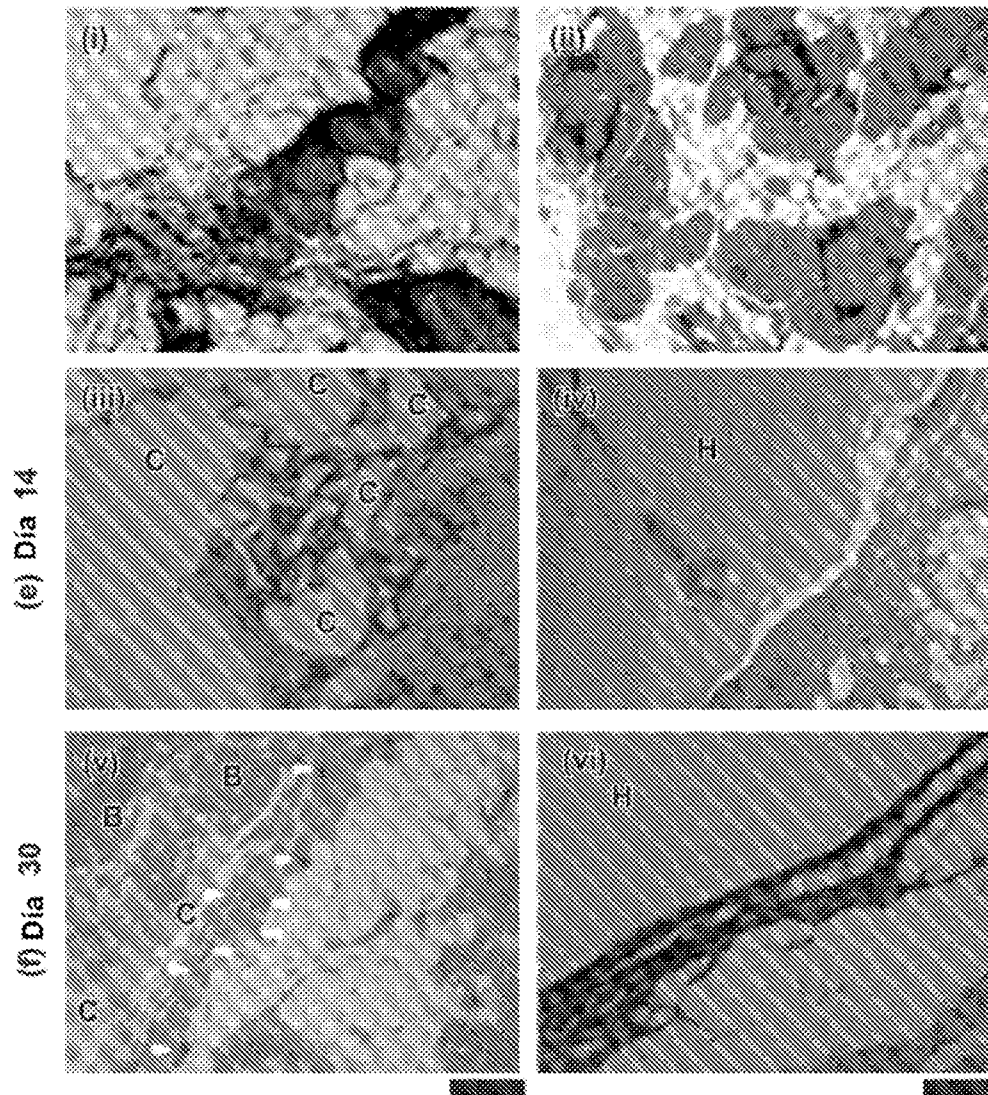


FIG. 13A

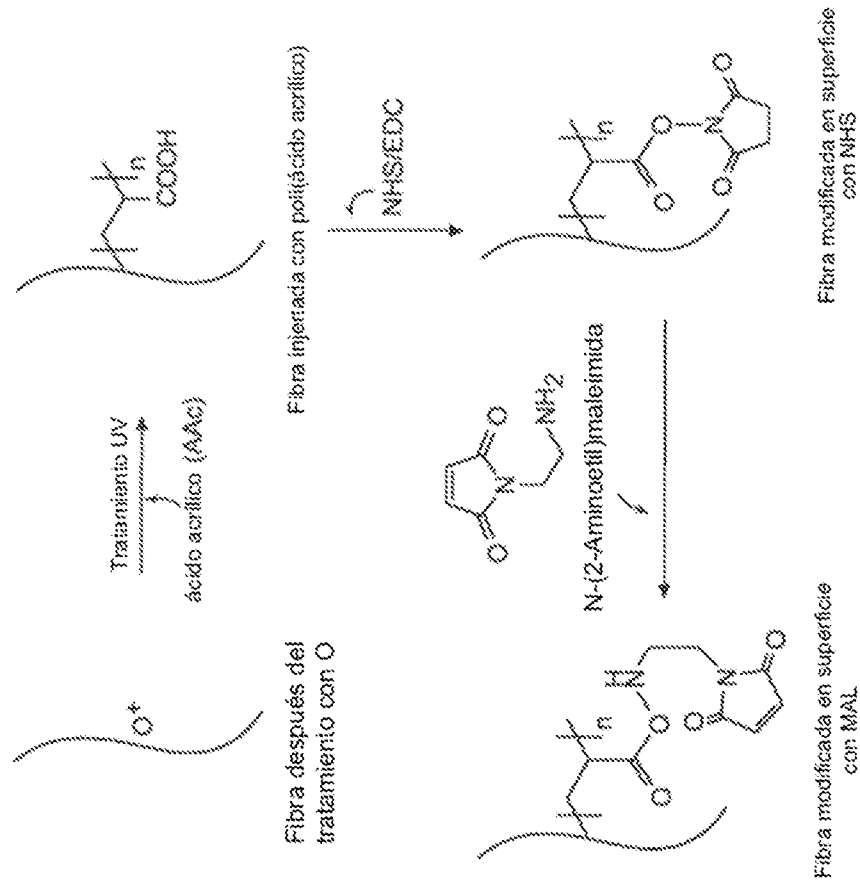
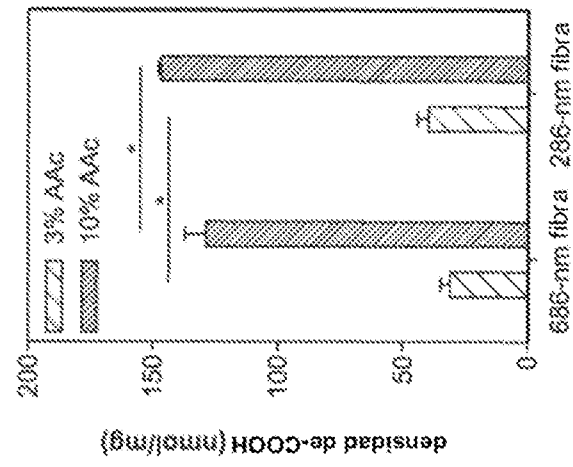


