



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 495**

51 Int. Cl.:
B29C 41/00 (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01)
A61L 15/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01995191 .2**
96 Fecha de presentación : **16.11.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1345743**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.09.2003**

54 Título: **Colágeno electroprocesado.**

30 Prioridad: **17.11.2000 US 714255**
22.02.2001 US 270118 P
04.09.2001 US 946158
04.09.2001 WO PCT/US01/27409
18.10.2001 US 982515
18.10.2001 WO PCT/US01/32301

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es: **Virginia Commonwealth University**
Intellectual Property Foundation
1101 East Marshall Street, Room 2015
Richmond, Virginia 23298, US

72 Inventor/es: **Simpson, David, G.;**
Bowlin, Gary, L.;
Wnek, Gary, E.;
Stevens, Peter, J.;
Carr, Marcus, E., Jr.;
Matthews, Jamil, A. y
Rajendran, Saravanamoorthy

74 Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 312 495 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

Colágeno electroprocesado.

5 **Campo de la invención**

La presente invención comprende el colágeno electroprocesado, las composiciones que comprenden el colágeno electroprocesado, el uso del colágeno electroprocesado como una matriz extracelular para numerosas funciones y nuevos métodos de fabricación y usos del colágeno electroprocesado. Además, la invención incluye el combinar colágeno electroprocesado y células para formar el tejido diseñado. El tejido diseñado puede incluir la fabricación sintética de órganos específicos o de tejido del “similar al órgano”.

Antecedentes de la invención

Existe una necesidad continua en las ciencias biomédicas de composiciones biocompatibles que puedan ser utilizadas en dispositivos de fabricación para implantación dentro o sobre el cuerpo de un organismo. En el pasado la mayoría de enfoques se han dedicado al uso de los polímeros sintéticos. Muchos de tales polímeros, sin embargo, sufren desventajas asociadas con sus diferencias químicas y estructurales con los materiales naturales. La encapsulación fibrótica, carencia de infiltración celular, y rechazo son problemas experimentados por tales implantes. Los esfuerzos para superar estos problemas se han enfocado, en parte, al uso de los polímeros sintéticos biodegradables como un apoyo al diseño de construcciones prostéticas para mejorar la biocompatibilidad. Muchos de tales polímeros, sin embargo, sufren la desventaja de producir subproductos importantes de la degradación, que en contacto íntimo con las células individuales, pueden producir una respuesta inflamatoria y disminución del pH en el microentorno celular. Así, deben tomarse medidas para asegurar la remoción apropiada del subproducto desde la construcción del tejido diseñado cuando se usan materiales biodegradables. Otra complicación es que los materiales estructurales bioabsorbibles se degradan en un cierto plazo, dando por resultado el fallo estructural del implante. También siguen siendo problemas la encapsulación fibrótica y la carencia de una infiltración celular.

Para superar las desventajas asociadas a los implantes sintéticos, se ha desviado la atención hacia el uso de implantes de colágeno. Los colágenos son una familia de proteínas que se distribuyen ampliamente a través del cuerpo. Este material de andamiaje es una de las proteínas más prominentes presentes en el tejido animal. El colágeno es el elemento estructural principal de la mayoría de las matrices extracelulares y, como tal, es un elemento estructural crítico en la mayoría de los tejidos. Hay varias formas de colágeno que existen en diversos tipos de tejidos y órganos.

Hasta la fecha, la mayoría de los esfuerzos con el colágeno se han enfocado en el uso de geles de colágeno o de construcciones sólidas de colágeno tales como películas. Un problema de estas construcciones es que éstas o carecen de fortaleza estructural (como con los geles del colágeno), o pierden fortaleza después de la implantación. Los implantes de un colágeno más duro se rompen porque su arquitectura y orientación se diferencian de las de los tejidos naturales. Las células remodelan el colágeno implantado para conformarlo con la arquitectura y orientación de las fibras de las matrices extracelulares normales. Este proceso causa estructuralmente ruido de los implantes que pierden integridad después de su implantación y en última instancia fallos.

Así, existe necesidad en la técnica de materiales de colágenos que se puedan utilizar para conformar implantes biocompatibles que posean integridad estructural y conserven tal integridad después de la implantación. Preferiblemente, tales materiales deben ser capaces de reproducir la mímica química y la estructura de matrices extracelulares, y de promover la infiltración de células.

Sumario de la invención

Las composiciones de la presente invención comprenden colágeno electroprocesado según lo definido en la reivindicación 1. La invención incluye el colágeno electroprocesado por cualquier medio. El colágeno electroprocesado puede constituir o formarse, por ejemplo, a partir de colágeno natural, colágeno diseñado genéticamente, o colágeno modificado por substituciones conservadoras de aminoácidos, substituciones no conservadoras de aminoácidos o substituciones con aminoácidos de ocurrencia no natural. El colágeno usado en electroprocesado puede provenir de una fuente natural, fabricado sintéticamente, o producido a través de cualquier otro medio. Se conocen en la técnica numerosos métodos para producir colágenos y otras proteínas. El colágeno sintético puede ser preparado para que contenga secuencias específicas deseadas de aminoácidos. El colágeno electroprocesado puede también estar formado de colágeno en sí, o de cualquier otro material que forme una estructura de colágeno cuando es electroprocesado. Los ejemplos incluyen aminoácidos, péptidos, péptidos desnaturizados tales como la gelatina de colágeno desnaturizado, polipéptidos, y proteínas. El colágeno se puede formar tanto antes, durante, o después del electroprocesado. Así, colágeno electroprocesado, formado combinando procolágeno con peptidasa de procolágeno sea antes, durante, o después del electroprocesado, está dentro del alcance de la invención.

En algunas realizaciones, la composición de la presente invención incluye materiales adicionales electroprocesados. Otros materiales electroprocesados pueden incluir materiales naturales, materiales sintéticos, o combinaciones de éstos. Algunos ejemplos preferidos de materiales naturales incluyen aminoácidos, péptidos, péptidos desnaturizados tales como gelatina de colágeno desnaturizado, polipéptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, glicoproteínas, lipoproteínas, glicolípidos, glicosaminoglicanos, y proteoglicanos. Algunas matrices sintéticas preferidas:

materiales para electroprocesado con colágeno incluyen: polímeros como poli(ácido láctico) (PLA), ácido poliglicólico (PGA), copolímeros de PLA y PGA, policaprolactona, poli(etileno-co-acetato de vinilo), (EVOH), poli(acetato de vinilo) (PVA), glicol de polietileno (PEG) y poli(óxido de etileno) (PEO).

5 En muchas realizaciones deseables, el colágeno electroprocesado se combina con una o más sustancias. Tales sustancias incluyen cualquier tipo de molécula, célula, u objeto o combinaciones de éstos. Las composiciones del colágeno electroprocesado de la presente invención pueden incluir además una sustancia o cualquier combinación de sustancias. Varias realizaciones especialmente deseables incluyen el uso de células como una sustancia combinada con la matriz del colágeno electroprocesado. Cualquier célula se puede utilizar. Las células que pueden ser utilizadas incluyen las células madres, células madres internadas y células diferenciadas. Las moléculas pueden presentarse en cualquier fase o forma y pueden ser utilizadas combinaciones de moléculas. Ejemplos de clases deseables de moléculas que pueden ser utilizadas incluyen a terapéuticas del ser humano o veterinarias, cosméticos, nutraceuticales, sustancias agrícolas tales como herbicidas, pesticidas y fertilizantes, vitaminas, aminoácidos, péptidos, polipéptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleico, glicoproteínas, lipoproteínas, glicolípidos, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores, feromonas, chalconas, prostaglandinas, inmunoglobulinas, monoquinas y otras citoquinas, humectantes, metales, gases, plastificantes, minerales, iones, y materiales eléctrica y magnéticamente reactivos, materiales sensibles a la luz, antioxidantes, moléculas que se pueden metabolizar como una fuente de energía celular, antígenos, y cualquiera de las moléculas que pueden causar una respuesta celular o fisiológica. Ejemplos de objetos incluyen los fragmentos celulares, detritos celulares, organelas y otros componentes de la célula, componentes extracelulares de la matriz, tabletas, y virus, así como vesículas, liposomas, cápsulas, nanopartículas, y otras estructuras que sirven como un recinto para las moléculas. Los materiales magnéticamente o eléctricamente reactivos son también ejemplos de sustancias que se incluyen opcionalmente dentro de las composiciones de la presente invención. Ejemplos de materiales eléctricamente activos incluyen al negro carbón o grafito, nanotubos de carbono, y varias dispersiones de polímeros conductores eléctricos. Ejemplos de materiales magnéticos activos incluyen ferrofluidos (suspensiones coloidales de partículas magnéticas).

La presente invención también incluye los métodos de fabricación de las composiciones de la presente invención. Los métodos de producir las composiciones incluyen el electroprocesado del colágeno, y opcionalmente el electroprocesado de otros materiales, sustancias o ambos. Una o más técnicas del electroprocesado, tales como electrogiro, electroatomizado, electroaerosol, electrochisporroteo o cualquier combinación de éstos, pueden ser empleadas para producir los materiales del colágeno electroprocesado y las matrices de la presente invención. En el sentido más fundamental, el aparato del electroprocesado para el material del electroprocesado incluye un mecanismo de electrodeposición y un blanco. En las realizaciones preferidas, el mecanismo de electrodeposición incluye uno o más recipientes para mantener una o más soluciones que deben ser electroprocesadas o electrodepositadas. El recipiente o los recipientes tienen por lo menos un orificio, inyector, u otros medios para permitir el flujo de la solución de los recipientes. El electroprocesado ocurre debido a la presencia de una carga en los orificios o el blanco, mientras que se pone a tierra el otro. El sustrato puede también ser utilizado como característica variable en el electroprocesado de los materiales utilizado para producir la composición electroprocesada. Específicamente, el blanco puede ser el sustrato real para los materiales usados para producir la matriz electroprocesada, o la propia matriz electroprocesada se deposita. Alternativamente, un sustrato se puede disponer entre el blanco y los inyectores. El blanco puede también estar específicamente cargado o puesto a tierra a lo largo de un patrón preseleccionado de modo que la solución que fluye desde el orificio se dirige en direcciones específicas. El campo eléctrico se puede controlar por un microprocesador para crear la matriz electroprocesada que tiene una geometría deseada. El blanco y el inyector o los inyectores se pueden diseñar para ser movibles uno con respecto al otro, de tal modo que permitan el control adicional sobre la geometría de la matriz electroprocesada que se formará. La presente invención permite formar matrices que tienen una forma predeterminada.

El presente método incluye la preselección de un molde adaptado para hacer la forma predeterminada y llenar el molde con el material electroprocesado o los materiales electrodepositados en la superficie externa del molde. Además la forma se puede lograr por el proceso manual de las matrices formadas. Por ejemplo, múltiples matrices formadas pueden ser suturadas, selladas, sujetadas con grapas, o ser unidas de otra manera una a otra para formar una forma deseada. La matriz electroprocesada puede ser molida en un polvo o ser molida y preparada como un gel hidratado integrado por fibrillas congregadas. Alternativamente, la flexibilidad física de muchas matrices permite que sean formadas manualmente a una estructura deseada. El colágeno electroprocesado puede ser procesado además, por ejemplo por reticulación o formación, o colocación en un biorreactor para el cultivo de la célula. De esta manera, las células pueden crecer en la matriz electroprocesada.

La invención también incluye las numerosas aplicaciones para las composiciones del colágeno electroprocesado. Las composiciones de la presente invención tienen una serie amplia de usos potenciales. Los usos incluyen lo siguiente: fabricación de tejido diseñado y de órganos, incluyendo estructuras tales como parches, tapones o tejidos del material de la matriz. Éstas y otras construcciones se pueden suplir con células o ser utilizadas sin la suplementación celular. Las aplicaciones adicionales incluyen lo siguiente: protética, y otros implantes; andamiaje del tejido; reparación o apósito de heridas; dispositivos hemostáticos; dispositivos o estructuras para el uso en reparación o soporte del tejido tal como suturas, pegamentos, tornillos quirúrgicos y ortopédicos, y placas quirúrgicas y ortopédicas; capas o componentes naturales para los implantes sintéticos; implantes cosméticos y soportes; reparación o soporte estructural para órganos o tejidos; entrega de la sustancia; plataformas de la bioingeniería; plataformas para probar el efecto de sustancias sobre las células; cultivo celular; y otras numerosas aplicaciones.

ES 2 312 495 T3

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención superar las limitaciones e inconvenientes anteriores proporcionando las composiciones que comprenden el colágeno electroprocesado.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar las composiciones que comprenden el colágeno electroprocesado y otros materiales electroprocesados.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar las composiciones que comprende el colágeno electroprocesado y los materiales no electroprocesados.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar las composiciones que comprenden el colágeno electroprocesado y las células, moléculas, objetos, o combinaciones de éstos.

Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar las composiciones del colágeno electroprocesado en una matriz.

Es además un objeto de la presente invención proporcionar las composiciones que comprenden las matrices del colágeno electroprocesado que se asemejan a matrices extracelulares en estructura y composición.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar los métodos para producir composiciones que comprenden el colágeno electroprocesado.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar las construcciones que incluyen matrices del colágeno electroprocesado.

Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar el tejido biodiseñado que comprende las construcciones de la presente invención.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar los órganos biodiseñados que comprenden las construcciones de la presente invención.

Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar los métodos de producir las construcciones de la presente invención.

Es además un objeto de la presente invención proporcionar los métodos de producir las construcciones de la presente invención.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar métodos de entrega de sustancias.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar métodos de ensayo y de estudio de células y de tejidos *in vitro*.

Es además un objeto de la presente invención proporcionar métodos para el cultivo de células y tejidos.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar plataformas de bioingeniería que comprenden las composiciones de la presente invención.

Éstos y otros objetos, características y ventajas de la presente invención se harán más evidentes después de una revisión de la siguiente descripción detallada de las realizaciones expuestas y los dibujos añadidos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Micrografía de SEM de 80:20 tipo I/elastina (barra del tamaño = 1 μ m, magnificación 4.000X).

Figura 2. Micrografía de SEM del electrocentrifugado de matrices del tipo I/III/elastina 45:35:20 (barra del tamaño = 1 μ m, magnificación 4.300X).

Figura 3. Es un dibujo esquemático de una realización de un dispositivo del electroprocesado incluyendo el equipo del electroprocesado y un biorreactor de pared rotatoria.

Figura 4. Es un dibujo esquemático de una realización de un dispositivo del electroprocesado incluyendo el equipo del electroprocesado y un biorreactor de pared rotatoria.

Figura 5. Es un dibujo esquemático de otra realización de un dispositivo del electroprocesado incluyendo el equipo del electroprocesado y un biorreactor de pared rotatoria.

Figura 6. Ejemplo de una matriz de electrocentrifugado antes de la siembra de la célula (izquierda) y un segmento arterial desarrollado del andamiaje (derecha).

Figura 7. Perfil representativo de la descarga del VEGF desde el colágeno de electrocentrifugado. VEGF fue coelectrocentrifugado a concentraciones del colágeno de 0,25, 50 o 100 ng/ml. El material fue después sumergido en PBS y las muestras aisladas y sometidas a ELISA.

Figura 8. Descarga del VEGF desde el electrocentrifugado y el glutaraldehído, colágeno fijado por vapor. VEGF fue coelectrocentrifugado a una concentración del colágeno de 0,25, 50 o 100 ng/ml. El material del electrocentrifugado fue sometido a un intervalo de 15 minutos de fijación de vapor de glutaraldehído. El material después fue sumergido en PBS y las muestras fueron aisladas y sometidas a ELISA.

Figura 9. Microscopia electrónica de transmisión del electrocentrifugado del colágeno Tipo I que muestra bandas de 67 nm (la barra blanca de la escala indica 100 nm).

Figura 10. SEM de una mezcla 50: 50 del colágeno electrocentrifugado del tipo I y III (placenta humana). Esta matriz fue electrocentrifugada desde una sola fuente del recipiente compuesta de una mezcla de los colágenos tipo I y tipo III suspendida en HFIP (concentración final de la proteína igualada a 0.06 g/ml). Esta cadena heterogénea está compuesta de fibras donde el diámetro promedio de fibras es 390-290 nm (Magnificación 4.300X).

Figura 11. Micrografía de SEM mostrando la unión de la célula del músculo liso prominente y la migración después de una semana en cultivo con la matriz del colágeno 80:20 tipo I/elastina. Vista luminal de protética (tamaño de la escala = 10 um, magnificación 4.300X).

Figura 12. Micrografía de barrido electrónica de una matriz fija del colágeno tipo II antes de la siembra (tamaño de la escala = 10 um, magnificación 1.600X).

Figura 13. Sección transversal de la matriz del colágeno tipo II después de 1 semana en cultivo con los condrocitos sembrados. Hay un cubrimiento casi completo en el lado sembrado (derecho) y algo de remodelación dentro de la matriz (inmediata izquierda) (tamaño de la escala = 10 um, magnificación 700X).

Figura 14. Paso previo al recubrimiento del colágeno (tamaño de la escala = 100 um, magnificación 43X).

Figura 15. Paso posterior después de cubrir (antes de la siembra de la célula) con las nanofibras del colágeno (tamaño de la escala = 100 um, magnificación 55X).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Definiciones

Los términos “electroprocesado” y “electrodeposición” serán definidos ampliamente para incluir todos los métodos de electrogiro, electroatomizado, electroaerosol, y electrochisporroteo de materiales, combinaciones de dos o más de tales métodos, y cualquier otro método en donde los materiales fluyen, son rociados, pulverizados o goteados a través de un campo eléctrico y hacia un blanco. El material electroprocesado puede ser electroprocesado desde uno o más recipientes puestos a tierra en la dirección de un sustrato cargado o de recipientes cargados hacia un sustrato blanco puesto a tierra. “Electrogiro” significa un proceso en el cual las fibras se forman de una solución o fusión por el flujo de una solución cargada eléctricamente o fusión a través de un orificio. “Electroaerosol” significa un proceso en el cual las gotitas se forman de una solución o se funden fluyendo una solución del polímero cargado eléctricamente o fusión a través de un orificio. El término electroprocesado no se limita a los ejemplos específicos dispuestos aquí, e incluye cualquiera de los medios de usar un campo eléctrico para depositar un material sobre un blanco.

El término “material” se refiere al compuesto, molécula, sustancia, o grupo o combinación de éstos que forma cualquier tipo de estructura o grupo de estructuras durante o después del electroprocesado. Los materiales incluyen materiales naturales, materiales sintéticos, o combinaciones de éstos. Los materiales orgánicos que ocurren naturalmente incluyen cualquiera de las sustancias encontradas naturalmente en el cuerpo de las plantas o de otros organismos, sin importar si esos materiales tienen o pueden ser producidos o ser alterados sintéticamente. Los materiales sintéticos incluyen cualquiera de los materiales preparados a través de cualquier método de síntesis artificial, proceso, o fabricación. Los materiales son preferiblemente materiales biológicamente compatibles.

Los materiales para que el electroprocesado produzca las composiciones de la presente invención pueden comprender el colágeno de cualquier tipo.

En cada caso, esos nombres se utilizan en todas las técnicas de la presente solicitud en su definición más amplia y comprenden las varias isoformas que se reconocen comúnmente para existir dentro de las diversas familias de proteínas y otras moléculas. Hay múltiples tipos de cada una de estas proteínas y moléculas que están ocurriendo naturalmente, así como los tipos que pueden ser o son fabricados sintéticamente o producidos por la ingeniería genética. Por ejemplo, el colágeno ocurre en muchas formas y tipos y todos estos tipos y subconjuntos se comprenden aquí.

El término proteína, y cualquier término usado para definir una proteína o una clase específica de proteína incluye además, pero no se limita a fragmentos, análogos, substituciones conservadoras del aminoácido, substituciones no conservadoras de aminoácidos y substituciones con aminoácidos no ocurriendo naturalmente con respecto a una

ES 2 312 495 T3

proteína o a un tipo o a una clase de proteína. Así, por ejemplo, el término colágeno incluye, pero no se limita a fragmentos, análogos, substituciones conservadoras de aminoácidos, y substituciones de aminoácidos que ocurren no naturalmente o residuos con respecto a cualquier tipo o clase del colágeno. Se utiliza aquí el término “residuo” para referirse a un aminoácido (D o L) o un aminoácido mimético que se incorpora en una proteína por un enlace de la amida. Como tal, el residuo puede ser un aminoácido que ocurre naturalmente o, a menos que esté limitado de otra manera, puede comprender análogos conocidos de aminoácidos naturales que funcionan en una manera similar a los aminoácidos que ocurren naturalmente (es decir, miméticos de aminoácidos). Por otra técnica, un enlace mimético de la amida incluye modificaciones de la cadena del péptido bien conocido por los expertos en la materia.

Además, un experto en la técnica reconocerá que, según lo mencionado anteriormente, substituciones individuales, anulaciones o adiciones que alteran, agregan o suprimen un solo aminoácido o un porcentaje pequeño de aminoácidos (preferiblemente menos del 10%, más preferiblemente menos del 5%) en una secuencia codificada son variaciones conservadoramente modificadas donde las alteraciones dan lugar a la substitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Tablas de la substitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Los seis grupos siguientes cada uno contiene los aminoácidos que son substituciones conservadoras para uno a otro:

- 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W).

Se comprenderá que el término proteína, polipéptido o péptido además incluye fragmentos que pueden ser 90 a 95% de la secuencia entera de aminoácidos, y también extensiones a la secuencia entera de aminoácidos que son el 5% a 10% más largas que la secuencia de aminoácidos de la proteína, del polipéptido o del péptido.

Cuando los péptidos son relativamente cortos en longitud (es decir, menos que cerca de 50 aminoácidos), se sintetizan a menudo usando técnicas químicas estándares de la síntesis del péptido. La síntesis de la fase sólida en la cual el terminal C del aminoácido de la secuencia se une a un soporte insoluble seguido por la adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia es un método preferido para la síntesis química de los epítopes antígenicos descritos aquí. Las técnicas para la síntesis de la fase sólida son conocidas por los expertos en la materia.

Alternativamente, las proteínas o los péptidos que pueden ser electroprocesados son sintetizados usando la metodología de ácido nucleico recombinante. Generalmente, esto implica el crear una secuencia del ácido nucleico que codifica el péptido o proteína, colocando el ácido nucleico en un casete de la expresión bajo control de un promotor particular, expresando el péptido o la proteína en un anfitrión, aislando el péptido o proteína expresado y, si se requiere, renaturalizar el péptido o la proteína. En la literatura se encuentran suficientes técnicas para guiar a los expertos en tales procedimientos.

Cuando varios fragmentos o péptidos deseados de la proteína se codifican en la secuencia del nucleótido incorporada en un vector, un experto en la técnica apreciará que los fragmentos o los péptidos de la proteína pueden ser separados por una molécula espaciadora tal como, por ejemplo, un péptido, que consiste en uno o más aminoácidos. Generalmente, el espaciador no tendrá ninguna actividad biológica específica con excepción de unir los fragmentos o los péptidos deseados de la proteína juntos, o para preservar una cierta distancia mínima u otra relación espacial entre ellos. Sin embargo, los aminoácidos componentes del espaciador se pueden seleccionar para influenciar alguna propiedad de la molécula tal como la carga neta del plegamiento, o hidrofobicidad. La codificación de las secuencias del nucleótido para la producción de los residuos que pueden ser útiles en la purificación de la proteína recombinante expresada puede construirse en el vector. Tales secuencias se conocen en la técnica. Por ejemplo, una codificación de la secuencia del nucleótido para una secuencia de polihistidina se puede agregar a un vector para facilitar la purificación de la proteína recombinante expresada en una columna de níquel.

Una vez que estén expresados, los péptidos recombinantes, los polipéptidos y las proteínas se pueden purificar según los procedimientos estándares conocidos por un experto en la técnica, incluyendo la precipitación del sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía de columna, electroforesis del gel y similares. Se prefieren las composiciones substancialmente puras de cerca de 50 a 99% de homogeneidad, y las de 80 a 95% o mayor de homogeneidad se prefieren más para el uso como agentes terapéuticos.

También, moléculas capaces de formar algunas de las proteínas nombradas se pueden mezclar durante el electroprocesado con otros polímeros para obtener las características deseadas para las aplicaciones de la proteína formada en la matriz.

Otra clase de materiales sintéticos, preferiblemente los materiales sintéticos compatibles biológicamente, comprenden los polímeros. Tales polímeros incluyen los siguientes: poli(uretanos), poli(siloxanos) o siliconas, poli(etileno), poli(pirrolidona de vinilo), poli(2-hidroxi-etil-metacrilato), poli(N-pirrolidona de vinilo), poli(metacrilato de metilo), alcohópolivinílico, poli(ácido acrílico), poliacrilamida, poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(etilen glicol), poli(ácido metacrílico), poliláctidos (PLA), poliglicólidos (PGA), poli(láctido-co-glicólidos (PLGA), polianhidridos, y polioortoésteres o cualquier otro polímero sintético similar que puede ser desarrollado que sea biológicamente compatible. El término “polímeros sintéticos biológicamente compatibles” también incluirá los copolímeros y las mezclas, y cualquiera de otras combinaciones de las anteriores o juntas o generalmente con otros polímeros. El uso de estos polímeros dependerá de las aplicaciones dadas y de las especificaciones requeridas. Una discusión más detallada de estos polímeros y los tipos de polímeros se dispone en Brannon-Peppas, Lisa, “Polymers in Controlled Drug Delivery”, Medical Plastics and Biomaterials, Noviembre de 1997.