FIG. 13B



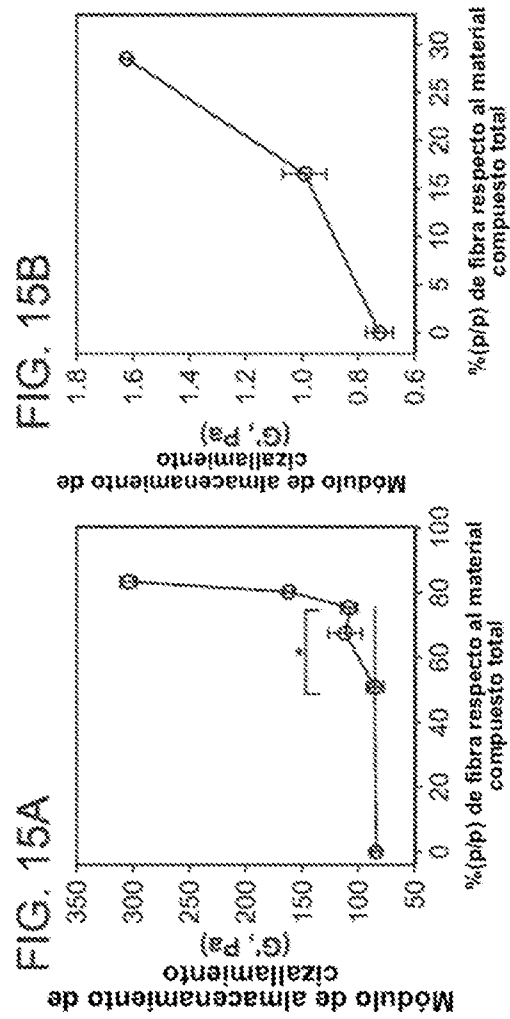
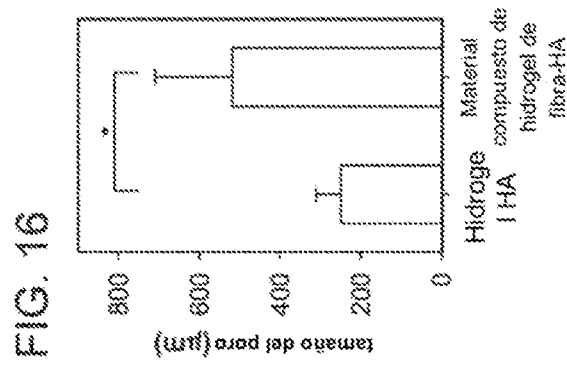
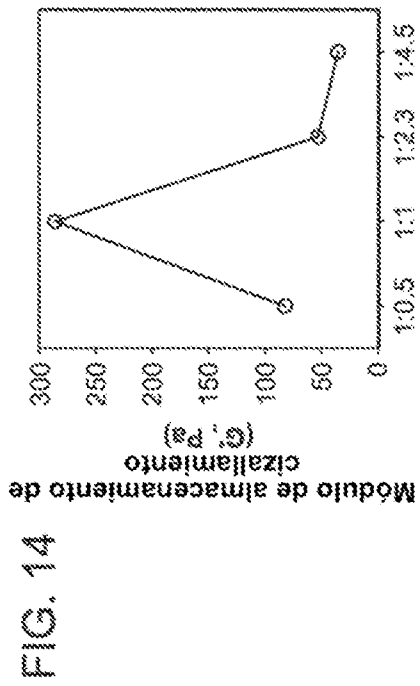