“Materiales” también incluyen los materiales electroprocesados que son capaces de cambiar en diversos materiales durante o después del electroprocesado. Por ejemplo, el procolágeno formará el colágeno cuando está combinado con el peptidasa del procolágeno. El procolágeno, el peptidasa del procolágeno, y el colágeno están todos dentro de la definición de materiales. Semejantemente, el fibrinógeno de proteínas, cuando está combinado con trombina, forma fibrina. El fibrinógeno o trombina que son electroprocesados así como la fibrina que se forma después están incluidos dentro de la definición de materiales.

En una realización preferida, los materiales electroprocesados forman una matriz. El término “matriz” se refiere a cualquier estructura compuesta de materiales electroprocesados. Las matrices comprenden fibras, o gotitas de materiales, o mezclas de fibras y gotitas de cualquier tamaño o forma. Las matrices son solos estructuras simples o grupos de estructuras y se pueden formar con uno o más métodos del electroprocesado usando uno o más materiales. Las matrices se diseñan para poseer porosidades específicas. Las sustancias pueden ser depositadas dentro, o ser ancladas a o ser colocadas en matrices. Las células son las sustancias que pueden ser depositadas dentro o en las matrices.

El término “sustancia” será utilizado a través de esta solicitud en su definición más amplia. El término sustancia incluye una o más moléculas, objetos, o células de cualquier tipo o tamaño, o combinaciones de éstos. Las sustancias pueden estar en cualquier forma incluyendo, sólido semisólido, mezcla húmeda o seca, gas, solución, suspensión, combinaciones de éstos. Las sustancias incluyen moléculas de cualquier tamaño y en cualquier combinación. Las células incluyen todos los tipos de células procariótica y eucariótica, ya sea en estado natural, o alterado por ingeniería genética o cualquier otro proceso. Las células pueden ser de una fuente natural o cultivada *in vitro* y puede estar viva o muerta. Se pueden utilizar combinaciones de diversos tipos de células. Los objetos pueden ser de cualquier tamaño, forma, y composición que pueden ser combinados o acoplados a un material electroprocesado. Los ejemplos de objetos incluyen, fragmentos de la célula, detritos de la célula, fragmentos de las paredes de la célula, componentes extracelulares de la matriz, fragmentos de las paredes virales, organelas y otros componentes de la célula, tabletas, virus, vesículas, liposomas, cápsulas, nanopartículas, y otras estructuras que sirven como recinto para las moléculas. Las composiciones de la presente invención pueden comprender una sustancia o cualquier combinación de sustancias.

A través de esta solicitud el término “solución” se utiliza para describir el líquido en los recipientes del método del electroprocesado. El término se define ampliamente para incluir cualquiera de los líquidos que contenga los materiales para ser electroprocesados. Se comprenderá que cualquier solución capaz de formar un material durante el electroprocesado está incluida dentro del alcance de la presente invención. En esta solicitud, el término “solución” también se refiere a suspensiones o emulsiones que contienen el material o cualquier cosa a ser electrodepositada. Las “soluciones” pueden estar en forma orgánica o biológicamente compatible. Esta amplia definición es apropiada en vista del gran número de solventes u otros líquidos y moléculas portadoras, tal como el poli (óxido de etileno) (PEO), que se puede utilizar en muchas variaciones del electroprocesado. En esta solicitud, el término “solución” también se refiere a derretidos, geles hidratados y suspensiones que contienen los materiales, las sustancias o cualquier cosa a ser electrodepositada.

Solventes

Cualquier solvente puede ser utilizado que permita la entrega del material o la sustancia al orificio, punta de una jeringuilla, u otro sitio desde el cual el material será electroprocesado. El solvente se puede utilizar para disolver o suspender el material o la sustancia a ser electroprocesada. Solventes útiles para disolver o suspender un material o una sustancia dependen del material o de la sustancia. Las técnicas de electrogiro requieren a menudo más condiciones específicas del solvente. Por ejemplo, el colágeno puede ser electrodepositado como una solución o suspensión en agua, 2,2,2-trifluoroetanol, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (también conocido como hexafluoroisopropanol o HFIP), o combinaciones de éstos. El monómero de fibrina puede ser electrodepositado o electrocentrifugado a partir de solventes tales como urea, ácido monocloroacético, agua, 2,2,2-trifluoroetanol, HFIP, o combinaciones de éstos. La elastina puede ser electrodepositada como una solución o una suspensión en agua, 2,2,2-trifluoroetanol, isopropanol, HFIP, o combinaciones de éstos, tales como isopropanol y agua. En una realización deseable, la elastina es electrocentrifugada desde una solución de 70% de isopropanol y 30%.

Se pueden utilizar otros alcoholes de menor orden, especialmente los alcoholes halogenados. Otros solventes que pueden ser utilizados o combinados con otros solventes en los materiales de la matriz natural del electroprocesado incluyen la acetamida, *N*-metil-formamida, *N,N*-dimetil-formamida (DMF), dimetil-sulfóxido (DMSO), dimetil-

acetamida, N-metil-pirrolidona (NMP), ácido acético, ácido trifluoro-acético, acetato de etilo, acetonitrilo, anhídrido trifluoro-acético, 1,1,1-trifluoro-acetona, ácido maleico, hexafluoro-acetona.

Las proteínas y los péptidos asociados a las membranas son a menudo hidrófobos y por tanto no se disuelven fácilmente en soluciones acuosas. Tales proteínas pueden ser disueltas en solventes orgánicos tales como metanol, cloroformo, y trifluoroetanol (TFE) y agentes emulsionantes. Cualquiera de otros solventes conocidos por un experto en la técnica química de la proteína se puede utilizar, por ejemplo los solventes útiles en cromatografía, especialmente cromatografía líquida de alto rendimiento. Las proteínas y los péptidos son también solubles, por ejemplo, en HFIP, hexafluoro-acetona, cloro-alcoholes en conjunto con las soluciones acuosas de ácidos minerales, dimetil-acetamida conteniendo cloruro de litio al 5%, y en ácidos muy diluidos tales como ácido acético, ácido clorhídrico y ácido fórmico. El N-metil morfolina-N-óxido es otro solvente que se puede utilizar con muchos polipéptidos. Otros ejemplos, utilizados solos o en combinación con ácidos orgánicos o sales, incluyen los siguientes: trietanolamina; diclorometano; cloruro de metileno; 1,4-dioxano; acetonitrilo; glicol de etileno; glicol del dietileno; acetato de etilo; glicerina; 1,3-propanodiol, propano; furano; tetrahidrofurano; indol; piperazina, pirrol; pirrolidona; 2-pirrolidona; piridina; quinolina; tetrahidro-quinolina; pirazol; e imidazol. Se pueden también utilizar combinaciones de solventes.

Los polímeros sintéticos pueden ser electrodepositados desde, por ejemplo, HFIP, cloruro de metileno, acetato de etilo; acetona, 2-butanona (metil-etil-cetona), dietil-éter; etanol; ciclohexano; agua; diclorometano (cloruro de metileno); tetrahidrofurano; dimetil-sulfóxido (DMSO); acetonitrilo; formato de metilo y varias mezclas de solventes. HFIP y el cloruro de metileno son solventes deseables. La selección de un solvente dependerá de las características del polímero sintético a ser electrodepositado.

La selección de un solvente se basa en parte en la consideración de las fuerzas secundarias que estabilizan las interacciones polímero-polímero y la capacidad del solvente de sustituir éstos con interacciones fuertes polímero-solvente. En el caso de polipéptidos tales como colágeno, y en ausencia de reticulación covalente, las fuerzas secundarias principales entre las cadenas son: (1) coulombicas, resultando de la atracción de las cargas fijas en la cadena y dictadas por la estructura primaria (por ejemplo los residuos de lisina y de arginina serán cargados positivamente al pH fisiológico, mientras que los residuos del ácido aspártico o glutámico serán cargados negativamente); (2) dipolo-dipolo, resultando de interacciones de los dipolos permanentes; el enlace de hidrógeno, encontrado comúnmente en los polipéptidos, es la más fuerte de tales interacciones; y (3) interacciones hidrófobas, resultando de la asociación de regiones no polares del polipéptido debido a una tendencia baja de las especies no polares a interactuar favorablemente con las moléculas polares del agua. Por lo tanto, los solventes o combinaciones de solventes que pueden competir favorablemente por estas interacciones pueden disolver o dispersar los polipéptidos. Por ejemplo, HFIP y TFE poseen un enlace OH altamente polar adyacente a una región fluorada muy hidrófoba. Aunque no queriendo ser limitada por las teorías siguientes, se cree que la porción del alcohol puede enlazar el hidrógeno con los péptidos, y puede también disolver cargas en la cadena, reduciendo así las interacciones Coulombicas entre las moléculas. Además, las porciones hidrófobas de estos solventes pueden interactuar con los dominios hidrófobos en los polipéptidos, ayudando a resistir la tendencia de los últimos al agregado por la vía de las interacciones hidrófobas. Se cree además que solventes tales como HFIP y TFE, debido a sus polaridades totales más bajas comparado al agua, no compiten bien por los enlaces de hidrógeno intramolecular que estabilizan las estructuras secundarias tales como una hélice alfa. Por lo tanto, las hélices alfa en estos solventes se cree que son estabilizadas en virtud de los enlaces intramoleculares más fuertes del hidrógeno. La estabilización de las estructuras secundarias del polipéptido en estos solventes se cree que es deseable, especialmente en los casos del colágeno y la elastina, para preservar la formación apropiada de las fibrillas del colágeno durante el electroprocesado.

Además, a menudo es deseable, aunque no necesario, para el solvente tener una presión de vapor relativamente alta a fin de promover la estabilización de una fuente de electrogiro para crear una fibra cuando el solvente se evapora. Un solvente relativamente volátil es también deseable para el electrorrociado a fin de reducir al mínimo la fusión de las gotitas durante y después del rociado y la formación de materiales secos electroprocesados. En las realizaciones que implican solventes de punto de ebullición más altos, a menudo es deseable facilitar la evaporación del solvente calentando la solución que gira o de rociado, y opcionalmente la corriente del electroprocesado por sí misma, o el electroprocesado en la presión atmosférica reducida. Se cree también que la creación de una fuente estable dando por resultado una fibra se facilita por una tensión superficial baja de la mezcla polímero/solvente. La opción del solvente puede también ser guiada por esta consideración.

En términos funcionales, los solventes usados para el electroprocesado tienen el rol principal de crear una mezcla con el colágeno y/u otros materiales a ser electroprocesados, tales que el electroprocesado es factible. La concentración de un solvente dado es a menudo una consideración importante en la determinación del tipo de electroprocesado que ocurrirá. Por ejemplo, en el electrorrociado, el solvente debe asistir en la dispersión de las gotitas del material electroprocesado de modo que el chorro inicial del líquido se desintegre en gotitas. Por consiguiente, los solventes usados en el electrorrociado no deben crear las fuerzas que se estabilizarán en una columna líquida no limitada. En el electrogiro, las interacciones entre las moléculas del material electroprocesado estabilizan el chorro, conduciendo a la formación de la fibra. Para las realizaciones del electrocentrifugado, el solvente debe disolver suficientemente o dispersar el polímero para evitar que el chorro se desintegre en gotitas y debe así permitir la formación de un chorro estable en la forma de una fibra. En algunas realizaciones, la transición del electrorrociado al electrogiro puede ser determinada examinando las mediciones de viscosidad (usando un viscosímetro Brookfield) para las soluciones del polímero en función de la concentración. La viscosidad se incrementa cuando aumenta la concentración del polímero u otro material a ser electroprocesado. Sobre una concentración crítica asociada a las complicaciones de la extensa

cadena de materiales, sin embargo, la viscosidad aumentará más rápidamente con la concentración, en comparación con una subida con la concentración más gradual, lineal a concentraciones más bajas. Las desviaciones de la linealidad coinciden aproximadamente con la transición desde el electrorrociado al electrogiro.

- 5 La solubilidad de cualquier material electroprocesado en un solvente puede ser realzada modificando el material. Puede utilizarse cualquier método para modificar los materiales a fin de aumentar su solubilidad. Por ejemplo, la patente No. 4.164.559 de Estados Unidos en Miyatay y otros describe un método para la modificación química del colágeno a fin de aumentar la solubilidad.

10 *Composiciones de la presente invención*

Colágeno electroprocesado

Las composiciones de la presente invención comprenden el colágeno electroprocesado según lo definido en la reivindicación 1. El colágeno electroprocesado puede constituir o ser formado desde cualquier colágeno dentro del significado completo del término según lo dispuesto anteriormente en la definición de "proteína". Como tal, éste puede incluir los fragmentos del colágeno, análogos, substituciones conservadoras de aminoácidos, substituciones no conservadoras de aminoácidos, y substituciones con aminoácidos que ocurren no naturalmente o residuos con respecto a cualquier tipo o clase de colágeno. El colágeno usado en el electroprocesado puede ser derivado de una fuente natural, fabricado sintéticamente, producido a través de la ingeniería genética, o producido a través de cualquier otro medio o combinaciones de éstos. Las fuentes naturales incluyen, los colágenos producidos mediante, o contenidos dentro del, el tejido de organismos vivos. Por ejemplo, el colágeno electroprocesado a ser implantado en una matriz puede incluir el colágeno autólogo, colágeno de un organismo coespecífico, o colágeno de otras especies. Algunos colágenos que pueden ser utilizados incluyen los tipos de colágeno I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, y XIX. Algunos colágenos preferidos incluyen los tipos I y III. El colágeno sintético puede incluir el producido por cualquier medio artificial. Se conocen en la técnica numerosos métodos para producir colágenos y otras proteínas. El colágeno sintético puede ser preparado usando secuencias específicas. Por ejemplo, el colágeno genéticamente diseñado se puede preparar con las secuencias específicas deseadas de los aminoácidos que se diferencian del colágeno natural. El colágeno diseñado se puede producir por cualquier medio, incluyendo, por ejemplo, péptido, polipéptido, o síntesis de la proteína. Por ejemplo, las células pueden ser diseñadas genéticamente *in vivo* o *in vitro* para producir el colágeno o las moléculas capaces de formar el colágeno, o subdominios del colágeno, y se puede cosechar el colágeno deseado. En una realización ilustrativa, las secuencias deseables que forman los sitios de unión en la proteína del colágeno para las células o los péptidos pueden ser incluidas en cantidades mayores que las encontradas en el colágeno natural. El colágeno electroprocesado puede también ser formado del propio colágeno o cualquier otro material que forma una estructura del colágeno cuando el electroprocesado. Ejemplos incluyen a los aminoácidos, péptidos, colágeno desnaturalizado como la gelatina, polipéptidos, y proteínas. El colágeno puede ser formado antes, durante, o después del electroprocesado. Por ejemplo, el colágeno electroprocesado formado combinando el procolágeno con el peptidasa del procolágeno antes, durante, o después del electroprocesado está dentro de la invención.

El colágeno electroprocesado se hace usando electrogiro. Por consiguiente, el colágeno es electrocentrifugado para formar las fibras del colágeno. El colágeno del electrocentrifugado tiene una repetición, patrón congregado cuando es examinado por microscopia electrónica. Este patrón congregado es típico de las fibrillas del colágeno producidas por las células en una matriz extracelular. En algunas realizaciones que implican los tipos de colágeno I, II, y/o III, el patrón tiene espaciamiento de 65-67 nm, la característica natural del patrón estos tipos de colágeno. En algunas realizaciones, el patrón de banda de los tipos de colágeno I, II, y/o III es 67 nm. En una realización preferida, la característica congregada del patrón del colágeno electrocentrifugado es una cualidad importante porque permite que las células tengan acceso a los sitios activos dentro de la molécula del colágeno que promueve o regula actividades específicas.

50 Varias secuencias deseables pueden ser incorporadas en el colágeno sintético. Cualquier secuencia que pueda ser incorporada en una molécula del colágeno puede ser utilizada. Por ejemplo, el sitio P-15, una secuencia de aminoácidos 15 dentro de algunas moléculas del colágeno, promueve osteoblastos para producir y para secretar la hidroxiapatita, un componente del hueso. Otro ejemplo de sitios específicos y de secuencias dentro de las moléculas del colágeno que se pueden manipular y ser procesadas en una manera similar incluye los sitios de unión del RGD característica de la molécula de integrina. El sitio RGD es una secuencia de tres aminoácidos (Arg-Gly-Asp) presente en muchos materiales extracelulares de la matriz que sirve como sitio de unión para la adhesión de la célula. Se reconoce y une, por ejemplo, por las integrinas. Además, el colágeno electroprocesado se puede enriquecer con secuencias específicas deseadas antes, durante, o después del electroprocesado. Las secuencias pueden ser agregadas en forma lineal u otras formas. 60 En algunas realizaciones, las secuencias de RGD se disponen en una forma cíclica designada como ciclo-RGD.

Otros materiales electroprocesados

En algunas realizaciones, las composiciones del colágeno electroprocesado incluyen materiales adicionales electroprocesados. Según lo definido anteriormente, otros materiales electroprocesados pueden incluir materiales naturales, materiales sintéticos, o combinaciones de éstos. Los ejemplos incluyen, a los aminoácidos, péptidos, péptidos desnaturalizados tales como la gelatina del colágeno desnaturalizado, polipéptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleico, glicoproteínas, minerales, lipoproteínas, glicolípidos, glicosaminoglicanos, y proteoglicanos.

Algunos materiales preferidos para el electroprocesado con el colágeno son los materiales de la matriz extracelular que ocurren naturalmente y mezclas de los materiales de la matriz extracelular que ocurren naturalmente, incluyendo la fibrina, elastina, laminina, fibronectina, ácido hialurónico, 4-sulfato de condroitina, 6-sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de heparina, heparina, y sulfato de queratano, y proteoglicanos. Estos materiales pueden ser manufacturados o aislados por cualquier medio incluso el aislamiento desde seres humanos o de otros animales o células o fabricados sintéticamente. Algunos materiales naturales de la matriz preferidos especialmente para combinar con el colágeno electroprocesado son la fibrina, elastina, y fibronectina. Por ejemplo, la Figura 1 es una micrografía de barrido electrónica de una matriz del colágeno electrocentrifugado del tipo I/elastina (80:20). La Figura 2 es una micrografía de barrido electrónica de una matriz del colágeno electrocentrifugado del tipo I/colágeno tipo m/elastina (55:35:20). También se incluyen los extractos crudos de tejido, material extracelular de la matriz, extractos de tejido no natural, o materiales de la matriz extracelular solamente o en combinación. Pueden también ser electroprocesados los extractos de materiales biológicos, incluyendo células, tejidos, órganos, y tumores.

Se comprenderá que estos materiales electroprocesados se pueden combinar con otros materiales y/o sustancias en la formación de las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, un péptido electroprocesado se puede combinar con un coadyuvante para reforzar la inmunogeneticidad cuando está implantado subcutáneo. Como otro ejemplo, la matriz del colágeno electroprocesado, conteniendo las células, puede ser combinado con el polímero electroprocesado compatible biológicamente y los factores de crecimiento para estimular el crecimiento y la división de las células en la matriz del colágeno.

Los materiales sintéticos electroprocesados incluyen cualquier material preparado a través de cualquier método de síntesis artificial, proceso, o fabricación. Los materiales sintéticos son preferiblemente compatibles biológicamente para la administración *in vivo* o *in vitro*. Tales polímeros incluyen poli(uretanos), poli(siloxanos) o siliconas, poli(etileno), poli(pirrolidona de vinilo), poli(2-hidroxietil-metacrilato), poli(N-pirrolidona de vinilo), poli(metacrilato de metilo), alcohol polivinílico, poli(ácido acrílico), poli(acrilamida), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(etilenglicol), policaciones sintéticas (tales como poli(imina etileno)), polianiones sintéticos (tales como poli(sulfonato de estireno) y poli(ácido metacrílico), ácido poliláctico (PLA), ácidos poliglicólicos (PGA), poli(láctido-co-glicólidos (PLGA), nylones, poliamidas, polianhidridos, poli(etileno-co-alcohol vinílico) (EVOH), policaprolactona, poli(acetato de vinilo) (PVA), poli(óxido de etileno) (PEO) y poliésteres o cualquier otro de los polímeros sintéticos similares que pueden ser desarrollados que son biológicamente compatible. Los materiales de una cierta matriz sintética preferida incluyen PLA, PGA, copolímeros del PLA y PGA, policaprolactona, poli(etileno-co-acetato de vinilo), EVOH, PVA, y PEO. Las matrices se pueden formar de las fibras electrocentrifugadas, del electroaerosol, electrorrociado, o gotitas del electrochisporroteo, o una combinación de los anteriores.

En las realizaciones en las cuales se utilizan materiales naturales, esos materiales se pueden derivar de una fuente natural, fabricada sintéticamente, o fabricada mediante células. Por ejemplo, las proteínas diseñadas genéticamente se pueden preparar con el secuencias de los aminoácidos específicas deseadas que las diferencian de las proteínas naturales.

Seleccionando diversos materiales para combinar con el colágeno electroprocesado, o combinaciones de éstos, muchas características del material electroprocesado pueden ser manipuladas. Las propiedades de una matriz compuesta del colágeno electroprocesado pueden ser ajustadas. El colágeno y otros materiales electroprocesados pueden proporcionar un efecto terapéutico cuando están aplicados. Además, la selección de los materiales de la matriz puede afectar la permanencia de una matriz implantada. Por ejemplo, las matrices hechas de fibrina se degradarán más rápidamente mientras que las matrices del colágeno son más duraderas y los materiales sintéticos de la matriz son aún más resistentes. El uso de matrices hechas de materiales naturales tales como proteínas también reducen al mínimo el rechazo o la respuesta inmunológica a una matriz implantada. Por consiguiente, la selección de los materiales para el electroprocesado y el uso en la entrega de la sustancia está influenciada por el uso deseado. En una realización, un parche de la piel del colágeno electroprocesado combinado con los promotores curativos, analgésicos y/o anestésicos y sustancias antirrechazo se pueden aplicar a la piel y pueden posteriormente disolverse en la piel. En otra realización un implante del colágeno electroprocesado para la entrega al hueso puede ser construido de materiales útiles para promover el crecimiento del hueso, los osteoblastos y el hidroxapatita, y puede diseñarse para resistir por un período de tiempo prolongado. En realizaciones en las cuales la matriz contiene sustancias que deben ser liberadas desde la matriz, incorporando componentes sintéticos electroprocesados, tales como sustancias biocompatibles, puede modularse la entrega de las sustancias desde una composición electroprocesada. Por ejemplo, se pueden utilizar estructuras recubiertas o laminadas para controlar el perfil de la entrega de la sustancia. También se pueden utilizar estructuras no recubiertas, en cuyo caso la entrega se controla por la estabilidad relativa de cada componente de la construcción. Por ejemplo, estructuras recubiertas compuestas por materiales alternativos electroprocesados se preparan secuencialmente de diversos materiales del electroprocesado sobre un blanco. Las capas externas, por ejemplo, se adaptan para disolverse más rápido o más lento que las capas internas. Se pueden entregar múltiples agentes con este método, opcionalmente a diferentes velocidades de entrega. Las capas se pueden adaptar para proporcionar un perfil complejo, multicinético de la entrega de un solo agente en un cierto plazo. El uso de las combinaciones del anterior se proporciona para la liberación de sustancias múltiples entregadas, cada una con un perfil complejo.

El recubrimiento de estructuras se utiliza en algunas realizaciones para imitar lo más cercano la composición de materiales naturales. Por ejemplo, manipulando las cantidades del colágeno Tipo I, el colágeno Tipo II, y la elastina en sucesivas capas se utilizan en algunas realizaciones para el imitar de gradientes u otros patrones de la distribución a través de la profundidad de una estructura tal como la pared de un vaso sanguíneo. Otras realizaciones logran tales

patrones sin recubrir. Por ejemplo, alterando los niveles de entrada del colágeno tipo I, colágeno Tipo II y elastina en el aparato del electroprocesado durante la corrida del electroprocesado permite la creación de gradientes y de patrones continuos sin recubrir.

5 Los materiales sintéticos pueden ser electroprocesados desde diversos solventes. Esto puede ser importante para la entrega de algunos materiales. En algunas realizaciones, un medicamento que sea insoluble en los solventes usados para el electroprocesado del colágeno será soluble en un solvente usado para el electroprocesado de los materiales sintéticos. En tales realizaciones, usando los sintéticos aumenta el número de los materiales que pueden ser combinados con la matriz del colágeno electroprocesado. Los polímeros se pueden derivar de manera que proporcionen tal
10 sensibilidad. Estas características proporcionan flexibilidad en la fabricación y el uso de materiales electroprocesados diseñados para entregar varias sustancias, *in vivo* e *in vitro*.