FIG. 17B

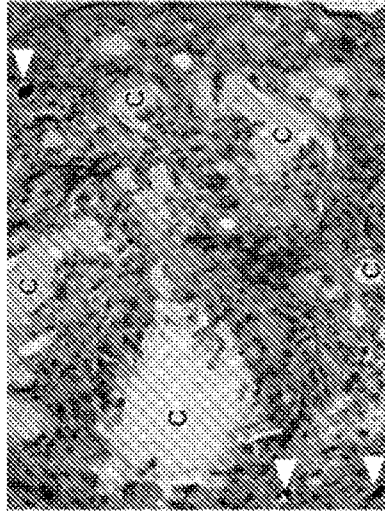


FIG. 17D

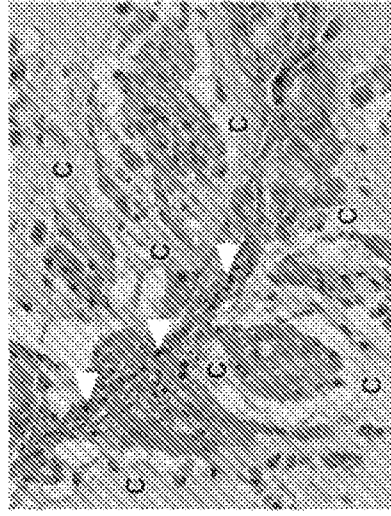


FIG. 17A

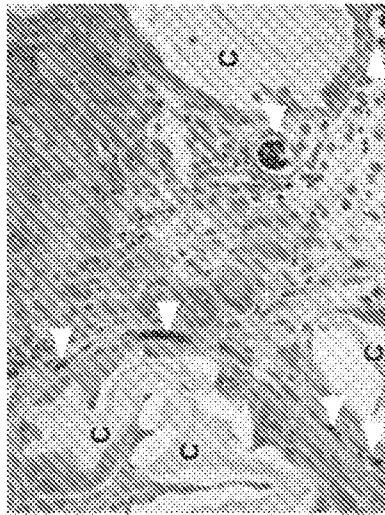
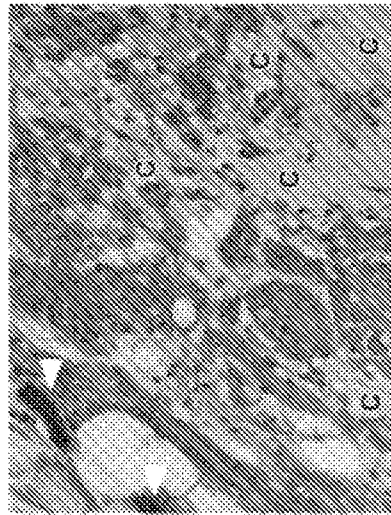