Una composición del colágeno electroprocesado, por ejemplo una matriz, puede también estar compuesta de subdominios específicos de un componente de la matriz y puede ser preparada con una espina dorsal sintética que se
15 puede derivar. Por ejemplo, la secuencia del péptido de RGD, y/o un dominio de la unión de la heparina y/u otras secuencias, pueden químicamente ser acopladas a los materiales sintéticos. El polímero sintético con la secuencia o secuencias unidas puede ser electroprocesado con el colágeno en una construcción. Esto produce una matriz con propiedades únicas. En estos ejemplos el sitio de RGD proporciona un sitio para las células para unirse e interactuar con los componentes sintéticos de la matriz. El sitio de unión de la heparina se puede diseñar y utilizar como un lugar para
20 la fijación de los factores de crecimiento del péptido a la espina dorsal sintética. Los péptidos angiogénicos, el material genético, los factores de crecimiento, los citoquinas, las enzimas y los fármacos son otros ejemplos no limitantes de las sustancias a las cuales se puede unir la espina dorsal del material electroprocesado para proporcionar funcionalidad. Otra realización de materiales de la matriz que tienen un efecto terapéutico es la fibrina electroprocesada. El material de la matriz de la fibrina asiste en la detención del sangrado. Las cadenas laterales del péptido se pueden también
25 utilizar para fijar las moléculas a los grupos funcionales en las espinas dorsales poliméricas. Las moléculas y otras sustancias se pueden fijar a un material a ser electroprocesado por cualquier técnica conocida en la materia.

Sustancias combinadas con composiciones de colágeno electroprocesado

30 En muchas realizaciones deseables, el colágeno electroprocesado se combina con una o más sustancias. Según lo discutido anteriormente, la palabra "sustancia" en la presente invención se utiliza en su definición más amplia. En realizaciones en las cuales las composiciones del colágeno electroprocesado de la presente invención comprenden una o más sustancias, sustancias que pueden incluir cualquier tipo o tamaño de moléculas, células, objetos o combinaciones de éstos. Las composiciones de la presente invención pueden comprender una sustancia o cualquier combinación de
35 sustancias.

Una realización deseable incluye las células como una sustancia combinada con la matriz del colágeno electroprocesado. Cualquier célula se puede utilizar. Algunos ejemplos preferidos incluyen, las células madre, las células madre internadas, y las células diferenciadas. Los ejemplos de las células madre incluyen células madre embrionarias, células
40 madre de la médula y células madre del cordón umbilical. Otros ejemplos de las células usadas en varias realizaciones incluyen, los osteoblastos, mioblastos, neuroblastos, fibroblastos, glioblastos, células del germen, hepatocitos, condrocitos, queratinocitos, células del músculo liso, células del músculo cardíaco, células del tejido conectivo, células gliales, células epiteliales, células endoteliales, células de secreción de la hormona, células del sistema inmune, y neuronas. En algunas realizaciones es innecesario preseleccionar el tipo de célula madre que está para ser utilizada,
45 porque muchos tipos de células madre pueden ser inducidos para distinguir en un patrón específico del órgano una vez entregado a un órgano dado. Por ejemplo, una célula madre entregada al hígado puede ser inducida a que se convierta en una célula del hígado simplemente poniendo la célula madre dentro del hígado. Las células en la matriz pueden responder al propósito de proporcionar el andamiaje o siembra, produciendo ciertos compuestos, o ambos.

50 Realizaciones en las cuales la sustancia que comprende las células incluye las células que pueden ser cultivadas *in vitro*, derivadas de una fuente natural, diseñadas genéticamente, o producidas por cualquier otro medio. Se puede utilizar cualquier fuente natural de las células procariótica o eucariótica. Realizaciones en las cuales la matriz se implanta en un organismo pueden utilizar las células desde el recipiente, células de un donante específico o un donante de una diversidad de especies, o bacterias o células microbianas. Se incluyen las células cosechadas de una fuente y
55 cultivadas antes del uso.

Algunas realizaciones utilizan las células que han sido diseñadas genéticamente. El diseño implica el programar la célula para expresar uno o más genes, reprimiendo la expresión de uno o más genes, o ambas. Un ejemplo de las células diseñadas genéticamente útiles en la presente invención es una célula diseñada genéticamente que marca y segrega
60 una o más moléculas deseadas. Cuando las matrices del colágeno electroprocesado comprenden células diseñadas genéticamente que se implantan en un organismo, las moléculas producidas pueden producir un efecto local o un efecto sistémico, y pueden incluir las moléculas identificadas antes como sustancias posibles. Las células pueden también producir materiales antigénicos en las realizaciones en las cuales uno de los propósitos de la matriz es producir una respuesta inmunológica. Las células pueden producir sustancias para ayudar en la lista siguiente de propósitos: inhibir
65 o estimular la inflamación; facilitar la curación; resistir la inmunoreyección; proporcionar el reemplazo de la hormona; sustituir los neurotransmisores; inhibir o destruir las células del cáncer; promover el crecimiento de la célula; inhibir o estimular la formación de los vasos sanguíneos; aumentar el tejido; y suplir o sustituir neuronas, piel, líquido sinovial, tendones, cartílago, ligamentos, hueso, músculo, órganos, dura, vasos sanguíneos, médula ósea, y matriz extracelular.

La ingeniería genética puede implicar, por ejemplo, agregar o retirar el material genético a o desde una célula, alterar el material genético existente, o ambos. Realizaciones en las cuales las células transferidas o diseñadas de otra manera para expresar un gen pueden utilizar de forma transitoria o permanente genes transferidos, o ambos. Las secuencias del gen pueden ser de longitud completa o parcial, clonadas u ocurriendo naturalmente.

En las realizaciones en las cuales las sustancias son moléculas, se puede utilizar cualquier molécula. Las moléculas pueden, por ejemplo, ser orgánicas o inorgánicas y pueden estar en una fase sólida, semisólida, líquida, o gaseosa. Las moléculas pueden estar presentes en combinaciones o mezclas con otras moléculas, y pueden estar en solución, suspensión, o cualquier otra forma. Ejemplos de las clases de moléculas que pueden ser utilizadas incluyen la terapéutica humana o veterinaria, cosméticos, nutraceúticas, sustancias químicas agrícolas tales como herbicidas, pesticidas y fertilizantes, vitaminas, sales, electrolitos, aminoácidos, péptidos, polipéptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleico, glicoproteínas, lipoproteínas, glicolípidos, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores, feromonas, chalconas, prostaglandinas, inmunoglobulinas, monoquinas y otras citoquinas, humectantes, metales, gases, minerales, plastificantes, iones, materiales reactivos eléctricamente y magnéticamente, materiales sensibles a la luz, antioxidantes, moléculas que pueden ser metabolizadas como una fuente de la energía celular, antígenos y cualquiera de las moléculas que puedan causar una respuesta celular o fisiológica. Cualquier combinación de moléculas puede ser utilizada, así como los agonistas o antagonistas de estas moléculas.

Varias realizaciones preferidas incluyen el uso de cualquier molécula terapéutica incluyendo, fármaco o droga. Ejemplos de productos farmacéuticos incluyen, los anestésicos, hipnóticos, sedantes e inductores del sueño, antisicóticos, antidepresivos, antialérgicos, antianginosos, antiartríticos, antiasmáticos, antidiabéticos, fármacos antidiarreicos, anticonvulsivos, medicamentos antigota, antihistamínicos, antipruríticos, eméticos, antieméticos, antiespasmódicos, supresores del apetito, sustancias neuroactivas, neurotransmisoras agonistas, antagonistas, bloqueantes del receptor y moduladores de la recaptación, bloqueantes beta-adrenérgicos, bloqueantes del canal del calcio, medicamentos de disulfiram y similares, relajantes del músculo, analgésicos, antipiréticos, estimulantes, agentes de la anticolinestérasa, agentes parasimpaticomiméticos, hormonas, anticoagulantes, antitrombóticos, trombolíticos, inmunoglobulinas, inmunosupresores, agonistas/antagonistas de la hormona, vitaminas, agentes antimicrobianos, antineoplásticos, antiácidos, digestivos, laxantes, catárticos, antisépticos, diuréticos, desinfectantes, fungicidas, ectoparasitocidas, anti-parasitarios, metales pesados, antagonistas del metal pesado, agentes quelantes, gases y vapores, alcaloides, sales, iones, autacoides, digital, glucósidos cardíacos, antiarrítmicos, antihipertensores, vasodilatadores, vasoconstrictores, antimuscarínicos, agentes estimulantes ganglionicos, agentes bloqueantes ganglionicos, agentes de bloqueo neuromuscular, inhibidores adrenérgicos del nervio, antioxidantes, vitaminas, cosméticos, antiinflamatorios, productos del cuidado de heridas, agentes antitrombogénicos, agentes antitumorales, agentes antiangiogénicos, anestésicos, agentes antigénicos, agentes curativos de la herida, extractos de la planta, factores de crecimiento, emolientes, humectantes, fármacos rechazo/antirrechazo, espermicidas, acondicionadores, agentes antibacterianos, agentes antihongos, agentes antivirales, antibióticos, tranquilizantes, medicamentos que reducen el colesterol, antitusivos, fármacos antidotos de la histamina, inhibidor de la monoamina oxidasa. Todas las sustancias enumeradas por la farmacopea de los Estados Unidos están también incluidas dentro de las sustancias de la presente invención.

Otras realizaciones preferidas implican el uso de los factores de crecimiento. Factores de crecimiento útiles en la presente invención incluyen, transformador del factor- α de crecimiento ("Tgf- α "), transformador del factor- β de crecimiento ("Tgf- β "), factores de crecimiento derivados de plaquetas incluyendo las isoformas del AA, AB y BB ("PDGF"), factores de crecimiento de fibroblastos ("FGF"), incluyendo las isoformas ácidas 1 y 2 del FGF, forma básica 2 de FGF, y 4, 8, 9 y 10 del FGF, factores de crecimiento del nervio ("NGF") incluyendo NGF 2,5s, NGF 7,0s y NGF beta y neurotrofinas, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor derivado del cartílago, factores de crecimiento del hueso(BGF), factor de crecimiento básico del fibroblastos, insulina como factor de crecimiento (IGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), insulina como factor de crecimiento (IGF) I y II, factor de crecimiento del hepatocito, factor de crecimiento neurotrófico glial (GDNF), factor de la célula madre (SCF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factores de crecimiento transformadores (TGF), incluyendo los TGF, alfa, beta, beta1, beta2, y beta3, factor de crecimiento esquelético, factores de crecimiento derivados de la matriz del hueso, y factores de crecimiento derivados del hueso y mezclas de éstos.

Citoquinas útiles en la presente invención incluyen, cardiotrofina, factor derivado de células estromales, macrófago derivado de quemocina (MDC), actividad estimulante del crecimiento del melanoma (MGSA), macrófago inflamatorio de proteínas 1 alfa (MIP-1 alpha), 2, 3 alfa, 3 beta, 4 y 5, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, TNF- α , y TNF- β . Inmunoglobulinas, útiles en la presente invención incluyen, pero no está limitado a, IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, y mezclas de éstos. Algunos factores de crecimiento preferidos incluyen VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), los NGF (factores de crecimiento del nervio), PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, FGFb, FGFa, y BGF.

Otras moléculas útiles como sustancias en la presente invención incluyen las hormonas de crecimiento, leptina, factor inhibitorio de la leucemia (LIF), factor alfa y beta de la necrosis del tumor, endostatina, angiostatina, tromboespondina, proteína-1 osteogénica, proteínas 2 y 7 morfogenéticas del hueso, osteonectina, péptido como somatomedina, osteocalcina, interferón alfa, interferón alfa A, interferón beta, interferón gamma, interferón 1 alfa, e interleuquinas 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17 y 18.

Realizaciones que implican aminoácidos, péptidos, polipéptidos, y las proteínas pueden incluir cualquier tipo de tales moléculas de cualquier tamaño y complejidad así como combinaciones de tales moléculas. Los ejemplos incluyen, proteínas estructurales, enzimas, y hormonas del péptido. Estos compuestos pueden servir una variedad de funciones. En algunas realizaciones, la matriz puede contener los péptidos que contienen una secuencia que suprime la actividad enzimática a través de la competencia por el sitio activo. En otros usos se pueden incorporar agentes antigénicos que promueven una respuesta inmunológica e invocan inmunidad en una construcción.

Para las sustancias tales como los ácidos nucleico, el ácido nucleico puede estar presente. Los ejemplos incluyen, ácido deoxirribonucleico (ADN), ent-ADN, y ácido ribonucleico (ARN). Las realizaciones que implican ADN incluyen, secuencias de cADN, secuencias naturales de ADN de cualquier fuente, y oligonucleótidos sentido o antisentido. Por ejemplo, el ADN puede estar desnudo (por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.580.859; 5.910.488) o acompañado o encapsulado (por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.908.777; 5.787.567). El ADN puede estar presente en vectores de cualquier clase, por ejemplo en un vector viral o del plásmido. En algunas realizaciones, los ácidos nucleico usados servirán para promover o para inhibir la expresión de los genes en células adentro y/o fuera de la matriz electroprocesada. Los ácidos nucleico pueden estar en cualquier forma que sea eficaz para reforzar la captación dentro de las células.

Las sustancias en las composiciones del colágeno electroprocesado de la presente invención también comprenden objetos. Ejemplos de objetos incluyen los fragmentos de la célula, detritos de la célula, organelas y otros componentes de la célula, tabletas, y virus así como las vesículas, liposomas, cápsulas, nanopartículas, y otras estructuras que sirven como recinto para las moléculas. En algunas realizaciones, los objetos constituyen vesículas, liposomas, cápsulas, u otros recintos que contienen los compuestos que se liberan un tiempo después del electroprocesado, tal como a la hora de la implantación o en un estímulo o una interacción posterior. En una realización ilustrativa, agentes de la transfección tales como los liposomas contienen las secuencias deseadas del nucleótido que se incorporarán en las células en las cuales están situados o en el material o matriz electroprocesado. En otras realizaciones, se incorporan los fragmentos de la célula, las fracciones específicas de la célula o los detritos de la célula en la matriz. La presencia de los fragmentos de la célula se sabe que promueve la cura en algunos tejidos.

Materiales reactivos magnéticamente o eléctricamente son también ejemplos de sustancias que se incluyen opcionalmente dentro de las composiciones del colágeno electroprocesado de la presente invención. Ejemplos de materiales activos magnéticamente incluyen los ferrofluidos (suspensiones coloidales de partículas magnéticas), y de varias dispersiones de polímeros conductores eléctricamente. Son particularmente útiles los ferrofluidos que contienen partículas de aproximadamente 10 nm en diámetro, partículas magnéticas del polímero encapsulado cerca de 1-2 micrómetros en diámetro, y polímeros con una temperatura de transición del cristal por debajo de la temperatura ambiente. Ejemplos de los materiales activos eléctricamente son polímeros que incluyen polímeros conductores eléctricamente tales como la polianilina y las polipirrolas, los polímeros conductores iónicamente tales como las poliacrilamidas sulfonadas son materiales relacionados, y conductores eléctricos tales como negro de carbón, grafito, nanotubos de carbón, las partículas del metal, y metal recubierto de plástico o materiales cerámicos.

En otras realizaciones, algunas sustancias en los materiales del colágeno electroprocesado o suplementan la matriz o aceleran la función de otras sustancias. Por ejemplo, cuando la composición comprende las células que expresan un gen específico, la composición puede contener los oligonucleótidos que son tomados por las células y afectan la expresión del gen en las células. La fibronectina se incorpora opcionalmente en la matriz para aumentar la captación celular de los oligonucleótidos por pinocitosis.

Según lo discutido anteriormente en particular, el material electroprocesado por sí mismo puede proporcionar un efecto terapéutico. La invención incluye así las realizaciones que implican métodos de causar un efecto terapéutico con la entrega del material electroprocesado a una localización sin incorporar las sustancias adicionales en el mismo. Realizaciones en las cuales se entrega un solo material de la matriz así como en las cuales se incluyen otras sustancias en la matriz están dentro del alcance de la presente invención.

Estabilidad y almacenaje de composiciones de colágeno electroprocesado

La estabilidad de las composiciones del colágeno electroprocesado de la presente invención que comprenden el colágeno electroprocesado, también permite el almacenamiento por largo tiempo de las composiciones entre la formación y el uso. La estabilidad permite mayor flexibilidad para el usuario en realizaciones en las cuales una sustancia se aplica después de la formación del material electroprocesado, por ejemplo empapando y rociando. Una matriz electroprocesada formada puede ser fabricada y almacenada, y entonces la posición exacta de la sustancia que se agregará en una aplicación específica puede ser preparada y adaptada a una necesidad específica poco antes de la implantación o aplicación. Esta característica permite a los usuarios mayor flexibilidad en ambas opciones del tratamiento y la gerencia de inventario. En muchas realizaciones, el colágeno electroprocesado se seca una vez que sea electroprocesado, esencialmente deshidratado, facilitando de este modo el almacenaje en un estado seco o congelado. Además, las composiciones del colágeno electroprocesado son substancialmente estériles en el acabado, proporcionando así una ventaja adicional en usos terapéuticos y cosméticos.

Las condiciones de almacenaje para las composiciones del colágeno electroprocesado de la presente invención dependerán de los materiales y las sustancias electroprocesadas en éstas. Por ejemplo, en algunas realizaciones que implican proteínas, puede ser necesario o deseable almacenar las composiciones a temperaturas debajo de 0°C, al

vacío, o en una condición liofilizada. Otras condiciones de almacenaje pueden utilizarse, por ejemplo, a temperatura ambiente, en oscuridad, en vacío o bajo presión reducida, bajo atmósferas inertes, a la temperatura del refrigerador, en soluciones acuosas u otros líquidos, o en forma rociada. Los expertos en la técnica reconocen las condiciones de almacenaje apropiadas para los materiales y las sustancias contenidas en las composiciones y serán capaces de seleccionar las condiciones de almacenaje apropiadas.

Las composiciones del colágeno electroprocesado de la presente invención y las formulaciones que comprenden esas composiciones se pueden esterilizar con los medios convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Tales medios incluyen filtración, radiación, y la exposición a la esterilización de agentes químicos tales como el ácido peracético o el gas del óxido de etileno. El calor se puede también utilizar en realizaciones en las cuales el uso del calor no desnaturalizará el colágeno. Las composiciones de la presente invención pueden también combinarse con agentes bacteriostáticos, tal como el timerosal, para inhibir el crecimiento bacteriano.

Las formulaciones que comprenden las composiciones del colágeno electroprocesado de la presente invención pueden ser presentadas en envases de dosis unitaria o dosis múltiples, por ejemplo, las ampulas y los frascos sellados, y se pueden almacenar en una condición seca-congelada (liofilizada) que requiere solamente la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones de la inyección improvisadas pueden ser preparadas de polvos, gránulos y tabletas estériles comúnmente utilizadas por un experto en la técnica. Las formulaciones de dosis unitarias preferidas son aquellas que contienen una dosis o una unidad del ingrediente administrado, o una fracción apropiada de éstas. Se comprenderá que además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes utilizados comúnmente por un experto en la técnica.

Las composiciones del colágeno electroprocesado de la presente invención se pueden empaquetar en una variedad de formas en dependencia del método usado para administrar la composición. Generalmente, un artículo para la distribución incluye un envase que contiene la composición o la formulación que comprende la composición en una forma apropiada. Los envases convenientes se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen materiales tales como botellas (de plástico y cristal), bolsitas, ampulas, bolsos plásticos, cilindros de metal, y similares. El envase puede también incluir un ensamblaje a prueba de manipulación para prevenir el acceso indiscreto al contenido del paquete. Además, el envase tiene depositado sobre él una marca que describe el contenido del mismo. La marca puede también incluir las advertencias apropiadas.

Otras características de las composiciones del colágeno electroprocesado

Las composiciones del colágeno electroprocesado de la presente invención tienen muchas características beneficiosas. Algunas características permiten el uso como un implante dentro o reemplazo de tejidos o de órganos del cuerpo de un organismo. En muchas realizaciones preferidas, los materiales electroprocesados forman una matriz, preferiblemente una matriz similar a una matriz extracelular. Por ejemplo, el tipo de colágeno seleccionado puede ser basado en la semejanza al tejido en el cual será implantada la composición, o, en el caso de un prótesis, del tipo de tejido, estructura, u órgano que es substituido, reparado, o aumentado. En tales realizaciones, el material electroprocesado se combina con otros materiales extracelulares de la matriz más próximos a los tejidos imitados. Tal combinación puede ocurrir antes, durante, o después de la formación de la matriz. Algunos materiales extracelulares son electroprocesados en una matriz junto con el colágeno o formados a través de otros medios. En algunas realizaciones los materiales de la matriz se agregan al colágeno electroprocesado una vez que se haya fabricado la matriz.

Las composiciones del colágeno electroprocesado de la presente invención tienen muchas características que las hacen convenientes para la formación de matrices extracelulares. La estructura de la fibrilla y la banda del colágeno electrocentrifugado es similar al colágeno que ocurre naturalmente. La densidad y la estructura de las matrices formadas por este método son mayores que aquellas que se alcanzan por los métodos conocidos y más similares a las de las matrices extracelulares naturales.

En las realizaciones que implican el colágeno electrocentrifugado, las fibras se producen con diámetros mucho más bajos que los que se pueden producir por los procesos de fabricación conocidos. Se han observado las fibras del colágeno electrocentrifugado para tener diámetros de la sección transversal que se extienden desde varios micrómetros abajo hasta debajo de 100 nanómetros. El diámetro de la fibra electrocentrifugada puede ser manipulado cambiando, por ejemplo, la composición (ambos en términos de las fuentes y tipos de colágeno y mezclando con otros materiales) y la concentración del colágeno y de otros materiales a ser electrocentrifugados. En algunas realizaciones, la adición y el retiro de las moléculas que regulan o afectan la formación de la fibra puede ser agregada para manipular la formación de la fibra del colágeno. Se conocen muchos proteoglicanos, por ejemplo, para regular la formación de la fibra, incluyendo el afectar el diámetro de las fibras. Un amplio intervalo de los diámetros de la fibra es realizable. Algunos ejemplos de los diámetros de la fibra electrocentrifugada en diferentes realizaciones incluyen el colágeno Tipo I con diámetros del filamento individual que se extienden a partir de 100-730 nm; fibras del colágeno Tipo I con un diámetro medio de 100 ± 40 nm; fibras del colágeno Tipo II con un diámetro medio de $1,0 \mu\text{m}$; fibras del colágeno Tipo II con un diámetro medio de $3 \pm 2,5$ micrómetros; colágeno Tipo III que produce fibras con diámetros medios de 250 ± 150 nm; una mezcla del colágeno electrocentrifugado Tipo I y Tipo III produciendo fibras con un diámetro medio de 390 ± 290 nm; y una mezcla de colágeno Tipo I/colágeno Tipo III/elastina (45:35:20) que tiene un diámetro de 800 ± 700 nm. En muchas realizaciones, el material electrocentrifugado forma como una fibra continua de forma tal que los materiales centrifugados no muestran ninguna evidencia de extremos libres en el examen microscópico.

El uso de matrices del colágeno electrocentrifugado en implantes promueve la infiltración celular de los implantes. En efecto, las construcciones que comprenden las matrices de la presente invención exhiben una propensión a la migración celular no previamente conocida para ser realizable por las construcciones implantadas. Se conoce que el tamaño de poros en un implante afecta la interacción del dispositivo/material con el tejido circundante del anfitrión.

- 5 Para las estructuras porosas, la interacción es dependiente del tamaño, distribución de tamaño, y continuidad de los poros dentro de la estructura del dispositivo. Previamente se pensó que el tamaño de poros debía ser mayor que cerca de 10 micrómetros para que las células sean capaces de la migración en, de, o a través de la estructura. Se ha observado, sin embargo, que los implantes compuestos de nanofibras electrocentrifugadas de por lo menos algunos tipos de proteínas naturales no están sometidos a esta limitación. En una realización ocurrió migración celular significativa
10 en un colágeno/elastina electrocentrifugado con un tamaño medio de poros de 3,7 micrómetros. La infiltración puede también lograrse con los implantes con tamaños más pequeños del poro. El tamaño de poros de una matriz del colágeno electroprocesado puede ser manipulado fácilmente a través del control de los parámetros del proceso, por ejemplo controlando la velocidad de deposición de la fibra a través de la intensidad del campo eléctrico y el movimiento del mandril, mediante la variación de la concentración de la solución (y así el tamaño de la fibra). La porosidad
15 también puede ser manipulada mezclando materiales porogénicos, tales como las sales u otros agentes extractables, de los cuales quedarán orificios de tamaños definidos en la matriz. Si se desea el grado al que las células infiltran una matriz puede ser controlado hasta un grado mediante la cantidad de enlaces reticuladas presentes en la matriz. Una matriz altamente entrecruzada no se infiltra tan rápidamente como una matriz con un grado bajo de reticulación. La adición de los materiales sintéticos a una matriz puede también limitar el grado al cual las células infiltrarán el
20 material.

- El colágeno electroprocesado tiene la ventaja adicional de tener mayor fuerza estructural que los implantes del colágeno conocidos, y de conservar esa fuerza estructural después de la implantación. Las matrices electroprocesadas tienen mayor integridad estructural que los geles del colágeno usados en los implantes actuales. También muestran
25 menos susceptibilidad a reformas y resorción después de la implantación que las tecnologías conocidas de la matriz del colágeno. Además, la presente invención incluye métodos de controlar el grado al cual el colágeno electroprocesado será resorbido. En algunas realizaciones el colágeno electrocentrifugado puede ser reabsorbido bastante rápidamente, en un período de 7-10 días o más corto. En otras realizaciones, características tales como la reticulación extensa de las fibrillas del colágeno se utilizan para hacer la matriz muy estable y capaz de durar desde meses hasta años. La
30 variación de la reticulación también proporciona una capacidad adicional de simular el tejido natural. Los colágenos naturales dentro del cuerpo exhiben diversos grados de reticulación y estabilidad biológica. El grado de reticulación en los colágenos naturales puede variar en función de la edad, del estado fisiológico y en respuesta a los varios procesos de la enfermedad.

- 35 La capacidad de combinar las composiciones del colágeno electroprocesado con otros materiales electroprocesados proporciona numerosas ventajas adicionales. Preparando una composición o construcción que comprende el colágeno electroprocesado y los materiales adicionales de la matriz extracelular electroprocesada se puede reforzar también la capacidad para imitar la matriz extracelular. En algunas realizaciones, el colágeno electroprocesado se puede combinar con materiales electroprocesados tales como fibrina, elastina, laminina, fibronectina, integrina, ácido
40 hialurónico, sulfato de condroitina 4, sulfato de condroitina 6, sulfato de dermatano, sulfato de heparina, heparina, y sulfato de queratano, y proteoglicanos en cantidades relativas apropiadas para imitar la composición de los materiales de la matriz extracelular. Cuando sea apropiado, las sustancias que comprenden los materiales extracelulares pueden ser preparadas por otros medios que no sean el del electroprocesado y combinadas con el colágeno electroprocesado. En algunas realizaciones, pueden ser electroprocesados los extractos más crudos del colágeno aislados de los tejidos
45 conectivos. En tales realizaciones, la matriz contiene una variedad de elementos estructurales y reguladores que pueden ser necesarios para promover actividades tales como cura, regeneración, y diferenciación celular.

- Otros materiales electroprocesados pueden ser incluidos en la matriz para proporcionar otras características de la matriz. Un ejemplo es la capacidad de controlar la persistencia o biodegradación de la matriz implantada. La
50 fibrina como un material de la matriz tiende a degradar más rápidamente cuando está implantada que el colágeno, mientras que algunos polímeros sintéticos tienden a degradar más lentamente. Controlar el contenido relativo de estos materiales afectará la velocidad a la cual se degrada la matriz. Como otro ejemplo, se pueden incluir materiales para aumentar la susceptibilidad de una matriz o construcción formada desde una matriz, al sellado por calor, al sellado químico, y al uso de la presión mecánica o de una combinación de éstos. Se ha observado que la inclusión de polímeros
55 sintéticos refuerza la capacidad de las matrices de ser cauterizadas o soldadas en caliente. La inclusión de los polímeros eléctricamente o magnéticamente reactivos en los materiales de la matriz es otro ejemplo. En algunas realizaciones, se utilizan tales polímeros para preparar las matrices que son conductoras, que proporciona un efecto piezoeléctrico, o altera la forma, porosidad y/o densidad del material electroprocesado en respuesta a un campo eléctrico o magnético. Otro ejemplo es el uso de matriz de material conocido por tener efectos terapéuticos. Por ejemplo, el material de la
60 matriz de fibrina asiste en la detención del sangrado. La fibrina es un componente de la matriz provisional que se coloca durante los primeros tiempos de la cura y puede también promover el crecimiento de la vasculatura en las regiones adyacentes, y en muchas otras formas ser un promotor de cicatrización natural.

- La capacidad de incorporar sustancias en la composición electroprocesada permite ventajas adicionales. Una de
65 tales ventajas es incluso la imitación más cercana al tejido y mayor compatibilidad para los implantes. En alguna de las realizaciones preferidas, las células madre, células madre internadas que diferenciarán dentro del tipo de célula deseado, o distinguirán las células del tipo deseado, se incorporan para imitar lo más cercano al tejido. Además, los métodos disponibles para encapsular o de otra manera combinar las células con el colágeno electroprocesado conducen

a mayor densidad de la célula en la matriz que la que es alcanzable por los métodos conocidos. Esta densidad es reforzada aún más por la infiltración mejorada de la célula, discutida anteriormente.

La capacidad de las composiciones de la presente invención para imitar los materiales naturales reduce al mínimo el riesgo del rechazo inmune de una matriz implantada. Por ejemplo, se puede utilizar el material autólogo. Sin embargo, la semejanza cercana a los materiales naturales ha permitido evitar la reacción inmune incluso en algunas realizaciones en las cuales se utilizan los materiales heterólogos. Por ejemplo, cilindros electrocentrifugados del colágeno tipo I del bovino (25 mm. de largo por 2 mm. de ancho) implantado en el músculo vasto externo de la rata no mostró ninguna respuesta inmune después de 7-10 días. Similares construcciones compuestas del colágeno electrocentrifugado Tipo I fueron suplidos con los mioblastos e implantados. Similares resultados ocurrieron, ninguna evidencia de inflamación o rechazo y los implantes fueron densamente poblados. Además, algunas realizaciones de las matrices han sido observadas para evitar la encapsulación de implantes por el recipiente del tejido, un problema común con los implantes. En realizaciones en las cuales se desea que la encapsulación, se altera la estructura de la matriz para promover la inflamación y la encapsulación.

Sustancias que pueden proporcionar características de la matriz favorables también incluyen los fármacos y otras sustancias pueden producir efecto terapéutico u otro fisiológico en las células y los tejidos dentro o que rodean un implante. Cualquier sustancia se puede utilizar. En muchas realizaciones preferidas, las sustancias se incluyen en la matriz del colágeno electroprocesado que mejorarán el funcionamiento de la matriz electroprocesada implantada. Ejemplos de sustancias que se pueden utilizar incluye factores de crecimiento del péptido, antibióticos, y/o fármacos antirrechazo. Productos químicos que afectan la función de la célula, tal como oligonucleótidos, promotores o inhibidores de la adhesión de la célula, hormonas, y factor de crecimiento son ejemplos adicionales de sustancias que pueden ser incorporadas en el material del colágeno electroprocesado y la liberación de esas sustancias desde el material electroprocesado puede proporcionar un medio de controlar la expresión u otras funciones de las células en el material electroprocesado. Alternativamente, pueden ser incluidas las células que se diseñan para la fabricación de los compuestos deseados. La construcción entera, por ejemplo, se cultiva en un biorreactor o cultivo convencional o colocado directamente *in vivo*. Por ejemplo, la neovascularización se puede estimular por factores angiogénicos y promotores del crecimiento, administrados, como péptidos, proteínas o como terapia del gen. Agentes angiogénicos pueden ser incorporados en la matriz del colágeno electroprocesado. Alternativamente, donde no se desea la neovascularización, materiales antiangiogénicos, tales como la angiostatina, pueden incluirse en la matriz del colágeno electroprocesado. Los factores de crecimiento del nervio pueden ser electrocentrifugados dentro de la matriz del colágeno electroprocesado para promover el crecimiento o las neuronas en la matriz y el tejido. En una matriz degradable del colágeno electroprocesado, la degradación gradual/interrupción de la matriz liberará estos factores y acelera el crecimiento de los tejidos deseados. Las sustancias pueden ser incorporadas en la matriz del colágeno electroprocesado para regular la diferenciación de células en la matriz. Oligonucleótidos y los fármacos de los péptidos tales como el ácido retinoico son ejemplos de tales sustancias. El ADN del oligonucleótido o las secuencias del ARN mensajero que codifica para las proteínas específicas en la dirección del sentido y del antisentido se puede también utilizar. Por ejemplo, donde se desea la expresión de una proteína, los oligonucleótidos del sentido se pueden proporcionar para la captación mediante las células y la expresión. Los oligonucleótidos del antisentido pueden ser liberados, por ejemplo, al suprimir la expresión de las secuencias génicas de interés. Los implantes se pueden diseñar de tal forma que las sustancias afectan las células contenidas dentro de la matriz, fuera de la matriz o ambas.

Varios métodos existen para estudiar y cuantificar características específicas de los materiales de la matriz de la presente invención. Las dimensiones del diámetro y de poros de la fibra (porosidad), para las matrices basadas en colágeno, puede estar resuelto, por ejemplo, por el microscopio de SEM que es convertido a digital y analizado con UTHSCSA ImageTool 2.0 (NIH Shareware). La permeabilidad del agua, una característica que es diferente a la porosidad, puede también ser usada al estudiar por métodos estándares. La microscopia atómica de fuerza puede también ser usada para preparar tres imágenes dimensionales de la topografía superficial de especímenes biológicos en entornos líquidos o gaseosos y a lo largo de un intervalo grande de temperaturas. Esta herramienta permite la determinación de la relación y de la interacción entre los componentes de la matriz. El análisis de la composición de la construcción puede incluir, por ejemplo, análisis de la histología para determinar el grado de distribución celular a través del espacio intersticial de las construcciones. Para asistir a este análisis, las células se pueden manchar con cualquier técnica conocida de la célula (por ejemplo, hematoxilina y eosina, y Masson trichrome). La actividad proliferativa de células se puede estudiar, por ejemplo, marcando las células vía biosintética con una marca que incorpora en las llamadas que experimentan activamente la síntesis de la ADN (por ejemplo, con bromodeoxiuridina) y usando los anticuerpos de la marca para determinar el grado al que las células están experimentando la división nuclear. La densidad celular se puede determinar, por ejemplo, midiendo la cantidad de ADN en enzima digerida al utilizar de las muestras técnicas conocidas. El grado de degradación o de remodelación del colágeno de la matriz por las células se puede determinar, para ejemplo, midiendo la expresión y la actividad de la metaloproteinasas de la matriz de las células. Una forma de medir la funcionalidad de células adentro de las matrices del colágeno electroprocesado está midiendo varios puntos finales fisiológicos característicos de los tejidos. Por ejemplo, las células del músculo puede ser estimulado con una señal eléctrica o ser desafiado con los agentes químicos o los fármacos, por ejemplo carbacol, para determinar la contractibilidad de una construcción. La función de células en una construcción endocrina se puede determinar midiendo la producción que mide las hormonas deseadas. Un experto en la técnica entenderá que numerosos parámetros y las puntos finales pueden ser utilizados en caracterizar tejidos y matrices usando métodos existentes.

*Métodos de fabricación de las composiciones de colágeno electroprocesado**Electroprocesado*

5 Los métodos de fabricación de las composiciones de colágeno electroprocesado incluyen, electroprocesado del colágeno y opcionalmente electroprocesado de otros materiales, sustancias o ambas. Según lo definido anteriormente, uno o más técnicas de electroprocesado, tales como electrogiro, electrorrociado, electroaerosol, electrodeposición, o cualquier combinación de éstos, puede ser empleado para producir colágeno electroprocesado y matrices en las composiciones de la presente invención. En el sentido más fundamental, el aparato de electroprocesado para el material electroprocesado incluye un mecanismo de electrodeposición y un sustrato blanco. El mecanismo de electrodeposición incluye un recipiente o recipientes para las unas o más soluciones a ser electroprocesadas o electrodepositadas. El recipiente o los recipientes tienen por lo menos un orificio o inyector para permitir fluir la solución desde los recipientes. Aunque se utilizan los términos “orificio” e “inyector” a través de, éstos se refieren genéricamente a cualquier localización desde cual las soluciones pueden fluir durante el electroprocesado. Uno o una pluralidad de inyectores se pueden configurar en un aparato de electroprocesado. Si hay inyectores múltiples, cada inyector se une a uno o más recipientes contienen el mismo o diversas soluciones. Semejantemente, puede ser un solo inyector que está conectado con los recipientes múltiples que contienen el mismo o diversas soluciones. Los inyectores múltiples se pueden conectar con un solo recipiente. Diversas realizaciones que implican solo o múltiples inyectores y/o recipientes, cualquiera referencias sobre una o mas inyectores o recipientes se deben considerar como refiriéndose a las realizaciones que implican solo un inyector, recipiente, y equipo relacionado, así como las realizaciones que implican inyectores, recipientes plurales, y el equipo relacionado. El tamaño de los inyectores puede ser variado para prever un flujo aumentado o disminuido de las soluciones desde los inyectores. Una o más bombas usadas en la conexión con los recipientes pueden utilizarse para controlar el flujo de la solución que fluye del recipiente a través del inyector o de los inyectores. La bomba puede programarse para aumentar o para disminuir el flujo en diferentes puntos durante el electroprocesado. En esta invención las bombas no son necesarias sino que proporcionan un método útil para controlar la velocidad en la cual el material se entrega al campo eléctrico para procesado. El material puede ser entregado activamente al campo eléctrico como aerosol preformado usando los dispositivos por ejemplo descargas del aire, de tal modo aumentando la velocidad de electrodeposición y proporcionando combinaciones de la velocidad de materiales. Los inyectores se pueden programar para entregar el material simultáneamente o en secuencia.

30 El electroprocesado ocurre debido a la presencia de una carga en los orificios o el blanco, mientras que se pone a tierra el otro. En algunas realizaciones, el inyector se carga el orificio y el blanco se muestra puesto a tierra. Los expertos en los técnicas electroprocesado reconocerán que el inyector y la solución se pueden poner a tierra y el blanco se puede cargar eléctricamente. La creación del campo eléctrico y el efecto del campo eléctrico en el electroprocesado de los materiales o las sustancias que formarán la composición electroprocesada ocurren si la carga se encuentra en la solución o en el blanco puesto a tierra. En diversas realizaciones, el espacio entre el blanco y el inyector o la fuente de los materiales puede contener aire o gases seleccionados. En varias realizaciones, el espacio puede ser mantenido al vacío o bajo de la presión atmosférica o sobre la presión atmosférica normal. Los solventes utilizados en electroprocesado típicamente se evaporan durante el proceso. Esto se considera ventajoso porque asegura que los materiales electroprocesados son secos. Al usar de las realizaciones regar u otro menos volátil los solventes, el electroprocesado pueden ocurrir opcionalmente en vacío o atmósfera controlada (por ejemplo, atmósfera que contiene amoníaco) para asistir a la evaporación. El electroprocesado puede ser orientado usando diversas formas orientadas con respecto a las fuerzas de la gravedad u ocurrir en un ambiente de cero gravedad.

45 El sustrato se puede también utilizar como característica variable en el electroprocesado de materiales utilizados para producir la composición electroprocesada. Específicamente, el blanco puede ser el sustrato real para los materiales usados para producir la matriz electroprocesada, o se deposita la matriz electroprocesada en sí mismo. Alternativamente, un sustrato se dispone entre el blanco y los inyectores. Por ejemplo, unas placas de Petri se puede disponer entre los inyectores y un blanco, y una matriz se pueden formar en el plato. Otras variaciones incluyen, pero no se limitan a, superficies no adherentes situadas entre los inyectores y el blanco, y situando tejidos o campos quirúrgicos entre el blanco y los inyectores. El blanco puede también ser cargado o ser puesto a tierra específicamente a lo largo de un patrón preseleccionado de modo que fluyera la solución desde el orificio dirigiéndolo en direcciones específicas. El campo eléctrico se puede controlar por un microprocesador para crear la matriz electroprocesada que tiene una geometría deseada. Blanco e inyector o los inyectores pueden ser diseñados para ser movable uno con respecto a otro, para de tal modo permitir control adicional sobre la geometría de la matriz electroprocesada que se formará. El proceso entero puede ser controlado por un microprocesador que se programe con los parámetros específicos que producen una matriz específica electroprocesada. Debe ser entendido que cualquier técnica de electroprocesado puede ser utilizada, sola o conjuntamente con otras técnicas de electroprocesado, para producir las composiciones de la presente invención.

60 Las formas del colágeno electroprocesado incluyen pero no se limitan al colágeno preprocesado en una suspensión líquida o solución, gelatina, suspensión de partículas, o gel hidratado. Donde está la fibrina también electroprocesada, la fibrina se puede utilizar como gel preformado electroprocesado sometiéndolo a la presión, por ejemplo usando una jeringuilla o los aparatos del aerógrafo con una presión dirigida detrás a extrudir el gel de la fibrina en el campo eléctrico. En general, al producir fibras usando las técnicas del electroprocesado, electrogiro especialmente, es preferible utilizar el monómero de la fibra del polímero que se formará. En algunas realizaciones es deseable utilizar los monómeros para producir filamentos más finos. En otras realizaciones, es deseable incluir fibras parciales para agregar fuerza al material de la matriz y proporcionar sitios adicionales para las sustancias que se incorporan. Materiales de

la matriz tales como colágeno dentro una forma de gelatina se puede utilizar para mejorar la capacidad del material a disolver. El método ácido de extracción puede ser utilizado en la preparación de tales geles mantener la estructura de las subunidades monoméricas. Las unidades se pueden entonces tratar con las enzimas para alterar la estructura de los monómeros.

En las realizaciones en las cuales dos materiales se combinan para formar un tercer material, las soluciones que contienen estos componentes se pueden mezclar juntos inmediatamente antes de que se fluyan de un orificio en el procedimiento de electroprocesado. De esta manera, el tercer material se forman literalmente como las microfibras o las microgotitas son formadas en el proceso de electrogiro. Alternativamente, tales matrices pueden ser formadas por electrorrociado de una molécula que puede formar los materiales de la matriz en una atmósfera, húmeda o de otra manera controlada de otras moléculas, necesarias para permitir que la matriz forme filamentos dentro del campo eléctrico.

Alternativamente, en las realizaciones en las cuales dos o más materiales de la matriz se combinan para formar un tercero, los materiales de la matriz pueden ser electroprocesados en conjunción con, o por separado uno del otro. En algunas realizaciones deseables, esto ocurre en condiciones que no permiten que las dos moléculas formen la tercera molécula hasta transcurrir el tiempo deseado. Esto se puede lograr varias maneras. Alternativamente, las moléculas se pueden mezclar con un portador, por ejemplo PEO, u otros polímeros sintéticos o naturales por ejemplo el colágeno. El portador actúa para sostener los reactivos, en el lugar hasta que se inician.

Como se declaró anteriormente, debe ser entendido que los portadores pueden ser utilizados conjuntamente con los materiales de la matriz. Diversos materiales, tales como proteínas extracelulares de la matriz, y o sustancias, puede ser mezcladas con PEG u otros portadores conocidos que forman filamentos. Por ejemplo, el colágeno y fibrinógeno y se pueden mezclar con PEG u otros portadores conocidos que forman filamentos. Esto produce “filamentos peludos”, con el pelo que es colágeno, fibrina, u otro material de la matriz. Los “pelos” reticulan y rodean el portador de la matriz en un gel, o proporcionan sitios reactivos a las células para interactuar recíprocamente con la sustancia dentro del portador de la matriz, por ejemplo las inmunoglobulinas. Este enfoque puede ser utilizado para formar una matriz, o gelificarse las moléculas que no se gelifican normalmente.

Alternativamente, el colágeno electroprocesado puede ser pulverizado para formar una hoja. Otras moléculas que forman hojas incluyen PGA, PLA, un copolímero de PGA y PLA, colágeno, y fibronectina. En algunas realizaciones, la hoja se forma con dos o más materiales que puedan combinarse para formar un tercer material. Esta hoja se puede colocar adentro de un ambiente húmedo para permitir la conversión al tercer material.

Además de las variaciones múltiples del equipo y modificaciones que se pueden hacer para obtener los resultados deseados, semejantemente la solución del colágeno electroprocesada puede ser variado para obtener diversos resultados. Por ejemplo, puede utilizarse cualquier solvente o líquido en el cual se disuelva el material, suspenda, o combina de otra manera sin efecto deletéreo sobre el uso del proceso o seguridad de la matriz. Materiales o los compuestos que forman los materiales pueden ser mezclados con otras moléculas, monómeros o polímeros para obtener los resultados deseados. En algunas realizaciones, los polímeros se agregan para modificar la viscosidad de la solución. En aún otra variación, cuando son utilizados recipientes múltiples, los ingredientes en esos recipientes son electroprocesados por separado o ensamblados en el inyector de modo que los ingredientes en los varios recipientes puedan reaccionar cada uno con el otro simultáneamente con flujo de la solución en el campo eléctrico. También, cuando son recipientes múltiples utilizados, los diversos ingredientes en diversos recipientes pueden ponerse en fase temporalmente durante el período de procesado. Estos ingredientes pueden incluir sustancias.

Las realizaciones que implican alteraciones al colágeno electroprocesado en sí mismo están dentro del alcance de la presente invención. Algunos materiales se pueden alterar directamente, por ejemplo, alterando su perfil de carbohidratos o la secuencia de aminoácidos de una proteína, de un péptido, o de un polipéptido. También, otros materiales se pueden unir a materiales de la matriz antes, durante o después del electroprocesado usando técnicas conocidas tales como reticulación química o con interacciones ligantes específicas. Además, la temperatura y otras características físicas del proceso pueden modificarse para obtener diversos resultados. La matriz puede comprimirse o estirarse para producir nuevas características del material. Son posibles aún más variaciones químicas.

El electroprocesado usando boquillas múltiples de diferente soluciones del polímero y/o las mismas soluciones con diferentes tipos y cantidades de sustancias (por ejemplo, factores de crecimiento) se puede utilizar para preparar bibliotecas de biomateriales para una investigación rápida. Tales bibliotecas son deseadas por expertos en industrias avanzadas de materiales y catalizadores farmacéuticos, usando las técnicas combinatorias de síntesis para la preparación rápida de cantidades grandes (por ejemplo, bibliotecas) de compuestos que se pueden evaluar. Por ejemplo, puede investigarse la mínima cantidad de factor de crecimiento que se liberará y velocidad de liberación óptima de un andamiaje fibroso de colágeno a promover la diferenciación de cierto tipo de célula, usando las composiciones y los métodos de la presente invención. Otras variables incluyen el tipo de colágeno, y diámetro de la fibra electroprocesada. El electroprocesado permite el acceso a un conjunto de muestras, en las cuales las células pueden ser cultivadas en paralelo y estudiadas para determinar las composiciones seleccionadas, las cuales sirven como sustratos prometedores de crecimiento de células.

Varias condiciones eficaces se pueden utilizar para electroprocesar una matriz de colágeno. Mientras que lo que sigue es una descripción de un método preferido, otros protocolos puede seguirse para alcanzar el mismo resultado.

Con referencia a la figura 3, en fibras electrogiro del colágeno, las micropipetas 10 se llenan de una solución que comprende el colágeno y se suspenden sobre un blanco puesto a tierra 11, por ejemplo, una pantalla metálica a tierra colocada dentro del cilindro central del Biorreactor de RCCS. Aunque esta realización implica dos micropipetas que actúan como fuentes de materiales, la presente invención incluye las realizaciones que implican solamente una fuente, o más de dos fuentes. Un filamento fino 12 es colocado en la solución para cargar la solución en cada punta de una pipeta 13 a un alto voltaje. A un voltaje específico determinado para cada arreglo de la solución y del aparato, la solución se suspendió en cada punta de la pipeta dirigida hacia el blanco puesto a tierra. Esta corriente 14 de materiales puede formar un filamento continuo, por ejemplo cuando el colágeno es el material, que al alcanzar el blanco puesto a tierra, recoge y se seca para formar una matriz tridimensional, ultra fina, interconectada de fibras del colágeno electroprocesado. Dependiendo de la reacción de condiciones, se puede formar un solo filamento continuo y depositar en una matriz no tejida.

Según lo observado anteriormente, combinaciones de técnicas y sustancias de electroprocesado se utilizan en algunas realizaciones. En referencia ahora a la Figura 4, puntas de la micropipeta 13 están cada uno conectadas con las micropipetas 10 que contienen diversos materiales o sustancias. Las micropipetas son suspendidas sobre un blanco puesto a tierra 11. Una vez más filamentos finos 12 se utilizan para cargar las soluciones. Una micropipeta produce una corriente de las fibras 14 del colágeno. Otra micropipeta produce un vapor de las fibras electrocentrifugadas 16 de PLA. Una tercera micropipeta produce un electroaerosol de células 17. Una cuarta micropipeta A produce un electrorrociado de Gotitas 18 del PLA. Aunque se unen las micropipetas a la misma fuente 15 del voltaje, el PLA está electrorrociado más bien que electrocentrifugado desde la cuarta micropipeta debida a la variación en la concentración del PLA en las soluciones. Alternativamente, las fuentes separadas de voltaje (no mostradas) pueden unirse a cada micropipeta para permitir el variar los métodos de electroprocesado que se utilizarán con la aplicación de diversos potenciales de voltaje.