FIG. 17C



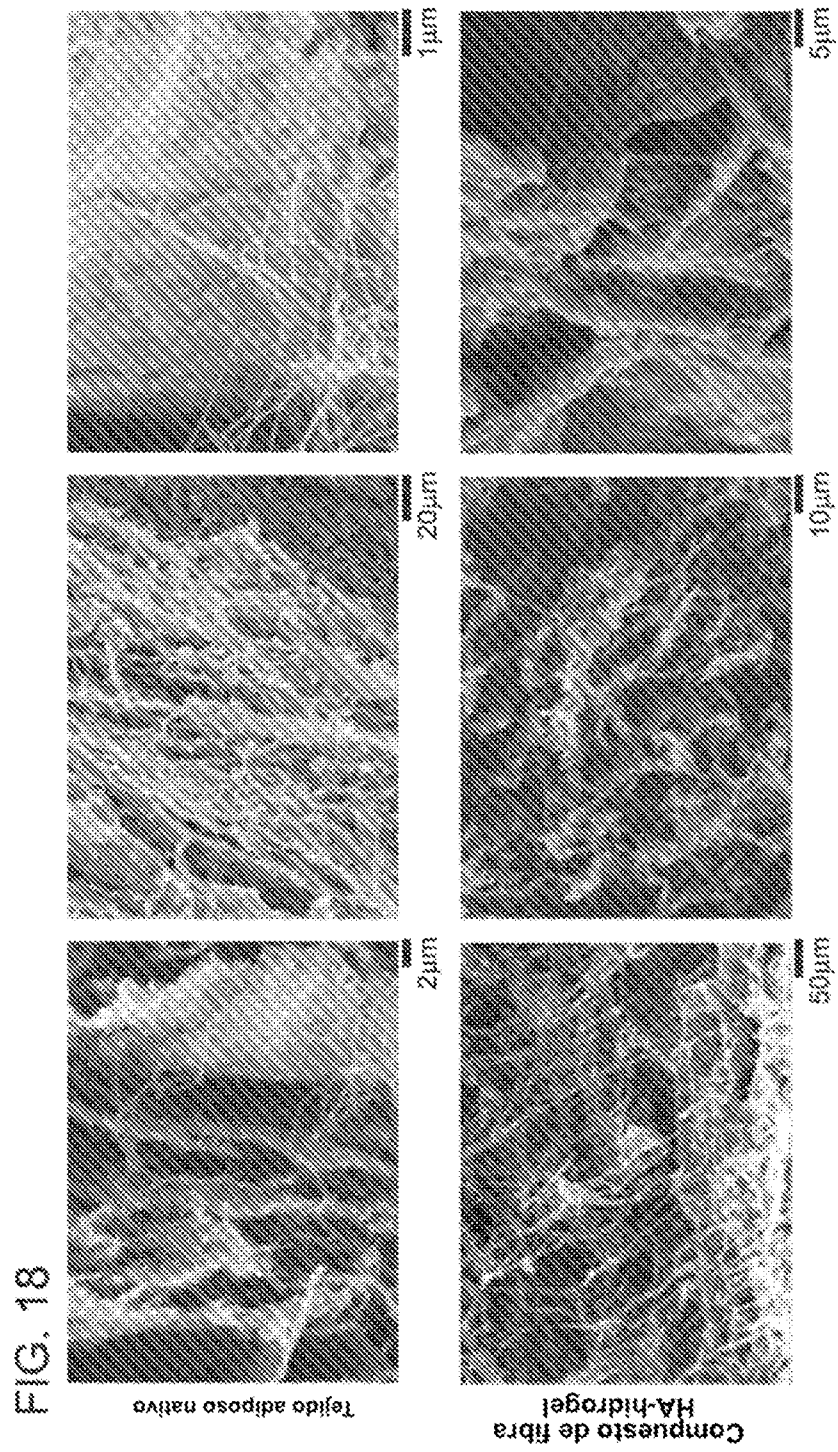


FIG. 19C

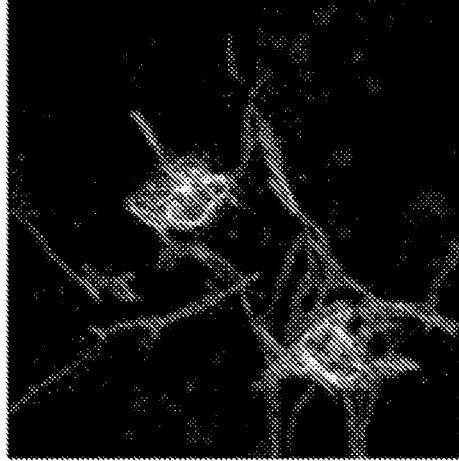


FIG. 19B

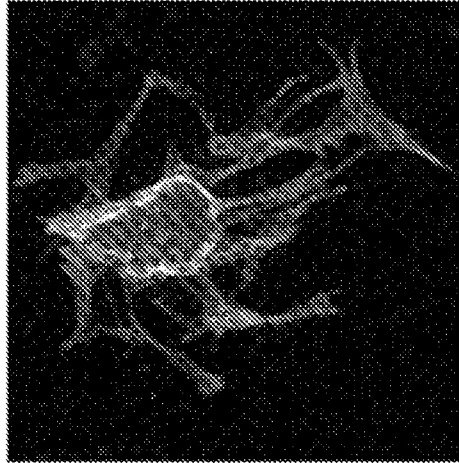


FIG. 19A