Semejantemente, refiriéndose ahora a la Figura 5, el material de colágeno se puede aplicar como fibras de colágeno electrocentrifugado 19 a partir de una de las dos micropipetas, y electropulverizadas las gotitas 20 del colágeno desde la otra micropipeta, dispuesta a un ángulo diferente con respecto al sustrato blanco puesto a tierra 11. Una vez más se unen las puntas 13 de la micropipeta a las micropipetas 10 que contienen concentraciones que varían de materiales y producir así diversos tipos de corrientes de electroprocesado a pesar de usar la misma fuente del voltaje 15 a través de los filamentos finos 12.

Una corriente eléctrica mínima está implicada en este proceso, y, por lo tanto, el electroprocesado, en este caso electrogiro, no desnaturaliza el colágeno, y otros materiales que son electroprocesado, porque la corriente causa poco o nada de aumento de la temperatura en las soluciones durante el procedimiento. En el electroprocesado por fusión, hay un cierto aumento de la temperatura asociado al fundir el material. En tales realizaciones, se presta cuidado para asegurar que los materiales o las sustancias no son expuestos a las temperaturas que las desnaturalizarían, o de otra manera dañarlas o perjudicarlas.

Un proceso de electroaerosol se puede utilizar a producir gotitas del material electroprocesado, densas, mate como matriz. El proceso de electroaerosol es una modificación del proceso de electrogiro, porque el proceso del electroaerosol utiliza una concentración más baja de materiales o moléculas de la matriz que forman los materiales electroprocesados durante el procedimiento. En vez de producir un derrame de fibras o un solo filamento en la punta de la carga del inyector, se forma gotitas pequeñas. Estas gotitas entonces viajan desde la punta al sustrato para formar una matriz como esponja compuesta por gotitas fundidas. En algunas realizaciones, las gotitas son menos de 10 micrómetros de diámetro. En otras realizaciones, se puede producir una construcción compuesta por fibrillas con gotitas, como "granos en una secuencia". Las gotitas pueden extenderse en tamaño a partir de 100 nanómetros a 10 micrómetros dependiendo del polímero y de los solventes.

Según el proceso electrogiro descrito anterior, el proceso de electroaerosol puede ser usado realizando varias condiciones eficaces. El mismo aparato que se utiliza en el proceso de electrogiro, por ejemplo como el mostrado en la Figura 5 que se utiliza en el proceso de electroaerosol. Las diferencias de electrogiro incluyen la concentración de los materiales o de las sustancias que forman los materiales la matriz, puestos en la solución en el recipiente de la micropipeta y/o el voltaje usado para crear la corriente de gotitas.

Un experto en la técnica reconoce que cambios en la concentración de materiales o de sustancias en las soluciones requiere la modificación de los voltajes específicos para obtener la formación y fluir de gotitas de la punta de una pipeta.

El proceso de electroprocesado puede ser manipulado para satisfacer los requisitos específicos para cualquier uso del electroprocesado de las composiciones hechas con estos métodos. En una realización, las micropipetas pueden ser montadas en un marco que se mueva en el eje x, y, y z con respecto al sustrato puesto a tierra. Las micropipetas se pueden montar alrededor de un sustrato puesto a tierra, por ejemplo un mandril tubular. De esta manera, los materiales o las moléculas que forman los materiales, fluidas de las micropipetas, se pueden dirigir o modelar específicamente. Aunque las micropipetas se pueden mover manualmente, el marco sobre el cual se montan las micropipetas está preferiblemente controlado por un microprocesador y un motor que permitir que el patrón del colágeno que fluye sea predeterminado por una persona que hace una matriz específica. Tales microprocesadores y motores se conocen por un experto en la técnica. Por ejemplo, las fibras o las gotitas de la matriz pueden ser orientadas en una dirección específica, pueden ser extendidas en capas, o pueden ser programadas para estar totalmente al azar y no orientadas.

En el proceso de electrogiro, la corriente o las corrientes pueden ramificarse hacia fuera de las fibras. El grado de la ramificación se puede variar por muchos factores incluyendo, pero no limitándose al, voltaje, geometría de tierra, distancia de la punta al sustrato, diámetro de la micropipeta, y concentración de materiales o de los compuestos que forman los materiales del electroprocesado. Según lo observado, no todas las condiciones y los polímeros de la reacción pueden producir un verdadero multifilamento, en algunas condiciones se produce un solo filamento continuo. Materiales y varias combinaciones pueden también ser entregadas al campo eléctrico del sistema inyectando los materiales en el campo de un dispositivo que causará al aerosol. Este proceso puede ser variado por muchos factores incluyendo, pero no limitados a, voltaje (para ejemplo que se extiende desde cerca de 0 hasta 30.000 voltios), distancia de la punta de la micropipeta al sustrato (por ejemplo de 0-40 centímetro), la posición relativa de la punta de la micropipeta y el blanco (es decir sobre, abajo, a un lado, etc.), y por el diámetro de la punta de la micropipeta (aproximadamente 0-2 milímetros). Varias de estas variables se conocen bien por los expertos en la técnica de las telas de los textiles de las microfibras obtenidas por electrogiro.

La geometría del blanco puesto a tierra puede ser modificada para producir una matriz deseada. Variando la geometría de tierra, por ejemplo teniendo una planar o linear de puntos múltiples a tierra, la dirección de flujo de los materiales se puede variar y modificar para requisitos particulares a un uso particular. Por ejemplo, el sustrato blanco puesto a tierra comprende una serie de líneas paralelas que se puede utilizar para orientar los materiales de electrocentrifugado en una dirección específica. El blanco puesto a tierra puede ser un mandril cilíndrico por el que esté formada una matriz tubular. Preferiblemente, la tierra es una superficie variable que se puede controlar por un microprocesador que dicte una geometría de tierra específica que se programa en éste. Alternativamente, por ejemplo, la tierra puede ser montada en un marco con el cual se mueve en los planos de x, de y, y de z respecto a un colágeno que fluye de la punta inmóvil de la micropipeta.

El sustrato, sobre el cual los materiales son fluidos, rociados o pulverizados, puede ser el blanco puesto a tierra en sí mismo o ésta se puede colocar entre la punta de la micropipeta y el blanco puesto a tierra. El sustrato puede estar específicamente formado, por ejemplo en forma de una guía de nervio, parche dérmico, envoltura facial, o un injerto vascular para subsiguiente utilizar *in vivo*. Las composiciones del electroprocesado pueden ser formadas para corresponder a un defecto o un sitio que se llenará. Ejemplos incluyen un sitio del cual se ha retirado un tumor, sitio de lesión en la piel (corte, sitio de biopsia, orificio u otro defecto) y pedazo desaparecido o roto de hueso. Las composiciones del electroprocesado pueden ser formadas en forma útil para la entrega de sustancias, por ejemplo, parche dérmico, una cápsula para ingestión, un implante intraperitoneal, implante subdérmico, revestimiento interior o exterior de un stent, válvula cardiovascular, tendón, córnea, ligamento de una prótesis dental, implante de músculo, o una guía de nervio. El electroprocesado permite gran flexibilidad y permite modificar la construcción para requisitos particulares a virtualmente cualquier forma necesaria. Muchas matrices son suficientemente flexibles para permitir que se formen virtualmente en cualquier forma. Al formar matrices, porciones de la matriz se pueden sellar una a otra por, por ejemplo, sellado con calor, lacre químico, y uso de presión mecánica o de una combinación de éstas. Un ejemplo del sellado con calor es el uso de las técnicas de reticulación, discutidas en la presente solicitud para formar reticulación en medio dos porciones de la matriz. El lacre puede también cerrar una abertura en una matriz formada. La sutura puede también ser utilizado para unir porciones de matrices una a otra, o cerrar una abertura en una matriz. Ha sido observado que la inclusión de polímeros sintéticos realza la capacidad de matrices de ser soldadas en caliente.

Otras variaciones de electroprocesado, particularmente el electrogiro y el electroaerosol incluyen, pero no se limitan a las siguientes:

1. Usar diferentes soluciones para producir dos o más diversas fibras o gotitas simultáneamente (fibra o conjunto de gotitas). En este caso, el único componente de las soluciones se puede mantener en recipientes separados.

2. Usar soluciones mezcladas (por ejemplo, materiales junto con sustancias tales como células, factores de crecimiento, o ambos) en el mismo recipiente(s) para producir las fibras o gotitas compuestas por los materiales del electroprocesado así como una o más sustancias ("mezcla" de composiciones de fibras). El material no biológico pero biológico compatible se puede mezclar con una molécula biológica.

3. Utilizando potenciales múltiples aplicados a diferente soluciones o la misma solución.

4. Proporcionar dos o más blancos puestos a tierra, geométricamente diferentes (es decir, pantallas pequeña y grande).

5. Colocar el molde o mandril u otro blanco no aterrado delante del blanco puesto a tierra.

6. Aplicar agentes tales como Teflon sobre el blanco para facilitar el retiro de los materiales del electroprocesado del blanco (es decir hacer el material más deslizante de modo que los materiales del electroprocesado no se peguen al blanco).

7. Formación del material electroprocesado que incluye materiales aplicados usando métodos electroprocesado múltiples. Por ejemplo, fibras del electrocentrifugado y gotitas del electroaerosol en la misma composición puede ser beneficioso para algunos usos en la estructura deseada. Esta combinación de fibras y gotitas puede ser obtenida usando la misma micropipeta y solución, y variar la carga eléctrica; variar la distancia del sustrato blanco puesto a tierra; variar la concentración del polímero en el recipiente; usar micropipetas múltiples, algunas para las fibras que fluyen

y otras para gotitas que fluyen; o cualesquiera otras variaciones al método previsto por los expertos en esta técnica. Las fibras y las gotitas se pueden acomodar en capa, o mezclar juntas en la misma capa. En los usos que implican las micropipetas múltiples, las micropipetas se pueden disponer en la misma o diversas direcciones, y distancias con referencia al blanco.

8. Usando blancos múltiples.

9. Rotar blancos o mandriles durante el electroprocesado causa que los materiales del electroprocesado tengan una polaridad o una alineación específica.

Todas estas variaciones se pueden hacer por separado o en combinación para producir una variedad amplia de materiales y sustancias electroprocesadas.

Las diversas características de los materiales electroprocesados se pueden ajustar de acuerdo con las necesidades y especificaciones de las células que se suspenderán y crecerán dentro de éstos. La porosidad, por ejemplo, se puede variar de acuerdo con el método de fabricación de los materiales o matriz electroprocesada. El electroprocesado de una particular matriz, por ejemplo, se puede variar por el tamaño de la fibra (gotita) y la densidad. Si las células que se crecerán en la matriz requieren considerable flujo de nutriente y expulsión del residuo, entonces se puede crear una matriz floja. Por otro lado, si el tejido que se hará requiere de un entorno muy denso, entonces se puede diseñar una matriz densa. La porosidad puede ser manipulada mezclando las sales u otros agentes extractables. Quitar la sal dejará orificios de tamaños definidos en la matriz.

En una realización para el colágeno electroprocesado, los intervalos aproximados apropiados son: voltaje 0-30.000 voltios; pH 7.0 a 8.0; temperatura 20 a 42C; y mg/ml del colágeno 0 a 5. Una realización para electroprocesado del colágeno utiliza el colágeno en una concentración de 0.008 g/1.0 ml de extractos ácidos del tipo de colágeno I (calfskin) disuelto en HFIP, electroprocesado desde una jeringuilla a 25 kilovoltios en una distancia del blanco de 127 milímetros, y una velocidad de la bomba de la jeringuilla de 10 ml/h. En esta concentración el colágeno no exhibió ninguna evidencia de electrogiro (formación de la fibra) y, sin importar el voltaje de entrada, la solución del polímero formada por gotitas electroprocesadas y fugas por la punta de la jeringuilla. Una realización para la elastina utiliza la elastina proveniente del Ligamento nuchal disuelto en 70% isopropanol/ agua en una concentración de 250 mg/ml. La solución después se agita para asegurar el mezclado y se carga en una jeringuilla de 1 ml. Una vez que esté cargada, la jeringuilla se coloca en una bomba de un sistema de la jeringuilla a un caudal de 10 ml/h. Un mandril se coloca a 7 pulgadas de la punta de la jeringuilla, y se rota a una velocidad seleccionada. La bomba y la fuente de alimentación son entonces giradas y el voltaje se fija a 24.000 kilovoltios. Las matrices del colágeno electroprocesado de propiedades que varían se pueden dirigir cambiando el pH, fuerza iónica (e.g. adición de sales orgánicas), o adición adicional de substratos poliméricos o materiales catiónicos.

Métodos de combinar sustancias con materiales electroprocesados

Las sustancias se pueden combinar con colágeno electroprocesado por una variedad de medios. En algunas realizaciones, la sustancia comprende moléculas que se liberarán de, o contenidas dentro, del colágeno electroprocesado y el otro material, y por lo tanto se agrega a, o incorpora dentro de, la matriz del material electroprocesado. Las sustancias se pueden mezclar en los solventes portadores, o soluciones de los materiales para electroprocesado. En este sistema los materiales se pueden mezclar con varias sustancias y electroprocesado directamente. La composición resultante comprende una matriz electroprocesada y la sustancia puede tópicamente ser aplicada a un sitio específico y las sustancias, liberadas del material en función de la ruptura que experimenta el material en el entorno circundante. Las sustancias se pueden también liberar de las composiciones del electroprocesado de la presente invención por difusión.

El estado del colágeno electroprocesado y otro material electroprocesado en lo referente a las sustancias incorporadas se dictan por, y se pueden controlar con, la química del sistema y varía basado en la selección de los materiales de la matriz, del(os) solvente(s) usado(s), y de la solubilidad de los materiales de la matriz en esos solventes. Estos parámetros pueden ser manipulados para controlar la liberación de las sustancias (u otros elementos) en el entorno circundante. Si las sustancias que se incorporarán en electroprocesado el material no son miscibles con el material, pueden ser utilizados recipientes separados de solventes para los diversos componentes. Así, sustancias con las cuales no son miscibles las soluciones del colágeno se pueden mezclar en los solventes portadores para otros materiales a ser electroprocesados junto con el colágeno desde, por ejemplo, recipientes separados. El mezclarse en tal realización ocurre antes de, durante, y/o después de la deposición en el blanco, o una combinación de éstas. Debe ser entendido que las sustancias se pueden encerrar, o difundir dentro del material electroprocesado, enlazado a un material antes de que el material experimente el electroprocesado, o limitar a sitios específicos dentro del material de la matriz.

En una variación de esta realización, la sustancia es una partícula o un agregado que comprende una matriz de compuestos o polímeros tales como alginato que, alternadamente, contienen unos o más compuestos que serán liberados del material electroprocesado. Sustancias tales como fármacos o células se pueden combinar con el alginato, por ejemplo, al combinar una suspensión de fármaco o un particulado del fármaco en el alginato en presencia de calcio. El alginato es un carbohidrato que forma los agregados cuando está expuesto al calcio. Los agregados se pueden utilizar para atrapar los fármacos. Los agregados se disuelven en un cierto plazo, liberando las sustancias atrapadas en alginato. Las partículas, que entonces se incorporan dentro de la matriz electroprocesada más grande, son biológicamente compatibles pero relativamente estables y se degradarán gradualmente. En algunas realizaciones, electroprocesado los

5 materiales se asemejan a una cadena de perlas. Ésta es a aspecto físico del electroprocesado. Si la concentración de los materiales a ser electroprocesados es baja, ocurre el electrorrociado de granos. Cuando la concentración aumenta hay algunos granos y algunas fibras. Un aumento ulterior en la concentración de los materiales a ser electroprocesados conduce a la predominancia, o sólo fibras. Por lo tanto, el aspecto de las perlas en una secuencia es una fase de transición.

10 Si una sustancia no se une o interactúa con el material electroprocesado de la matriz, el fármaco puede ser atrapado en pelotillas de PGA o de PLA, o sometido al electroaerosol para producir pelotillas en el material del electrocentrifugado. Varias fármacos (por ejemplo, penicilina) pueden ser atrapados de este modo. Las pelotillas o las gotitas del material del electroaerosol que contienen la sustancia comienzan a disolverse después de su administración para entregar el material atrapado. Algunos agentes se pueden unir a polímeros naturales o sintéticos por un enlace covalente, antes de o después del giro.

15 En otras realizaciones, la sustancia es electroprocesada. Las sustancias pueden ser electroprocesadas desde el mismo orificio que el colágeno y/u otros materiales, o de diferentes orificios. Sustancias pueden también ser sometidas a igual o a un diferente tipo de electroprocesado como el material. Una molécula puede enlazarse al colágeno electroprocesado u a otros materiales en la matriz de colágeno directamente, o con una molécula que tiene afinidad para el material. Un ejemplo de esta realización implica sustancias de polipéptidos vinculadas a la heparina, que tiene afinidad al colágeno. Esta realización permite que las velocidades de liberación sean controladas controlando el índice de degradación del material, para ejemplo por interrupción enzimática o hidrolítica.

25 En otras realizaciones, el colágeno electroprocesado puede encerrar la sustancia durante el proceso de electrodeposición. Esto puede ser logrado disponiendo las sustancias en el espacio entre la fuente de la corriente electroprocesada y el blanco para el material electroprocesado. Colocación de tales sustancias en el espacio entre las sustancias entre la fuente y el blanco puede ser logrado por un número de métodos, incluyendo, pero no limitado a, suspendiendo en el aire u otros gases, goteo, rociado, o electroprocesado de las sustancias. Las sustancias pueden estar presentes en ese espacio adentro, por ejemplo, en forma de particulado, aerosol, coloidal, o del vapor. En estas realizaciones, el material o la matriz electroprocesada encerrarán físicamente las sustancias. Esta realización se puede también utilizar para encapsular partículas más grandes, tales como células, partículas o tabletas mayores. Por ejemplo, si una tableta se coloca en la matriz a medida que ésta se forma, la tableta es rodeada por la matriz. Si un objeto pequeño, se coloca a través de la matriz cuando ésta se forma, o se coloca en un aerosol dentro de la matriz, el objeto puede ser atrapado entre los filamentos, dentro de filamentos, o unido al exterior de los filamentos. Por ejemplo, suspendiendo objetos en una solución o dentro de una matriz, los objetos pueden convertirse en parte de una matriz electrocentrifugada durante la fabricación de los filamentos. Alternativamente, la encapsulación puede ocurrir introduciendo sustancias dentro o a través de la corriente de material de una matriz a medida que la matriz se forma. Los objetos así se rodean por una matriz del material electroprocesado. Estas realizaciones se pueden utilizar para incorporar dentro de una matriz de las sustancias que no son solubles y/o son demasiado grandes para formar una suspensión en el solvente usado para la producción del material. Para las sustancias en forma de niebla o vapor, el controlar la distribución del vapor y composición de sustancias en el espacio entre la fuente y el blanco, se puede utilizar para alterar las propiedades físicas y químicas del material electroprocesado y el patrón de distribución de las sustancias en el material electroprocesado. Para todas las realizaciones precedentes, las sustancias se pueden colocar en material electroprocesado en cápsulas, vesículas, u otras contenciones para liberación subsiguiente. Puesto que el solvente portador se evapora a menudo en la técnica de electroprocesado a medida que se forma el material electroprocesado, tal como un filamento, las sustancias pueden ser colocadas en la matriz electroprocesada y la toxicidad del solvente se reduciría o se eliminaría grandemente.

50 En muchas realizaciones la sustancia comprende células. Las células se pueden combinar con matriz electroprocesada de colágeno por cualesquiera de los medios conocidos anteriormente para combinar objetos pequeños en una matriz. Las células pueden, por ejemplo, suspenderse en la solución o el otro líquido que contiene el colágeno, dispuesto en el área entre las soluciones y blanco, o entregado a un blanco o a un sustrato de una fuente separada antes, durante, o después del electroprocesado. Las células se pueden gotear a través de la matriz, sobre la matriz, a medida que ésta se deposita en el blanco o suspende dentro un aerosol como sistema de entrega de las células al material electroprocesado. Las células se pueden entregar de esta manera mientras que se está formando la matriz. Como ejemplo, los fibroblastos cardiacos fueron suspendidos en fosfato tamponado salino (PBS) en una concentración de aproximadamente un millón células por mililitro. La suspensión de células fue colocada dentro de un recipiente de un aerógrafo del tipo Paasche. Al ensayo de eficacia de usar este tipo de dispositivo para entregar las células, la suspensión de la célula fue rociada inicialmente sobre un plato de cultivo de 100 milímetros. Algunas de las células sobrevivieron, unieron a las placas y distribuidas fuera sobre el sustrato. En un segundo el ensayo, las placas de cultivo fue alejado del cepillo del aire, y el experimento fue repetidos. Las células fueron observadas en el plato. Aparecían ser aplanadas por el impacto y fueron diseminadas parcialmente hacia fuera de la superficie del sustrato. Los medios de cultivo fueron agregados a las placas y las células fueron puestas en una incubadora. Después de una hora de cultivo, las células fueron examinadas otra vez, y muchas fueron encontradas que se habían separado hacia fuera adicionalmente sobre el sustrato. Estos resultados demuestran que un simple dispositivo aerógrafo se puede utilizar para poner las células en una gotita del aerosol y entregarlas a pedido a una superficie o a un sitio del interés. La viabilidad de la célula puede ser mejorada restringiendo esta técnica a las células que sean resistentes a las fuerzas de esquileo producidas en esta técnica, desarrollando una suspensión de la célula con aditivos que amortiguan las células o la refinación del dispositivo de aerosol para producir un flujo más laminar. Además, dirigir el aerosol de células sobre los materiales de la matriz ya que la matriz es formada en el espacio entre el blanco o el mandril, y la fuente(s) de las moléculas, que

están siendo electroprocesadas, y produce el efecto de amortiguar las células. Aunque no se desea ser limitado por la declaración siguiente, se cree que las células serán atrapadas en la irrupción de filamentos u otros cuerpos producidos por electrogiro o electroprocesado y atraído sobre el mandril. Esta situación puede ser menos traumática a las células que directamente la rociadura de las células sobre una superficie sólida.

5

En algunas realizaciones, las células se agregan cualquiera sea antes o al mismo tiempo que el colágeno, y otros materiales que son electroprocesado. De esta manera, las células se suspenden a través de la matriz tridimensional.

10 Las células se pueden agregar ya que los filamentos son producidos en el espacio entre el blanco y la fuente del polímero. Esto es realizado goteando las células sobre el blanco, goteando las células en la matriz electroprocesada de colágeno a medida que ésta se forma, creando el aerosol de las células sobre la matriz de colágeno, o sobre el blanco, o por electrorrociado de células sobre la matriz de colágeno cuando se condensa y forma cerca, o en, del blanco puesto a tierra. En otra realización, se rocían o gotean las células en el material o la matriz electroprocesadas durante su formación, y de tal modo se atrapan cuando el material electroprocesado cruza la abertura de aire en medio de las
15 soluciones y el blanco de la fuente.

Un método alternativo para entregar las células al colágeno electroprocesado implica entrega por electroaerosol de las células. Las células se pueden depositar por rociadura electrostática a, por ejemplo, 8 kV directamente sobre platos estándar de poliestireno para cultivos, sugiriendo que la rociadura electrostática de células es un enfoque viable.
20 Fibroblastos cardiacos dentro soluciones salinas tamponadas de fosfato (PBS) han sido sometidas a electroaerosol a una diferencia de potencial hasta de 20 kilovoltios. En otro ejemplo, Las células de Schwann (rata) fueron plateadas en unas placas de Petri por métodos convencionales después de un día. Células de Schwann fueron también electrorrociadas sobre unas placas de Petri con una placa metálica a tierra detrás de las placas a 10 kV después de un día. Ambas las muestras crecieron hasta casi confluencia después de una semana. El enfoque de electroaerosol proporciona algunas ventajas diferentes. Primero, las fuerzas de esquileo producidas durante la fase de entrega (es decir, la producción del aerosol) parece a ser mucho menos traumática a las células. En segundo lugar, la dirección del aerosol puede ser controlada con un alto grado de la fidelidad. Esencialmente el aerosol de la célula se puede pintar sobre la superficie de interés. Esto permite que la célula sea apuntada a los sitios específicos. En la entrega del electroaerosol, se suspenden las células en medios apropiados (e.g. medios de cultivo, sales fisiológicas, etc.) y cargadas a un voltaje,
30 y dirigidas hacia un blanco puesto a tierra. Este proceso es muy similar al usado en el electroprocesado, el electrogiro particularmente. Produce una niebla fina de las células atrapadas dentro de las gotitas cuando se producen y se dirigen al blanco puesto a tierra.

Las células se pueden entregar usando las técnicas del aerosol y el electroaerosol sobre el colágeno electroprocesado. El electroaerosol de células se puede entregar en paralelo (es decir, al costado) del material electroprocesado o desde un sitio separado. Las células se pueden entregar al torrente de filamentos o partículas producidas dentro de la abertura de aire en el proceso de electrodeposición, o diseñado al blanco. Las células y el material electroprocesado también pueden ser entregados en una secuencia que se alterna al blanco, es decir electrodeponer el material, someter al aerosol las células, electrodeponer material, someter al aerosol las células. Esto permite en forma discreta
40 acomodar en capas la construcción, en capas separadas. Además, una fuente del vapor puede ser proporcionada a condición de que dirija el agua sobre el mandril del blanco para recoger las células. Proporcionar esta humedad mejora la viabilidad de las células al guardar las células de deshidratarse durante el proceso. Las células pueden ser añadidas al colágeno electroprocesado en cualquier momento, o desde cualquier orientación en cualquier estrategia de uso del aerosol. De nuevo, la ventaja del proceso en general es que ese colágeno, por ejemplo, se recoge en un estado seco en el mandril blanco. Por consiguiente, aunque algunos solventes para el colágeno pueden ser tóxicos, se pierden del sistema antes de que los filamentos se recojan en el blanco.
45

Las células se pueden también atrapar dentro de un portador anteriormente a producir un aerosol. Por ejemplo, las células pueden ser encapsuladas dentro de un material semejante del alginato. Las células encapsuladas se protegen
50 físicamente contra esquileo y trauma durante el proceso. Las células entregadas en esta forma al material electroprocesado tendrán una viabilidad más alta cuando sean rociadas o sembradas vía electrostática.

El colágeno electroprocesado puede también ser entregado directamente a una localización deseada. Por ejemplo, el material electroprocesado se puede producir directamente sobre una herida de piel, con o sin sustancias tales como
55 moléculas o células. Las células o los materiales adicionales pueden entonces entregar como aerosol sobre o en el sitio de la herida. Otros sitios quirúrgicos pueden también ser favorables para la entrega de los materiales usando varias técnicas o combinaciones de electrodeposición de estas por estos métodos.

Materiales activos magnética y eléctricamente pueden ser electroprocesados, incluyendo, por ejemplo, la preparación fibras de polímeros conductores producidos por electrogiro. Además, los polímeros conductores pueden ser preparados en *in situ* en la matriz, por ejemplo, por incorporación de un monómero (e.g., pirrol), seguido por el tratamiento con un iniciador de la polimerización y un oxidante (e.g., FeCl_3). Finalmente, los polímeros conductores se pueden crecer en el material después del electroprocesado usando un conductor recubierto por una matriz como el ánodo para la síntesis electroquímica de, por ejemplo, polipirrol o polianilina. El colágeno u otros materiales a ser
60 electroprocesado pueden ser agregados a una solución acuosa del pirrol o la anilina para crear un polímero conductor en el ánodo con los compuestos atrapados formadores del material electroprocesado, los cuales puede entonces ser tratado con otros compuestos para permitir que ocurra la formación del material.
65

Más de un método para combinar las sustancias con el colágeno electroprocesado puede ser utilizado dentro una sola realización o uso. Combinar métodos puede ser especialmente útil en las realizaciones en las cuales el colágeno electroprocesado liberará una o más sustancias, y más aún cuando las sustancias liberadas se considera que tienen una cinética compleja de liberación.

5

Formas de los materiales y las matrices electroprocesadas

La presente invención también proporciona un método para fabricar una matriz extracelular que contiene colágeno, que tiene una forma predeterminada. El método incluye preseleccionar un molde adaptado para hacer una forma predeterminada y llenar el colágeno, o las moléculas formadoras del colágeno usando técnicas de electroprocesado. En otros ejemplos de realizaciones, el método comprende preseleccionar un molde o un mandril adaptado a hacer una forma predeterminada, en donde el molde comprende un sustrato blanco puesto a tierra, y la forma de la matriz es dictada por las dimensiones externas del mandril. Entonces, unas o más soluciones que comprenden colágeno eléctricamente cargado, o moléculas capaces de formar el colágeno, fluyen sobre el sustrato blanco puesto a tierra en condiciones eficaces para depositar el colágeno en sustrato para formar la matriz extracelular que tiene una forma predeterminada. El colágeno fluido sobre el sustrato comprende fibras. La matriz electrocentrifugada formada que tiene una forma de sustrato entonces se le permite curar, y retirada del mandril. El sustrato puede ser formado específicamente, por ejemplo en la forma de una guía de nervios, parche de piel o de músculo, envoltura facial, disco vertebral, menisco de la rodilla, ligamento, tendón, o un injerto vascular para uso subsiguiente *in vivo*. La matriz de colágeno puede ser formada para ajustar a un defecto o un sitio que se rellenará. Por ejemplo un sitio de donde se ha retirado un tumor, o un sitio de lesión en la piel (corte, sitio de biopsia, orificio u otro defecto), o para reconstruir o sustituir un pedazo de hueso, desaparecido o roto. El electroprocesado permite gran flexibilidad y permite modificar la construcción para requisitos particulares a virtualmente cualquier forma necesitada. Algunos ejemplos preferidos incluyen una forma cilíndrica, una forma oval aplanada, una forma rectangular de sobre (como un sobre de correos), o cualquier otra forma deseada. El colágeno se puede formar virtualmente de cualquier forma. Las formas complejas tales como órganos “chambré” pueden formarse. La forma geométrica tridimensional total de la plataforma es determinada por el último diseño y el tipo de tejido a ser biodiseñado.

Varios métodos existen para preparar un molde específicamente formado. Por ejemplo, un tipo particular de órgano o tejido que se desea ser substituido tiene una forma específica, por ejemplo un parche dérmico para ajustar un sitio de biopsia o un área grande del cuero cabelludo que sigue a un área amplia retirada después de descubrir un melanoma maligno. Se reproduce esa forma y crea dentro de un molde diseñado para ser imitar a esa forma. Este molde puede ser llenado por electrodeposición de colágeno en el molde. De esta manera, la matriz del colágeno puede exactamente imitar la forma del molde. Crear una matriz de colágeno extracelular que tiene una forma específica puede ser muy importante en crear un nuevo órgano. La forma de la matriz puede inducir que las células sembradas en la matriz del colágeno se distinguen de una manera específica. Factores de crecimiento u otras sustancias pueden ser incorporados según lo discutido en todos los sitios en la presente solicitud. Esto puede dar lugar a un órgano o tejido semejante más eficaz, más natural, el que es creado. Se pueden también hacer matrices huecas a ser rellenas por los materiales deseables tales como células, o sustituir los órganos o las estructuras huecas. Es deseable para una plataforma cilíndrica formada por bioingeniería o de cualquier otra forma de construcción, en la cual se desea un área incluida, poder ser utilizada una sutura, pegamento, grapa o sellado en caliente, o un cualquier otro método, el sellar un extremo de la plataforma de bioingeniería. Esto da lugar a una plataforma hueca que sea cerrada en un extremo y se abra en el otro. El colágeno electrodepositado que contiene la plataforma se puede ahora llenar con las células u otros materiales, o las células u otros materiales pueden ser colocados en la superficie externa de la construcción. Por ejemplo, una mezcla del colágeno del procedimiento de electroprocesado, u otros materiales tales como células, o moléculas tales como los fármacos o los factores de crecimiento se pueden poner dentro de la plataforma. El extremo libre y abierto del sobre que se uso para llenar la construcción del material puede ser suturado, pegado o soldado en caliente, cerrado para producir una plataforma incluida de bioingeniería. El mezclar células con el material durante electroprocesado resultados en que las células son distribuidas a través de la matriz de modo que no tengan que emigrar dentro del gel. Según lo observado anteriormente, sin embargo, se ha demostrado que el colágeno electroprocesado promueve la infiltración.

Una formación adicional se puede lograr por el proceso manual de las matrices formadas. Por ejemplo, las matrices múltiples formadas se pueden suturar, sellar, grapar, o de otra forma unir la una a otra para formar una forma deseada. Alternativamente, la flexibilidad física de muchas matrices permitir que sean formadas manualmente a una estructura deseada.

Patrones de la distribución para el colágeno electroprocesado y otros materiales y sustancias electroprocesadas

Muchas realizaciones de la presente invención implican medios para manipular el patrón o la distribución del colágeno electroprocesado y/o las sustancias dentro del material electroprocesado. Por ejemplo, un blanco electroprocesado se puede también cargar específicamente o el blanco puesto a tierra a lo largo de un patrón preseleccionado de modo que los materiales electroprocesados se dirijan y fluyan hacia el blanco en direcciones o distribuciones específicas sobre el blanco o un sustrato. El campo eléctrico se puede controlar por un microprocesador para crear una matriz que tenga una geometría deseada. El blanco y el inyector de electroprocesado, o los inyectores pueden ser móviles con respecto uno a otro, y al blanco de tal modo que permite control adicional sobre la geometría del material electroprocesado que se formará. En las realizaciones en las cuales las sustancias son electroprocesado, esta manipulación también permitirá el control de la distribución de sustancias dentro de los materiales electroprocesados.

Por ejemplo, la matriz electroprocesada del colágeno puede ser preparada en un mandril, y las sustancias desde un recipiente separado se pueden rociar, gotear, electroprocesar en un patrón específico sobre la matriz existente. Esto puede también ser logrado simultáneamente por electrorrociado de una matriz a partir de una fuente y de una sustancia de otra fuente. En este ejemplo la fuente de la matriz puede ser inmóvil y la fuente de la sustancia se mueve con respecto al mandril blanco.

Otras características que permiten el establecimiento de tal un patrón incluyen, pero no se limitan a, la capacidad de depositar capas múltiples del mismo o de diversos materiales, combinar diversos métodos de electroprocesado, el uso orificios múltiples con diversos contenidos para electroprocesado, y la existencia de numerosos métodos para combinar sustancias con los materiales. Por ejemplo, un gradiente de sustancias se puede crear a lo largo del material electroprocesado. En las realizaciones en las cuales la matriz se forma como una construcción cilíndrica, por ejemplo, el gradiente se puede preparar a lo largo del eje largo de una construcción (de izquierda a derecha), o del eje perpendicular (de adentro a fuera). Esta configuración se utiliza para proporcionar un gradiente químico para dirigir el movimiento de células dentro de un sitio especificado. Así, por ejemplo, en algunas realizaciones en que agentes neovasculares son preparados en un gradiente perpendicular a lo largo de una construcción basada en colágeno, los agentes se pueden concentrar en la superficie dorsal de una hoja del material. El lado ventral puede ser puesto contra una herida y la concentración más alta de materiales angiogénicos en la superficie dorsal de la construcción aumentará la migración de células endoteliales a través del material electrocentrifugado. Una vez más realizaciones con patrones complejos pueden utilizar un microprocesador programado con los parámetros específicos para obtener un patrón específico, preseleccionado y electroprocesado de uno o más polímeros electroprocesados, opcionalmente con unas o más sustancias.

Procesado adicional de colágeno electroprocesado

Materiales

El colágeno y otros materiales electroprocesados se pueden procesar más a fondo para afectar varias características. En algunas realizaciones electroprocesado el material es reticulado. En algunas realizaciones, la reticulación alterará, por ejemplo, la velocidad en la cual el material electroprocesado degrada, o la velocidad en la cual una sustancia contenida en la matriz electroprocesada es liberada del material electroprocesado aumentando la rigidez estructural, y retrasando la disolución subsiguiente del material electroprocesado. El colágeno electroprocesado y otros materiales se reticulan simultáneamente con su formación, formándolos en presencia de agentes de reticulación o tratados con agentes de reticulación después de la electrodeposición. Puede ser utilizada cualquier técnica conocida por un experto en la técnica para la reticulación de los materiales. Los ejemplos de técnicas incluyen el uso de agentes de reticulación y el uso de ciertas radiaciones para reticulación. Ejemplos de agentes de reticulación que trabajan con unas o más proteínas incluyen pero no se limitan a los agentes de condensación tales como los aldehídos e.g., glutaraldehído, carbodiimida EDC (1-etilo-3-(amino-propil-dimetil-3)), materiales fotosensibles que reticulan por la exposición a longitudes de onda específicas de la luz, tetróxido de osmio, hidrocloreuro del carbodiimida, y NHS (n-hidroxi-succinimida), y Factor XIIIa. El glutaraldehído es un deseable agente de reticulación para el colágeno. La radiación ultravioleta es un ejemplo de uso de la radiación en algunas realizaciones para reticular los materiales de la matriz. Los materiales naturales pueden ser reticulados con otros materiales naturales. Por ejemplo, el colágeno puede ser reticulado y o estabilizado por la adición de fibronectina y o del sulfato de heparina. Para algunos polímeros se puede utilizar el calor para alterar la matriz y los elementos de reticulación de la matriz, fundiendo los componentes adyacentes de la construcción. Como otro ejemplo, el colágeno puede ser reticulado con los procesos naturales mediados por los elementos celulares. Por ejemplo, el colágeno electrocentrifugado puede ser reticulado por la cascada enzimática de la lisil-oxidasa. Los polímeros sintéticos se pueden también solubilizar parcialmente para alterar la estructura del material, por ejemplo una breve exposición de algunos compuestos sintéticos a los alcoholes o a las bases puede parcialmente disolver y recocer los filamentos adyacentes juntos. Algunos polímeros pueden ser reticulados usando la fusión química o técnicas de la fusión por el calor. Los polímeros sintéticos generalmente puede ser reticulados usando la radiación de alta energía (e.g., haces electrónicos, rayos gammas). Éstos trabajan típicamente por la creación de radicales libres en la espina dorsal del polímero que entonces se junta, produciendo acoplamiento reticulados. Los radicales libres de la espina dorsal se pueden también generar vía peróxidos, compuestos azo, cetonas, arilos y otros compuestos que producen radicales en presencia del calor o de la luz. Reacciones de oxidación - reducción que producen radicales (e.g., peróxidos en presencia de sales de metales de transición) se pueden también utilizar. En muchos casos, grupos funcionales en las espinas dorsales del polímero o las cadenas laterales se pueden hacer reaccionar para obtener acoplamiento de reticulación. Para el ejemplo, los polisacáridos se pueden tratar con los diacil-cloruros para formar a los acoplamiento de reticulación diéster. La reticulación puede también ocurrir después del uso de una matriz, cuando sea deseable. Para el ejemplo, una matriz aplicada a una herida puede ser reticulada después de su aplicación para reforzar la adherencia de la matriz a la herida.

Un agente de reticulación preferido para electroprocesado del colágeno es el glutaraldehído. En algunas realizaciones usando un colágeno de Tipo I/colágeno Tipo de III/elastina (45: 35: 20) matriz, la exposición de la matriz al vapor de glutaraldehído en condiciones apropiadas durante por lo menos cerca de 10 minutos proporcionó un grado satisfactorio de reticulación. En general intervalos más largos de reticulación del glutaraldehído aumenta la estabilidad de la matriz, pero reduce la infiltración celular. Un intervalo deseable es la exposición entre cerca de 10 y cerca de 20 minutos. La exposición fue realizada preparando un compartimiento de gas hecho colocando placas de Petri de 10 cm² estéril con su tapa retirada en el centro de placas de Petri de 35 cm² con su parte superior restante. Aproximadamente 4 ml de la solución del glutaraldehído al 3% fueron colocados en las placas más pequeñas, y los soportes de colágeno

colocados en las placas más grandes hacia los bordes. La solución al 3% del glutaraldehído fue hecha mezclando el glutaraldehído al 50% con agua destilada, y el búfer de cacodilato de sodio de 0.2 M.

Sustancias adicionales se pueden aplicar al material electroprocesado después de la formación, por ejemplo empapando el material electroprocesado en la sustancia o una solución que contiene la sustancia, o rociando la solución o la sustancia sobre el material electroprocesado. Matrices de colágeno puestas en contacto con las células *in vitro* o *in vivo*, será infiltradas por las células que emigran en la matriz. Se puede utilizar cualquier método *in vitro* para sembrar matrices con las células. Los ejemplos incluyen por ejemplo, colocación en un biorreactor o uso de técnicas de siembra células electrostáticas, por ejemplo los divulgados en las patentes de ESTADOS UNIDOS No. 6.010.573 a Bowlin *et al.*, patente No. 5.723.324 a Bowlin *et al.*, y patente No. 5.714.359 a Bowlin *et al.* Las matrices electroprocesadas pueden también ser esterilizadas usando métodos conocidos de esterilización. Por ejemplo, el material electroprocesado se puede sumergir en una solución de alcohol al 70%. Otro método preferido de esterilización es el procedimiento de ácido peracético de esterilización, conocido para tejidos basados colágeno.

El procesado físico del material electroprocesado formado es también posible. La matriz electroprocesado puede ser molida a un polvo, o ser molida y ser preparada como un gel hidratado integrado por fibrillas congregadas en bandas. En algunas realizaciones, las fuerzas mecánicas, tales como compresión, aplicadas al material electroprocesado aceleran la ruptura de la matriz alterando la estructura cristalina del material. La estructura de la matriz es así otro parámetro que se puede manipular para afectar la cinética de la liberación. Poliuretanos y otros materiales elásticos tales como poli(etileno-co-acetato de vinilo), siliconas, y polidienos (e.g., poliisopreno), policaprolactona, ácido poliglicólico, y los polímeros relacionados son ejemplos de materiales cuya velocidad de liberación se puede alterar por tensión mecánica.

Transformación ulterior de tejidos diseñados conteniendo colágeno electroprocesado

Una vez el tejido electrodiseñado conteniendo colágeno electroprocesado y las células están montadas, el tejido se puede insertar en un recipiente. Alternativamente, la estructura se puede poner en un cultivo para reforzar el crecimiento de la célula. Diversos tipos de nutrientes y de factores de crecimiento pueden ser agregados a una cultivo (o administrado a un recipiente) para promover un tipo específico de crecimiento del tejido diseñado. En un ejemplo, específicamente en conexión con la preparación de un tejido diseñado del músculo, el tejido electrodiseñado que contenía el colágeno y las células se puede filtrar mecánica o pasivamente o eléctricamente preacondicionado (estimulando eléctricamente las células sensibles, por ejemplo las células del músculo cardíaco y esquelético se contrae por despolarización eléctrica) para estimular la alineación de las células para formar un implante más funcional del músculo. La aplicación de la tensión también aumenta la fuerza extensible del implante. Por ejemplo, la contracción o el estiramiento forzados de células conducirán a la hipertrofia como si fueran sometidas a estiramientos. En un parche dérmico, el uso del esfuerzo mecánico puede facilitar la orientación de la piel para el uso en un área tal, como el cuero cabelludo que se expone a una significativa fuerza de estiramiento. Otros tejidos que se pueden beneficiar del uso de la tensión, incluyen, pero no se limitan a, tejidos de músculos, tejidos de ligamentos, y tejidos de tendones. La tensión pasiva en este contexto se refiere a un proceso en el cual tensión es inducida por las células mismas, ya que contraen y reorganizan una matriz. Esto es inducido típicamente fijando los extremos del la matriz del colágeno electrodiseñado. Como las células contraen y alteran la matriz, los extremos fijos siguen en su lugar, y de tal modo filtra la matriz ya que las células como si "tirasen" contra la carga isométrica. La tensión no solamente alinea las células, sino que les envía señales con respecto al crecimiento y desarrollo. La construcción puede también ser filtrada externamente, es decir la construcción puede ser preparada y entonces estirada para causar la alineación mecánica. El estiramiento se aplica típicamente de manera gradual en un cierto plazo. El colágeno se puede también estirar para causar la alineación en la matriz antes de que las células se agreguen a la construcción (es decir formar la matriz, estirar la matriz y después agregar células). se puede utilizar cualquier método conocido para aplicarse la tensión física o mecánica pasiva a los tejidos.

Una manera adicional de combinar las matrices electroprocesadas de colágeno con las células para la implantación son prepararse las construcciones, entonces agregar las células a las construcciones. Las células pueden ser colocadas en un lumen o espacio dentro de una construcción, o implantadas adyacentes al implante para facilitar su crecimiento. Alternativamente, el implante se puede colocar en un biorreactor. Hay varias clases de biorreactores comercialmente disponibles, los dispositivos diseñados para proporcionar un esquileo bajo, entorno de nutriente alto de perfusión. Hasta hace poco tiempo, la mayoría de los biorreactores disponibles mantuvieron las células en suspensión y las entregas de nutrientes y oxígeno por inyección, con uso de impelentes, u otros medios de revolvimiento. Estos métodos producen entornos de altos esquileos que pueden dañar las células o inhiben la formación de las construcciones a escala grande. El biorreactor de RCCS (Synthecon) es un biorreactor de una pared rotatoria. Consiste en un cilindro interno pequeño, que en sí mismo puede ser utilizado como sustrato para electroprocesado, colocado dentro de un cilindro externo más grande. Aunque la matriz del electrocentrifugado o del electroaerosol se puede fabricar en cilindro interno, también pueden ser utilizadas otras localizaciones dentro del biorreactor para la colocación de una matriz para sembrar. La brecha entre los servicios internos y externos de los cilindros sirve como el recipiente y espacio para cultivar las células. Se oxigena el medio de cultivo vía una membrana hidrófoba externa. El entorno de esquileo bajo del biorreactor de Synthecon RCCS promueve interacciones de la célula -la célula, y matriz extracelular-la célula (ECM) sin daño o "lavado hacia lejos" de nutrientes que ocurre con el revolvimiento o la inyección activa. Típicamente, el dispositivo de RCCS se opera en a velocidades de rotación de 8 hasta 60 RPM, según lo requerido para mantener las células en la suspensión, y a menos de 8 RPM (preferiblemente 2-3 RPM) para las cultivos inmovilizado a lo largo del eje central del recipiente. El biorreactor Synthecon se puede utilizar en una incubadora de cultivo de

tejido estándar. Estos valores para las velocidades de giro y otros parámetros se pueden variar dependiendo del tejido específico creado.

En otras aplicaciones una construcción electrocentrifugada puede ser fabricada y ser colocada dentro del biorreactor de RCCS, y permitido experimentar caída libre continua, un boyante entorno que fomenta la formación a escala grande de construcciones multiextendidas en capas. Las células se pueden agregar a la construcción antes de su colocación dentro del biorreactor. Alternativamente, el biorreactor se puede utilizar como plataforma para sembrar las células sobre la matriz electrocentrifugada. Por ejemplo, a la construcción cilíndrica se puede poner dentro del recipiente del biorreactor. Las células se pueden agregar al recipiente y permitir interactuar con la construcción electrocentrifugada en caída libre. La velocidad requerida para mantener las construcciones en suspensión es dependiente del tamaño y la densidad del material presente en la construcción. Construcciones más grandes (2-4 milímetros de diámetro por 10-12 milímetros de longitud) puede requerir velocidades de rotación acerca a 15-20 r.p.m. Construcciones más grandes, para el cartílago por ejemplo, pueden requerir incluso velocidades más altas de rotación.

Materiales de colágeno electroprocesado, por ejemplo las matrices, son útiles en la formación de prótesis. Una aplicación de matrices electroprocesadas está en la formación de las prótesis vasculares de diámetros medio y pequeño. Algunos materiales preferidos para esta realización son colágeno y elastina, especialmente colágeno del tipo I y colágeno del tipo III. Algunos ejemplos incluyen los recipientes coronarios para puente o injerto, técnica femoral, técnica popliteal, técnica braquial, técnica tibial, técnica radial, bifurcación técnica, o venas correspondientes. El material electroprocesado es útil especialmente cuando está combinado con células endoteliales en el interior de la prótesis vascular, y células del músculo liso, por ejemplo un tubo de colágeno, y también cuando es combinado con fibroblastos en el exterior de tubos del colágeno. Formas más complicadas incluyendo ahusado y/o se pueden también construir recipientes ramificados. Un mandril formado diferentemente es necesario enrollar las fibras grandes alrededor u orientar el polímero electrocentrifugado/de electroaerosol:

La combinación de colágeno electroprocesado y otras fibras, tales como el colágeno de un diámetro más grande (e.g., 50 a 200 μm) u otras fibras puede proporcionar condiciones óptimas de crecimiento para las células. Las fibras de diámetro grande forman una matriz estructural básica que presta ayuda mecánica a la construcción, y la matriz electroprocesada se utiliza como un andamiaje para entregar y/o apoyar las células. Esto facilita adosar las células sobre la matriz estructural. Las fibras del colágeno de escala grandes se pueden incorporar en otros órganos y tejidos biodiseñados para prestar adicional fuerza mecánica según lo necesitado. Por ejemplo, las fibras grandes pueden ser colocadas dentro de una matriz electrocentrifugada que se diseña que como andamiaje para la fabricación del órgano basado en músculo esquelético, músculo cardíaco y otro músculo liso el por ejemplo el intestino y el estómago. En una alternativa, la estrategia de fabricación, una construcción cilíndrica es electrocentrifugada sobre un blanco conveniente, por ejemplo un mandril cilíndrico. Otras formas pueden ser utilizadas si es deseable basado sobre forma del sitio en el cual el implante será colocado. Las matrices en esta realización incluyen colágeno electroprocesado y otros componentes, por ejemplo fibrina, PGA, PLA, y las mezclas del PGA-PLA-, PEO, PVA u otras mezclas. El cociente relativo de los diversos componentes de esta construcción se adapta a los usos específicos (e.g. más fibrina, menos colágeno para la vascularización realizado en una piel injerto). Para fabricar un músculo cilíndrico la construcción es rellena de células del músculo o madre, o de otro tipo de células y los extremos distales de las construcciones electrocentrifugadas se suturan o sellan. En algunas realizaciones, las células se mezclan con varios materiales de la matriz para reforzar su distribución dentro de la construcción. Por ejemplo, las células pueden ser mezcladas con el colágeno electroprocesado, y opcionalmente la fibrina, anteriormente a la inserción en la construcción. El objeto de esta estrategia es proporcionar una ayuda mecánica adicional a la construcción y proveer a las células de una matriz tridimensional dentro de la construcción para promover crecimiento. Esto también ayuda a mantener las células en una distribución uniforme dentro de la construcción. Este método se puede utilizar para reforzar la alineación de las células dentro de la construcción. Este material de relleno se puede extrudir directamente en la construcción cilíndrica, mientras que se saca el relleno, ocurre la alineación. El mezclar células endotelial con las otras células insertadas en la construcción (u otros tipos de las células) hace acelerar el neovascularización. Otro método para lograr este objeto está el electrodepositar las células endoteliales directamente en una matriz electroprocesada del colágeno, que ayuda en la formación de la envoltura cilíndrica. La alineación de las fibras dentro de la matriz electroprocesada que comprende la construcción es controlada opcionalmente controlando el movimiento relativo de la solución de la fuente con respecto al blanco respectivamente. Otros tipos de células, tales como los fibroblastos del tendón, son opcionalmente electrocentrifugados en, o sobre la superficie externa de la construcción para reforzar la formación de la envoltura de tejido conectivo externo que forma la construcción.