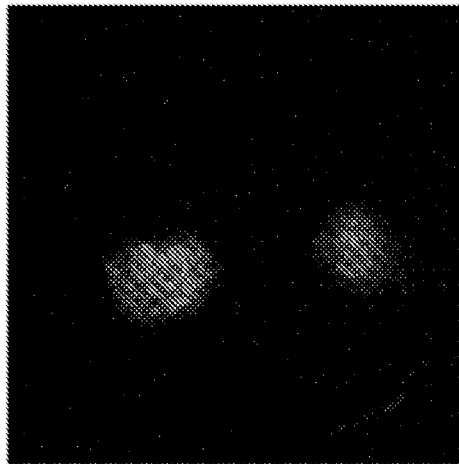


FIG. 20A

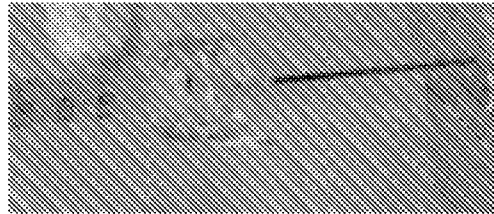


FIG. 20B

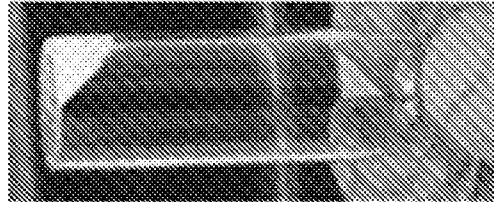


FIG. 20D

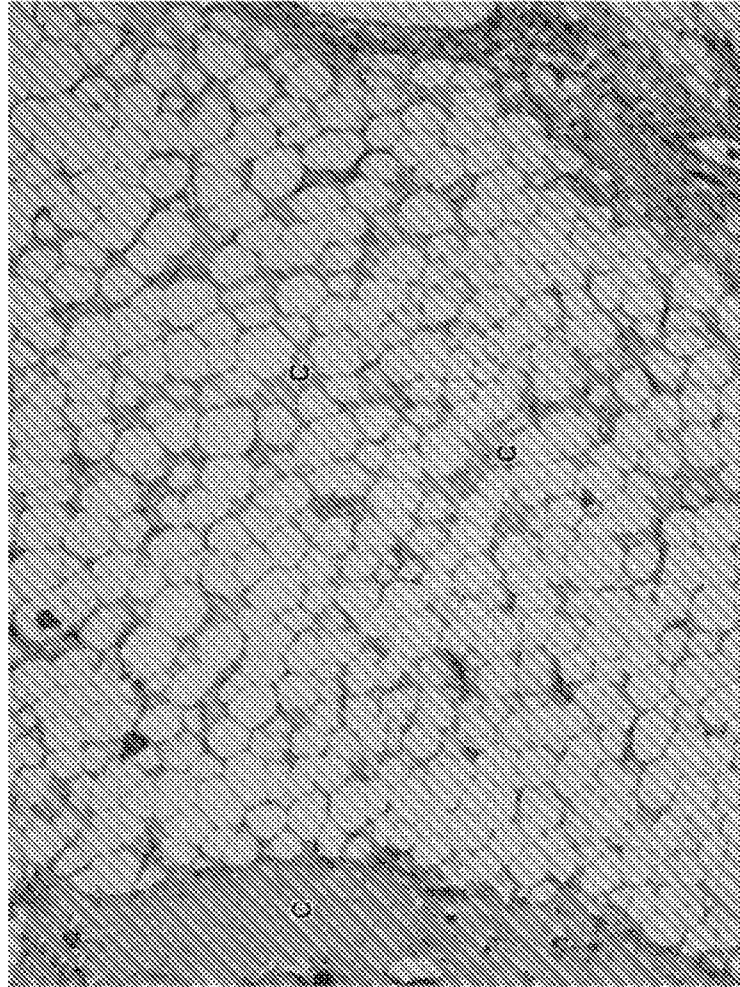


FIG. 20C