En otro ejemplo, una hoja de material electroprocesado de colágeno es preparada, rodada en un cilindro e insertada en el cilindro electroprocesado. La construcción se llena de las células según lo descrito anteriormente, suturada, cerrada y colocada en un biorreactor o directamente *in situ*. Al alinear las fibrillas de la hoja electrocentrifugada de material en paralelo con el eje largo del cilindro externo, se produce un andamiaje para la producción de un análogo a un músculo, de la composición electroprocesada. Células en contacto con las fibrillas que se ponen en orden a lo largo del eje largo de la hoja separada, se diseminan en paralelo a las fibrillas de la hoja, formando una construcción de las células puestas en orden y extendidas en capas en un patrón de la organización similar a un músculo presente *in vivo*. Este diseño básico puede ser adaptado para producir muchos tejidos diversos, incluyendo pero no limitados al músculo esquelético y al músculo cardíaco. La construcción cilíndrica del tejido entonces se implanta o coloca dentro de un biorreactor de RCCS. Las velocidades de rotación para mantener este tipo de construcción de suspensión están en el intervalo de 4-20 RPM, dependiendo de la masa excesiva del tejido y los materiales específicos para fabricar el cilindro externo.

La vascularización del tejido diseñado de las matrices que contienen el colágeno electroprocesado, sea solo o con otros materiales, ocurre *in situ* varios días después de la cirugía. En algunas realizaciones, la neovascularización de la construcción diseñada para contener el material electroprocesado es realizada mezclando las células endoteliales con la construcción durante la fabricación. Otra alternativa para proveer el tejido diseñado que contiene el material electroprocesado con una fuente vascular es trasplantar temporalmente el tejido en el epiplón. El epiplón tiene una fuente vascular extensa y rica la cual puede ser utilizada como una incubadora viva para la ayuda del tejido diseñado. El tejido diseñado se retira de un biorreactor, envuelve en el epiplón y se apoya por la difusión de nutrientes y de oxígeno del tejido circundante adentro del epiplón. Alternativamente, o además de este enfoque, el tejido diseñado está conectado directamente con fuente vascular endógena del epiplón. Un vaso sanguíneo puede ser parcialmente perforado o cortado, o dejado diseccionado libre del epiplón. El tejido diseñado conteniendo el colágeno electroprocesado, la fibrina, u otros materiales, dependiendo la construcción, se envuelve alrededor del recipiente. El tejido diseñado es apoyado por los escapes de nutrientes del vaso perforado o por difusión simple de nutrientes si el vaso se deja intacto. Sin importar la estrategia, el tejido diseñado es rodeado por el epiplón y su rica fuente vascular. Este procedimiento puede ser realizado usando los vasos sanguíneos de afuera del epiplón.

El tejido conteniendo el colágeno electroprocesado, y opcionalmente otro material, se puede diseñar con un sistema vascular endógeno. Este sistema vascular puede componerse de vasos artificiales o de los vasos sanguíneos suprimidos de un sitio dispensador en el recipiente del trasplante. El tejido diseñado conteniendo el material de la matriz electroprocesada entonces es envuelto alrededor del recipiente. Envolviendo tal recipiente con el tejido durante o después del ensamblaje del tejido diseñado, el tejido diseñado tiene un vaso que se puede unir al sistema vascular del recipiente. En este ejemplo, un recipiente en el epiplón, u otro tejido se corta, y el vaso del tejido diseñado es conectado con los dos extremos libres del recipiente omental. La sangre pasa del recipiente omental al sistema vascular del tejido diseñado, con tejido y drena nuevamente adentro del recipiente del epiplón. Envolviéndose el tejido en el epiplón y conectado con el vaso sanguíneo omental, el tejido diseñado es suplido por difusión de nutrientes del epiplón y el vaso incorporado en el tejido durante su fabricación. Después de un período de tiempo conveniente, el tejido se retira del epiplón y coloca en el sitio correcto en el recipiente. Usando esta estrategia, el material electroprocesado conteniendo el tejido diseñado se apoya en un nutriente entorno rico durante varios, los días primeros siguientes ale retiro del biorreactor. El entorno del epiplón también promueve la formación de vasos sanguíneos nuevos en el tejido implantado. Esta estrategia omental de incubadora puede ser combinada con las otras estrategias, tales como combinar factores angiogénicos en el material de la matriz durante el electroprocesado. Varias opciones son disponibles. Por ejemplo, los implantes se pueden sembrar con angioblastos y/o las células endoteliales para acelerar la formación de elementos vasculares una vez que se coloque el tejido diseñado *in situ*. Como otro ejemplo, los péptidos angiogénicos pueden ser introducidos en el tejido diseñado vía una bomba osmótica. Las combinaciones de métodos se puede también utilizar. El uso de una bomba osmótica permite la entrega de péptidos o, como son directamente conocidos, los péptidos angiogénicos o factores de crecimiento, al sitio del interés de una manera biológica eficiente y rentable. VEGF entregado a los miembros traseros isquémicos de conejos aceleró el crecimiento de la cama capilar, aumentó la ramificación vascular, y el funcionamiento muscular mejoró con respecto a controles isquémicos. Un enfoque alternativo es sembrar construcciones completamente diferenciadas del tejido conteniendo el material electroprocesado de la matriz con células endoteliales y o angioblastos adicionales poco antes que se implantaran *in situ*.

En algunas realizaciones, las células madres u otras células usadas para construir el implante se aíslan del sujeto, o el otro donante compatible que requiere la reconstrucción del tejido. Esto proporciona la ventaja de usar las células que no inducirá una respuesta inmunológica, porque éstas son originadas con el sujeto (tejido autólogo) requiere la reconstrucción. Las biopsias relativamente pequeñas pueden ser utilizadas para obtener un suficiente número de células para construir el implante. Esto reduce al mínimo déficit y daño funcionales a tejidos endógenos que sirven como el sitio donador para las células.

En algunas realizaciones, las matrices del colágeno electroprocesado de la presente invención incluyen sustancias en la matriz que mejorarán el funcionamiento de la matriz electroprocesada implantada. Ejemplos de las sustancias que pueden ser utilizadas incluyen factores de crecimiento de péptidos, antibióticos, y/o fármacos contra el rechazo, anestésicos, analgésicos y/o agentes antiinflamatorios. Alternativamente, puede ser incluidas las células que se diseñan para la fabricación de compuestos deseados. La construcción entera es, por ejemplo, cultivada en un biorreactor o un cultivo convencional, o colocada directamente *in vivo*. Por ejemplo, la neovascularización puede ser estimulada por factores promotores angiogénicos y de crecimiento, administrados como péptidos, proteínas o como terapia génica. Los agentes angiogénicos se pueden incorporar en la matriz electroprocesada. Los factores de crecimiento del nervio pueden ser incorporados en la matriz para promover crecimiento o las neuronas en la matriz y el tejido. Los varios métodos pueden ser utilizados para controlar la liberación de estos factores al entorno de la implantación. En una matriz degradable, la degradación gradual/ruptura de la matriz liberará estos factores y acelerar el crecimiento de tejidos deseados.

Las matrices de colágeno electroprocesado pueden también utilizarse en la conexión con otros procesos del edificio de la matriz. Es decir un tubo extrudido puede tener una capa exterior electrocentrifugada sobre ésta, en donde las diversas capas se complementan y proporcionan una matriz apropiada para promover un tipo específico de crecimiento de las células. Como ejemplo, un injerto vascular que comprende sobre todo un tubo de colágeno que tiene una capa electrocentrifugada de colágeno y de células agregadas para promover la aceptabilidad del injerto en un recipiente particular. Un segundo ejemplo es una preparación *in vitro* de piel formada por fibroblastos creciendo en una capa, el cubrir la primera capa con el colágeno electroprocesado, y después el crecimiento de una segunda capa compuesta por células epidérmicas en una matriz de fibrina. Esta técnica de capas se puede utilizar para producir una variedad de tejidos.

Usos para las composiciones de la presente invención

Las composiciones de colágeno electroprocesado de la presente invención tienen un amplio conjunto de aplicaciones potenciales. Las aplicaciones incluyen la fabricación de tejido diseñado y de órganos, incluyendo las estructuras tales como parches o tapones de tejidos o material de matriz, prostéticos, y otros implantes, andamiaje, reparación o el revestido del tejido de heridas, dispositivos hemostáticos, dispositivos para uso en la reparación de tejidos y ayuda tal como tornillos de suturas, quirúrgicos y ortopédicos, y placas quirúrgicas y ortopédicas, capas naturales o componentes para los implantes sintéticos, implantes cosméticos y ayudas, reparación o ayuda estructural para órganos o tejidos, entrega de la sustancia, plataformas de bioingeniería, plataformas para probar el efecto de sustancias sobre las células, cultivos de célula, y otras numerosas aplicaciones.

Además, aunque muchos ejemplos específicos se proporcionan a continuación referentes a la combinación de colágeno con otros materiales electroprocesados y/o sustancias específicas, se pueden utilizar muchas otras combinaciones de materiales y sustancias.

Uso de composición electroprocesada como tejido u órgano de aumento o reemplazo

La capacidad de combinar las células en material electroprocesado de colágeno proporciona la capacidad de utilizar composiciones de la presente invención para construir tejidos, órganos, u órganos semejantes a tejidos. Células incluidas en tales tejidos u órganos pueden incluir las células que sirven una función de entrega de una sustancia, células sembradas que proporcionarán los principios del tejido de reemplazo, o de ambos. Muchos tipos de las células se pueden utilizar para crear tejidos u órganos. Células madre, células madre internadas, y/o células diferenciadas se utilizan en varias realizaciones. Ejemplos de células madre usadas en estas realizaciones incluyen las células madre embrionarias, células madre del tuétano de huesos y células madre del cordón umbilical utilizadas para hacer los órganos o tejidos similares a órganos tales como hígados o riñones. En algunas realizaciones la forma de la composición electroprocesado ayuda a enviar señales a las células que deben crecer y reproducirse en un tipo específico de una manera deseada. Otras sustancias, por ejemplo inductores de la diferenciación, pueden ser agregadas a la matriz electroprocesada para promover tipos específicos de crecimiento de la célula. Además, diversas mezclas de tipos de células se incorporan en la composición en algunas realizaciones. La capacidad de utilizar materiales y matrices del colágeno electroprocesado al biodiseño de tejidos u órganos crea una variedad amplia de usos del tejido del reemplazo biodiseñado. Los ejemplos de biodiseño de los componentes incluyen, pero no se limitan a, hueso, estructuras dentales, empalmes, cartílagos, músculos esqueléticos, músculo liso, músculo cardíaco, tendones, meniscos, ligamentos, vasos sanguíneos, stents, válvulas de corazón, córneas, tímpanos, guías de nervios, parches de tejidos u órgano, o sellantes, un relleno para los tejidos faltantes, hojas para las reparaciones cosméticas, piel (hojas con las células agregadas para hacer un equivalente de la piel), estructuras del tejido suave de la garganta tales como tráquea, epiglotis, y cuerdas vocales, otras estructuras cartilaginosas por ejemplo cartílago nasal, placa tarsal, anillos traqueales, cartílago de tiroides, y cartílagos aritenoides, tejido conectivo, injertos vasculares y componentes de éstos, y hojas para usos tópicos, y reparación o reemplazo de órganos tales como hígado, los riñones, y páncreas. En algunas realizaciones, tales matrices se combinan con el fármaco y matrices electroprocesadas de entrega sustancias de la presente invención de manera que mejorarán la función del implante. Por ejemplo, antibióticos, antiinflamatorios, anestésicos locales o combinaciones de éstos, se pueden agregar a la matriz del órgano biodiseñado para apresurar el proceso curativo y reducir el malestar.

Las matrices del colágeno electroprocesado tienen un número de usos ortopédicos. El hueso puede ser hecho combinando el colágeno electroprocesado con, por ejemplo, osteoblastos, y factores de crecimiento del hueso. En algunas realizaciones, la matriz puede también contener un material conductor para permitir el uso de una corriente para una implantación en un sitio para facilitar el crecimiento y curación. Opcionalmente, el colágeno puede ser diseñado genéticamente para contener más sitios P-15 que en el colágeno que ocurre naturalmente y acelerar la producción de hidroxiapatita. Tal implante prostético del hueso puede utilizarse, por ejemplo, en la reparación y reemplazos comunes, por ejemplo reemplazo de la cadera, o sustituir tejido del hueso perdido o deteriorado. El cartílago puede ser diseñado combinando el Tipo II de colágeno con los condroblastos y otros materiales de matriz tales como los proteoglicanos. En algunas realizaciones, versiones sintéticas del ácido hialurónico que no son sometidos a ruptura se utilizan para promover la hidratación del tejido diseñado. Opcionalmente, inhibidores angiogénicos pueden ser incluidos en la matriz para prevenir la neovascularización en el cartílago. Tal cartílago diseñado puede ser utilizado, por ejemplo, en la reparación de discos o reemplazo espinal, reconstrucción de un esqueleto fibroso cardíaco, de una nariz o de un oído, en reemplazo o aumento, o reparación común de la cadera. Las matrices pueden también ser utilizados para diseñar el esmalte dental, por ejemplo, los dentinoblastos que se incorporan en la matriz. Los ligamentos (incluyendo, por ejemplo, meniscos de rodilla, ligamentos patelares, ligamentos colaterales, ligamentos cruciformes, ligamentos rotatorios, y del labrum acetabular de la articulación de la cadera), puede ser preparado para usar fibroblastos en una matriz de elastina y del colágeno. En algunas realizaciones, una base central extrudida es preparada y modificada, conducida con amoníaco por fibrillogénesis. Las matrices electroprocesadas se pueden entonces aplicar a la superficie externa. Alternativamente, el ligamento entero puede ser formado por electroprocesado. Opcionalmente, se puede crear una torcedura leve por medios tales como un inyector rotatorio o un vórtice de aire. En algunas realizaciones, el ligamento dañado de un paciente puede ser molido en una mezcla cruda para entonces ser rociado como un ligamento nuevo, permitiendo el uso del tejido autólogo. Tendones (que incluyen por ejemplo, ligamento rotatorio, tendones de Aquiles, y cuerdas tendinosas (*chorda tendínea*), y músculos pueden también ser preparados usando la combinación apropiada de células y materiales de la matriz. Las combinaciones de tendones y de músculos son también posibles. En algunos usos comunes de reemplazo de articulaciones, los implantes sintéticos se pueden cubrir con el tejido diseñado para

una compatibilidad mejorada del implante. En realizaciones en las que el crecimiento del hueso y/o del cartílago en la articulación es indeseable, la matriz se puede diseñar para contener agentes que inhibirán crecimiento.

En usos neurológicos, las matrices pueden utilizarse, por ejemplo, en la fabricación de guías de nervios, parches duros, sellantes para los nervios dañados, construcciones del cerebro como relleno para daños/retirar las áreas del cerebro que se pierde durante un accidente o enfermedad, y como parches “duros” o “aracnoides” para los escapes de fluidos cerebroespinales. Opcionalmente, las células madre y los factores de crecimiento de nervios pueden ser incluidos en la matriz. Las construcciones también pueden ser suplidas con las células mielanzadas. En algunas realizaciones neurológicas, es deseable utilizar una capa de PGA dentro o sobre la construcción para limitar la infiltración celular, y reducirla al mínimo o evitar la fibrosis.

En aplicaciones cardiovasculares, las matrices pueden utilizarse, por ejemplo para fabricar stents o cubrir stents que comprenden el material sintético, así proporcionando un stent híbrido que comprende un material sintético rodeado por el material natural. El material natural puede contener, para ejemplo, colágeno y células del músculo liso. Opcionalmente, los vectores de ADN se pueden poner en tal matriz de modo que sea tomada por las células que emigran o se siembran en la matriz en la reorganización del andamiaje. Las matrices pueden fabricarse en, por ejemplo, las válvulas del corazón, hojas de válvulas, y vasos sanguíneos prostéticos para el uso, por ejemplo, como injertos de puente (bypass) de la técnica coronaria. En muchas realizaciones, la prótesis vascular es preparada en “microgravedad simulado” en un biorreactor al usar los materiales electroprocesados de la matriz. Por ejemplo, la Figura 6 es una fotografía de una matriz electrocentrifugada antes de la siembra de células (izquierda), y un segmento arterial desarrollado desde el andamiaje (derecha). Este enfoque proporciona un método para sembrar las construcciones con las células en un entorno de bajo eskuileo que proporciona una alta entrega de nutrientes. En algunas de estas realizaciones, el revestimiento endotelial de las células se siembra creando un implante con una estructura de capas característica de vasos naturales. El revestimiento endotelial evita la coagulación y obstrucción de las arterias de diámetro pequeño. Las matrices también se usan para sustituir el músculo del corazón dañado o infractado. Los parches se pueden preparar del músculo cardíaco. Alternativamente, se ha observado que las células del músculo liso, implantadas sobre un corazón, transformarán al músculo cardíaco. En algunas realizaciones, las matrices usadas como los parches del músculo cardíaco incluyen un factor de crecimiento endotelial vascular para permitir para la vascularización del tejido nuevo. Opcionalmente, el factor de crecimiento de nervios se incluye para causar la inervación del tejido de modo que la contracción del tejido nuevo se coordine con el otro músculo del corazón. Parches del músculo cardíaco pueden también ser preparados con factores deseados de crecimiento, pero sin ninguna célula. Las válvulas cardíacas pueden ser montadas de colágeno electroprocesado con o sin las células. La válvula es montada *in vitro*, por ejemplo en un biorreactor, para el preacondicionado de las hojas de las válvulas. En algunas realizaciones, un anillo alrededor del borde se espesa para imitar la estructura de una válvula natural y proporcionar medios de adosado y ayuda estructural.

Las matrices también tienen numerosos usos en piel, y usos cosméticos que implican el músculo facial y el tejido conectivo. Las matrices se pueden utilizar revistiendo para las heridas o lesiones de cualquier tipo, incluyen, sin limitación, dermoabrasiones y envolturas de productos químicos. Tales matrices pueden incluir fibrina electroprocesada para agregar una función hemostática y promover la curación. Los materiales de la matriz pueden también inyectarse como relleno para las arrugas, las cicatrices, o los defectos. Células madre, fibroblastos, células, y/o endoteliales las células epiteliales se pueden incluir para proporcionar crecimiento de tejido. La adición de tales tapones del tejido reducirán las marcas de una cicatriz. Las matrices pueden también utilizarse para preparar el aumento *in vivo*, reparación y contorno para los tejidos tales como labios, tímpanos, córneas, placas tarsal del párpado, frentes, barbillas, mejillas, oídos, nariz, y pechos. El uso de las matrices se puede combinar con otros métodos de tratamiento, de reparación, y de contorno. Por ejemplo, inyecciones de la matriz del colágeno puede ser combinado con Botox (toxina botulínica) para el tratamiento de arrugas. Las matrices se pueden también conformar para servir como revestimientos para apoyar cuellos que ceden, y mejillas que ceden.

Las matrices del colágeno electroprocesado pueden también utilizarse para fabricar órganos o técnicas de órganos prostéticos. La mezcla de célula confinada alineada en una matriz electroprocesada tridimensional puede ser utilizada para producir estructuras de órganos complejos imitados. La capacidad de formar la matriz permite la preparación de estructuras complejas para sustituir órganos tales como lóbulos del hígado, páncreas, otras glándulas endocrinas, y riñones. En tales casos, las células son implantadas para asumir la función de las células en los órganos. Preferiblemente, se utilizan las células autólogas o las células madre para reducir al mínimo la posibilidad de rechazo inmune. Alternativamente, las células se pueden poner en matriz con un tamaño de poros que es bastante pequeño para blindar las células de la vigilancia inmune, mientras que todavía permite que los nutrientes pasen a las células.

En algunas realizaciones, las matrices se utilizan para preparar los reemplazos o aumentos parciales. Por ejemplo, en ciertos estados de la enfermedad, los órganos se marcan con una cicatriz al punto de ser disfuncionales. Un ejemplo clásico es la cirrosis hepática. En la cirrosis, los hepatocitos normales están atrapados en bandas fibrosas del tejido de la cicatriz. En una realización de la invención, se hace una biopsia al hígado, del hígado viable se obtienen las células, cultivadas en la matriz electroprocesada, y reimplantadas en el paciente como un puente a, o reemplazo para, los trasplantes rutinarios del hígado.

En otro ejemplo, por el crecimiento de células de secreción de glucagón, células de secreción de la insulina, células de secreción de somatostatina, y/o células de secreción del polipéptido pancreático, o combinaciones éstos, en cultivos separados, y entonces mezclarlas junto con los materiales electroprocesados por medio del electroprocesado, se crea

un islote pancreático artificial. Estas estructuras entonces se ponen debajo de la piel, retroperitoneal, intrahepática o en otras localizaciones deseables, como tratamientos implantables, de larga duración para la diabetes.

En otros ejemplos, las hormonas productoras de las células se utilizan, por ejemplo, en sustituir las células pituitarias anteriores para afectar la síntesis y secreción de la secreción de la hormona de crecimiento, hormona luteinizante, hormona que estimula el folículo, hormona que estimula la prolactina y de la tiroides, entre otras. Células gonadales, tales como células de Leydig y células foliculares se emplean para suplir niveles de la testosterona o del estrógeno. Las combinaciones especialmente diseñadas son útiles en la terapia de reemplazo hormonas en mujeres post- y perimenopáusicas, o en los hombres que experimentan declinación de la secreción endógena de la testosterona. La dopamina que produce las neuronas es utilizada e implantada en una matriz para suplir células defectuosas o dañadas de la dopamina en la sustancia nigra. En algunas realizaciones, las células madre del recipiente o del donante pueden ser mezcladas con las células levemente dañadas, por ejemplo células pancreáticas de los islotes, o hepatocitos, y colocadas en la matriz electroprocesada y cosechadas después para controlar la diferenciación de las células madre en un tipo deseado de la célula. En otras realizaciones las células de la tiroides pueden ser sembradas y crecidas para formar las estructuras pequeñas de secreción de la hormona de tiroides. Este procedimiento se realiza *in vitro* o *in vivo*. Las células diferenciadas nuevamente formadas se introducen en el paciente. Numerosas otras realizaciones existen. El colágeno es un elemento estructural extremadamente importante, y se pueden hacer numerosos elementos y estructuras anatómicas, reparadas o aumentadas usando las matrices de la presente invención. Varios tipos de implantes pueden ser preparados usando información con respecto a la estructura, histología, y composición molecular del tejido, que está disponible para los expertos en la técnica.

Otras aplicaciones en dispositivos y procedimientos médicos

Otras aplicaciones para la construcción del colágeno electroprocesado incluyen una obstrucción o un refuerzo para una obstrucción a un escape. Por ejemplo, las matrices del colágeno electroprocesado se pueden utilizar para sellar aberturas en pulmones después de la reducción de la capacidad pulmonar (retiro parcial). Este uso es importante no solamente para propósitos hemostáticos, sino también prevenir escapes de aire en la cavidad y el neumotórax pleurales. El colágeno electroprocesado se puede también formar en una manga para utilizar como refuerzo para los aneurismas o en el sitio de una anastomosis. Tales mangas se colocan encima del área en la cual se desea y se sutura el refuerzo, sello, o une de otra manera al recipiente. Las matrices pueden también utilizarse como parches y tapones hemostáticos para los escapes del líquido cerebrospinal. Otro uso es como la obstrucción del lacrimal del punto para un paciente que sufre de síndrome seco del ojo. Otro uso es como método de la fertilidad inyectando una matriz en un conducto o un tubo tal, como el conducto deferente o tubo uterino.

Las matrices se pueden también utilizar para apoyar o conectar un tejido o unas estructuras que han experimentado lesión, cirugía, o deterioración. Por ejemplo, las matrices se pueden utilizar en un procedimiento de suspensión del cuello de la vejiga para los pacientes que sufren de incontinencia del posparto. Otras aplicaciones ilustrativas son la ayuda rectal, ayuda vaginal, parches de la hernia, y reparación de un útero rebajado. Las matrices se pueden utilizar para reparar o reforzar músculos del esfínter debilitados o disfuncionales, tales como el esfínter del esófago en el caso de reflujo del esófago. Otros ejemplos incluyen reforzar y sustituir el tejido en cuerdas vocales, epiglotis, y tráquea después del retiro, por ejemplo en el retiro del tejido canceroso.

Varias aplicaciones son posibles en el campo de quirúrgico de reparación o construcción. Por ejemplo, las matrices de la presente invención también se utilizan para hacer el tejido u materiales ortopédicos, tornillos, placas, suturas, o sellantes que son hechos del mismo material que el tejido, en el cual los dispositivos serán utilizados. En algunas realizaciones, la aplicación de la matriz electroprocesada directamente a un sitio en el cuerpo de un organismo se utiliza para unir o para conectar tejidos en lugar de otros dispositivos de conexión.

Usos en diagnóstico e investigación

Las construcciones del colágeno electroprocesado de la presente invención también permiten cultivar *in vitro* células para el estudio. La capacidad de imitar la matriz extracelular y las condiciones del tejido *in vitro* proporcionan una nueva plataforma para el estudio y manipulación de células. En algunas realizaciones, las células seleccionadas se crecen en la matriz y se exponen a fármacos, sustancias, o tratamientos seleccionados. Por ejemplo, un cultivo que usa las células del tumor de un paciente de cáncer puede ser utilizado para identificar la susceptibilidad *in vitro* a varios tipos de quimioterapia y radioterapia. De esta manera, se analizan los tratamientos de la radioterapia y de la quimioterapia alternativas, y para calcular el tratamiento mejor para un paciente específico. Por ejemplo, un tejido diseñado puede ser manufacturado que incluye el colágeno y las células de cáncer, preferiblemente células propias de cáncer de un paciente. Muestras múltiples de este tejido se puede entonces someter a diversas terapias múltiples del cáncer. Los resultados de diversos tratamientos pueden entonces ser comparados directamente cada uno con el otro para la evaluación de la eficacia.

Otro uso de matrices del colágeno electroprocesado es como plataforma de bioingeniería para la manipulación de células *in vitro*. Este uso es similar al uso como una plataforma para la investigación y ensayo, en el que se prevé una colocación de células en una matriz y tratar las células a dirigirlas de una manera específica. Por ejemplo, las células madre pueden ser colocadas en una matriz en condiciones que controlen su diferenciación. La diferenciación es controlada a través del uso de los materiales de la matriz o de las sustancias en la matriz que influenciará la diferenciación. Por ejemplo, agentes, por ejemplo el ácido retinoico, que juega un papel en promover la diferenciación

puede ser colocado dentro de la matriz. En otras realizaciones, las secuencias génicas que se asocian al proceso de la diferenciación pueden ser electrocentrifugadas en la matriz. Por ejemplo, cuando el factor MYO D de transcripción es transfectado en fibroblastos, o las células madre transfectadas, las células comienzan a iniciar la expresión de secuencias génicas específicas del músculo y la diferenciación de las células en el músculo esquelético. El sitio P15 del colágeno de tipo I es asociado con la inducción de las secuencias específicas génicas del hueso.

Las composiciones de la presente invención son también útiles para ensayar y aplicar varias terapias génicas. Trabajando con las composiciones *in vitro*, diversos tipos de la terapia y la manipulación genes se pueden lograr por la inserción de ADN preseleccionado en suspensiones de células, de materiales, etc. Por ejemplo, técnicas no virales por ejemplo electroporación se utiliza para tratar las células cultivadas antes de la inserción en la matriz de la presente invención. En otras realizaciones, las células se tratan dentro de la matriz antes de que la composición se inserte en un recipiente. La transferencia génica *in vitro* evita la exposición de un recipiente a los productos virales, reduce el riesgo de la inflamación proveniente de partículas virales residuales, y evita la incorporación potencial viral de las células de líneas de gérmenes. Evita el problema de encontrar o de diseñar capas virales bastante grandes, aceptar genes grandes tales como el que es para el factor VIII (factor antihemofílico). Sin embargo, la terapia génica *in vivo* se logra en algunas realizaciones, por ejemplo, incorporando el ADN en el material electroprocesado, cuando se crea con técnicas de electroprocesado de la presente invención, por la que el algún ADN sea incorporado en las células en contacto con la composición después de la aplicación de la composición al recipiente *in vivo*.

Esto es especialmente verdad en secuencias génicas pequeñas, tales como de oligonucleótidos sentido y/o antisentido. Otro ejemplo es el uso de matrices para el cultivo y el crecimiento de células. Las células pueden ser electroprocesadas, o insertadas de otra manera en una matriz del colágeno y colocadas en las condiciones para permitir la reproducción de las células y el crecimiento del tejido. Opcionalmente, la matriz se puede poner en un biorreactor.

25 *Uso de matrices del colágeno electroprocesado en la entrega sustancias*

Un uso de las composiciones del electroprocesado colágeno de la presente invención es la entrega de una o más sustancias a una localización deseada. En algunas realizaciones, los materiales del electroprocesado se utilizan simplemente para entregar los materiales. En otras realizaciones, los materiales del electroprocesado se utilizan para entregar sustancias que se contienen en los materiales del electroprocesado, o son producidas o liberadas por las sustancias contenidas en los materiales del electroprocesado. Por ejemplo, el material electroprocesado que contenía las células puede ser implantado en un cuerpo y utilizado para entregar las moléculas producidas por las células después de la implantación. Las presentes composiciones pueden ser utilizadas para entregar sustancias a una localización *in vivo*, una localización *in vitro*, u otras localizaciones. Las presentes composiciones pueden ser administradas para usar de estas localizaciones cualquier método.

En el campo de la entrega de sustancias, las composiciones de la presente invención tienen muchas cualidades que permiten la entrega de sustancias usando una variedad amplia de perfiles de liberación y cinética de la liberación. Por ejemplo, selección de la sustancia y del método por los cuales la sustancia se combina con el material electroprocesado afecta el perfil de la liberación de la sustancia. Hasta el punto que las sustancias no son inmovilizadas por el colágeno electroprocesado, la liberación del colágeno electroprocesado es una función de la difusión. Un ejemplo de tal realización es una en el cual se rocía la sustancia sobre el colágeno electroprocesado. Hasta el punto que las sustancias son inmovilizadas por el material electroprocesado, la velocidad de liberación se relaciona más de cerca con la velocidad en la cual el material electroprocesado degrada. Un ejemplo de tal realización es una en el cual la sustancia covalente se enlaza al colágeno electroprocesado. Para una sustancia atrapada dentro de un agregado o el filamento electrocentrifugado, se determina la cinética de la liberación por la velocidad en la cual el material circundante se degrada o desintegra. Otros ejemplos siguen siendo las sustancias que se unen al material electroprocesado por un enlace sensible a la luz. Exponer tal enlace a la liberación por la luz de la sustancia del material electroprocesado. Inversamente, en algunas realizaciones de esta invención, los materiales pueden ser expuestos a la luz para causar la unión de agentes *in vivo* o *in vitro*. Combinar el compuesto con el material electroprocesado en solución, más bien que en suspensión, resulta en un diverso patrón de liberación y de tal modo proporciona otro nivel de control para el proceso. Además, la porosidad del colágeno electroprocesado puede ser regulada, lo cual afecta la velocidad de liberación de una sustancia. Realzar la porosidad facilita la liberación. La liberación de la sustancia también se realiza moliendo, el obtener fragmentos o por la pulverización del colágeno electroprocesado. El material pulverizado puede, por ejemplo aplicarse a un sitio de herida, se ingiere o se forma en otra forma tal como una cápsula o una tableta. En realizaciones en la cual está presente la sustancia en la forma de una partícula grande tal como una tableta encapsulada en el material electroprocesado, o una molécula atrapada adentro del filamento electroprocesado, la liberación es dictada por una interacción compleja de la velocidad a la que las partículas se disuelven o que degradan y por cualquier interrupción o degradación de la estructura del material electroprocesado. En las realizaciones en las cuales la sustancia comprende las células que expresan uno o más compuestos deseados, los factores que afectan la función y viabilidad de las células, y de la sincronización, de la intensidad, y de la duración de la expresión pueden todos afectar la cinética de la liberación. Productos químicos que afectan la función de la célula, tales como oligonucleótidos, promotores o inhibidores de la adherencia de la célula, hormonas, y los factores de crecimiento, por ejemplo, se pueden incorporar en el material electroprocesado y la liberación de esas sustancias desde el material electroprocesado proporciona unos medios de controlar la expresión u otras funciones celulares en el material electroprocesado.

La cinética de liberación en algunas realizaciones se manipula por la reticulación del material de colágeno electroprocesado por cualesquiera medios. En algunas realizaciones, se alterará reticulando, por ejemplo, la velocidad a la

cual la matriz del colágeno electroprocesado se degrada, o la velocidad a la cual un compuesto se libera del material electroprocesado aumentando la rigidez estructural y el retraso de la disolución subsiguiente del material electroprocesado. Los materiales de colágeno electroprocesado se pueden formar en presencia de agentes de reticulación, o pueden ser tratados con agentes de reticulación después de la electrodeposición. Cualquier técnica para los materiales de reticulación se puede utilizar, como es conocido a un experto en la técnica. Los ejemplos de las técnicas incluyen el uso de agentes de la reticulación y el uso de ciertas radiaciones de reticulación. Ejemplos de los agentes de la reticulación que trabajan con una o más proteínas incluyen pero no se limitan a los agentes de condensación tales como los aldehídos, por ejemplo el glutaraldehído, carbodiimida EDC (1-etil-3(amino-propil-3-dimetil)), materiales fotosensibles que reticulan por la exposición a longitudes de onda específicas de la luz, tetróxido de osmio, hidrocloreuro de carbodiimida, NHS (n-hidroxi-succinimida), y factor XIIIa. La radiación ultravioleta es un ejemplo de la radiación usada para reticular materiales de la matriz en algunas realizaciones. Los materiales naturales pueden ser reticulados a otros materiales naturales. Por ejemplo, el colágeno puede ser reticulado y/o estabilizado por la adición de la fibronectina y/o del sulfato de heparina. Para algunos polímeros el calor se puede utilizar para alterar la matriz y reticular los elementos de la matriz por fusión de los componentes adyacentes de la construcción. Los polímeros pueden también ser solubilizados parcialmente para alterar la estructura del material, por ejemplo por una breve exposición de algunos materiales sintéticos a los alcoholes o las bases pueden disolver y recocer parcialmente filamentos adyacentes. Algunos polímeros pueden ser reticulados usando técnicas químicas de fusión, o de fusión por el calor. Los polímeros sintéticos generalmente pueden ser reticulados usando radiación de alta energía (e.g., haces electrónicos, gamma rayos). Éstos trabajan típicamente por la creación de radicales libres en la espina dorsal del polímero que entonces se une, produciendo acoplamientos reticulados. Los radicales libres de la espina dorsal pueden también ser generados vía los peróxidos, compuestos azo, arilos cetonas, y otros compuestos que producen radicales en presencia del calor o de la luz. Reacciones de reducción - oxidación, las que producen radicales (e.g., peróxidos en presencia de las sales de metales de transición) pueden también ser utilizadas. En muchos casos, los grupos funcionales situados en las espinas dorsales del polímero o en las cadenas laterales se pueden hacer reaccionar para formar acoplamientos reticulados. Por ejemplo, los polisacáridos pueden ser tratados con los diacil-cloruros para formar acoplamientos reticulados del tipo diéster. Reticulación puede también ocurrir después del uso de una matriz cuando sea deseable. Por ejemplo, una matriz aplicada a una herida puede ser reticulada después del uso para reforzar la adherencia de la matriz a la herida.

La cinética de liberación de sustancias es también controlada manipulando la composición química y física del colágeno electroprocesado y otros materiales electroprocesados. Por ejemplo, fibras pequeñas de PGA son más susceptibles a la hidrólisis que fibras de PGA de un diámetro más grande. Un agente entregado dentro de un material electroprocesado integrado por fibras más pequeñas de PGA se libera más rápidamente que cuando está preparado dentro de un material integrado por fibras de un diámetro más grande de PGA.

En algunas realizaciones sustancias tales como péptidos pueden ser liberadas de una manera controlada en un dominio localizado. Los ejemplos incluyen las realizaciones en las cuales la sustancia está química o covalentemente enlazado al material electroprocesado. La formación de los gradientes de péptidos es un componente regulador crítico de muchos procesos biológicos, por ejemplo en la neovascularización. El proceso físico de formación de la matriz electroprocesada del colágeno es otra manera de manipular la cinética de la liberación. En algunas realizaciones, fuerzas mecánicas, tales como compresión, aplicadas al material electroprocesado aceleran la ruptura de la matriz alterando la estructura cristalina del material. La estructura de la matriz es así otro parámetro que se puede manipular para afectar la cinética de liberación. Poliuretanos y otros materiales elásticos tales como poli(etileno-co-acetato de vinilo), siliconas, y polidienos (e.g., poliisopreno), policaprolactona, ácidos poliglicólicos y los polímeros relacionados son ejemplos de materiales cuya velocidad de liberación se puede alterar por tensión mecánica. Las matrices que también contienen esos materiales son así sometidas al control por manipulación física.

La cinética de liberación puede también ser controlada preparando laminados que comprenden capas de materiales electroprocesados con las diferentes características y sustancias. Por ejemplo, las estructuras extendidas en capas compuestas por el colágeno electroprocesado, que se alterna con otros materiales electroprocesados, pueden ser preparadas secuencialmente por electroprocesado de diversos materiales sobre un blanco. Las capas externas se pueden, por ejemplo, adaptar para disolver más rápidamente o más lentamente con respecto a las capas internas. Agentes múltiples pueden ser entregados con este método, opcionalmente a diferentes velocidades de liberación. Las capas se pueden adaptar para proporcionar un perfil complejo de liberación multicinética de único agente en un cierto tiempo. Usando las combinaciones precedentes se pueden proporcionar la liberación de sustancias múltiples, liberada cada uno con un perfil complejo.

Suspender una sustancia en partículas que son incorporadas en el colágeno electroprocesado u otros materiales en la matriz del colágeno proporciona otros medios para controlar el perfil de liberación. Selección de las matrices de la composición de estas partículas más pequeñas proporciona otra manera de controlar la liberación de compuestos del material electroprocesado. El perfil de la liberación puede ser adaptado por la composición del material usado en el proceso.

Las realizaciones también existen en las cuales las sustancias se contienen en liposomas u otras vesículas en la matriz electroprocesada. Las vesículas están preparadas que liberan unos o más compuestos cuando están colocadas en líquidos en un intervalo específico de pH, intervalo de temperaturas, o una concentración iónica. Los métodos para preparar vesículas son conocidos por los expertos en la técnica. El material electroprocesado se puede entregar a un sitio de interés inmediatamente o se almacena, o se secan, o a un pH en el cual la liberación no ocurre, y entonces entregado a una localización que contiene líquidos que tiene un pH en el cual la liberación ocurre. Un ejemplo de

esta realización es un material electroprocesado que contiene vesículas que liberan un compuesto deseado en el pH de la sangre, o de otros líquidos liberados de una herida. La matriz se pone sobre una herida y libera los líquidos en la descarga de líquidos de la herida.

5 Incorporando componentes que son sensibles magnética, o sensible eléctricamente en los materiales de colágeno electroprocesado que proporcionan otros medios de controlar el perfil de liberación. Un campo magnético o eléctrico es aplicado posteriormente a parte o a toda la matriz para alterar la forma, la porosidad y/o la densidad del colágeno electroprocesado. Por ejemplo, un campo puede estimular el movimiento o cambios conformacionales en una matriz debido al movimiento de partículas sensibles magnética o eléctricamente. Tal movimiento puede afectar la liberación
10 de compuestos de la matriz electroprocesada. Por ejemplo, alterar la conformación de la matriz puede aumentar o disminuir el grado al cual el material es favorable para la liberación de compuestos.

En algunas realizaciones, se implantan subdérmicamente componentes sensibles, magnética o eléctricamente, que se han procesado o coprocesado con el colágeno electroprocesado, para permitir la entrega de un fármaco durante
15 un intervalo largo de tiempo. Pasando un campo magnético o campo eléctrico a través del material, se induce la liberación del fármaco. La estructura del colágeno electroprocesado es estable y no cambia substancialmente sin estímulo electromagnético. Tales realizaciones proporcionan entrega controlada del fármaco durante un período de tiempo largo. Por ejemplo, el material de colágeno electroprocesado que tiene características magnéticas o eléctricas y la insulina se pueden fabricar y colocar subdérmica en un sitio discreto. Pasando un campo magnético o un campo
20 eléctrico a través de la composición, se induce la liberación de la insulina. Una estrategia similar puede utilizarse para liberar compuestos de una construcción que tenga elementos sensibles a la luz, exponiendo estos materiales a la luz causa de la ruptura del material en sí mismo y/o causa la liberación de las sustancias que están unidas al material del colágeno electroprocesado por el resto sensible a la luz.

25 En otras realizaciones, las sustancias comprenden vesículas encapsuladas dentro de material del colágeno electroprocesado junto con materiales eléctricos o magnéticos. Las vesículas contienen un compuesto que se liberará de las vesículas. Poner un campo eléctrico o magnético a través del material electroprocesado causa que los compuestos dentro de las vesículas que se liberasen, por ejemplo, deformar las vesículas al punto de ruptura o cambiando la permeabilidad (en algunos casos reversiblemente) del pared de la vesícula. Los ejemplos de estas realizaciones incluyen agentes de transfección, tales como liposomas, que contienen ácidos nucleico los cuales refuerza la eficacia del
30 proceso de entrega de genes a las células.

En otras realizaciones, la composición que comprende el colágeno y las sustancias electroprocesadas son utilizadas como un parche transdérmico para la entrega localizada de la medicación, o de un componente de tal parche. En alguna
35 de estas realizaciones, los materiales conductores están eléctricamente incorporados en tal composición, que entonces se utiliza como componente de un sistema de iontoforésis, en el cual una o más sustancias se entregan en respuesta al paso de la corriente eléctrica. Materiales eléctricamente conductores pueden tener un efecto curativo directo en lesiones de hueso. Para ejemplo, poner una corriente eléctrica pequeña a través del sitio de una fractura promueve la curación. Una imitación mimética electroprocesada del hueso que conduce o produce la corriente se puede hacer y
40 colocar dentro de una fractura. La adición de la corriente eléctrica promueve la curación a una velocidad que sea más rápida que la adición solamente de la composición electroprocesada.

En otras realizaciones, un material de colágeno electroprocesado o una porción suya que contiene propiedades electromagnéticas es estimulado por la exposición a un imán para moverse y de tal modo aplicar o librar de presión
45 física a la cápsula sensible de la presión o a otro recipiente que contiene las moléculas que se liberarán del material. Dependiendo de la realización, el movimiento afectará la liberación relacionada de las moléculas encapsuladas.

La respuesta de la composición a los campos eléctrico y magnético se pueden regular por características tales como la composición del colágeno electroprocesado y los materiales electroprocesados de otra opción, tamaño de los
50 filamentos, y la cantidad de material conductor agregado. La respuesta electromecánica de polianilina es el resultado de cambios de volumen inducidos por el doping, mientras que los gradientes iónicos de los gradientes principales de presión osmótica son responsables del campo inducido por la deformación en geles iónicos tales como poli(ácido 2-acrilamido-2-metil-propan-sulfónico). En cada caso, la cinética del transporte iónico domina la respuesta, y se observa un transporte fácil con las fibras pequeñas. El hinchado de gel y la cinética de reducción se ha demostrado ser proporcional al cuadrado del diámetro de una fibra de gel. Los tiempos de reacción electromecánicos de los paquetes de
55 fibras de menos que 0.1s, son posibles en un músculo típico.

Las realizaciones que implican la entrega de moléculas producidas por las células proporcionan muchos medios por los cuales se puede evitar el rechazo y la respuesta inmunológica a las células. Realizaciones con células de recipiente
60 evitan así problemas asociados al rechazo y respuestas inflamatoria e inmunológica a las células. En realizaciones en que se usan células de un organismo distinto al receptor, la matriz puede secuestrar las células de vigilancia inmune del sistema inmune del receptor. Controlando parámetros como el tamaño de poro del material o matriz electroprocesado, se puede permitir un soporte nutrido de las células almacenadas en la matriz mientras que las células están protegidas de detección y respuesta por el sistema inmunológico del receptor. Como ejemplo, las células de isleta pancreáticas que
65 producen insulina tomada de un donante pueden ser encapsuladas en una matriz electroprocesada e implantadas en un receptor que no puede producir insulina. Este implante puede situarse, por ejemplo, subdermatológicamente, dentro del hígado o intramuscularmente. Para algunas respuestas inmunes, puede no ser necesario un secuestro permanente del sistema anfitrión. El material de colágeno electroprocesado puede estar diseñado para proteger el material implantado

durante una extensión de tiempo dada y luego empezar a colapsar. En aún otras realizaciones pueden usarse bacterias u otros agentes microbianos creados para fabricar el compuesto deseado. Esta realización proporciona las ventajas de usar células que son más fáciles de manipular que las células del receptor de un donante. De nuevo, el material de colágeno electroprocesado puede servir para proteger a las bacterias de una respuesta inmune en esta realización.

5 La ventaja de usar un portador bacteriano es que estos microbios son más fáciles de manipular para expresar una amplia variedad de productos. Las realizaciones en que las células transfectadas de forma transitoria permiten limitar la expresión a un período definido. La ingeniería genética transitoria permite a las células volver a su estado original en las realizaciones en que tal retorno es aconsejable para minimizar los riesgos de complicaciones.

10 En algunas realizaciones, las células están diseñadas genéticamente de modo que la expresión de un gen específico pueda ser promovida o inhibida a través de diversos medios conocidos en la técnica. Por ejemplo, el promotor sensible a la tetraciclina puede ser creado en una secuencia genética. Esta secuencia no es expresada hasta que la tetraciclina esté presente. Los marcadores celulares o los marcadores bacterianos pueden también usarse para identificar el material insertado. Por ejemplo, las proteínas fluorescentes verdes situadas dentro de un material creado genéticamente fulguran
15 verdes cuando se expresan. Las realizaciones que usan esta característica permiten la verificación de la viabilidad de las células, bacterias o secuencias genéticas en una matriz. La visibilidad de este marcador también colabora en la recuperación de una composición electroprocesada implantada.

Aunque la presente invención proporciona versatilidad en cinética de liberación, también existen realizaciones en las que una o más sustancias no son liberadas del colágeno electroprocesado. Las sustancias pueden cumplir una función en un sitio deseado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos de una molécula específica son inmovilizados en una matriz de colágeno electroprocesado y la composición es situada en un sitio deseado. En esta realización, los anticuerpos actúan en la unión de moléculas próximas a la composición. Esta realización es útil para aislar moléculas que se unen a un anticuerpo. Un ejemplo es una matriz de colágeno electroprocesado con contenido
25 en sustratos inmovilizados que ligará irreversiblemente a una enzima no deseada y por tanto desactivará la enzima.

Las composiciones de la presente invención pueden estar combinadas con portadores farmacéutica o cosméticamente aceptables y administrarse como composiciones *in vitro* o *in vivo*. Las formas de administración incluyen inyecciones, soluciones, cremas, geles, pulverizadores, pomadas, emulsiones, suspensiones, microesferas, partículas, micropartículas, nanopartículas, liposomas, pastas, parches, pastillas, dispositivos de administración a través de la piel, vaporizadores, aerosoles u otros medios conocidos para un especialista en la materia. Estos portadores aceptables farmacéutica o cosméticamente son comúnmente conocidos para un especialista en la materia. Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser preparadas por procedimientos conocidos en la técnica y usando ingrediente bien conocidos y fácilmente accesible. Por ejemplo, los compuestos pueden formularse con excipientes, diluyentes o portadores comunes, y presentarse en pastillas, cápsulas, suspensiones, polvos y otros del estilo. Ejemplos de excipientes, diluyentes o portadores apropiados para tales formulaciones son los siguientes: rellenos y unturas (e.g., almidón, azúcares, manitol y derivados silícicos); agentes astringentes (e.g., carboxi-metil-celulosa y otros derivados de la celulosa, alginatos, gelatina y polivinil-pirrolidona); agentes hidratantes (e.g., glicerol); agentes de desintegración (e.g., carbonato de calcio y bicarbonato de sodio); agentes para retardar la disolución (e.g., parafina); aceleradores de la resorción (e.g., compuestos cuaternarios del amonio); agentes tensioactivos (e.g., alcohol cetílico, mono-estearato de glicerol); portadores adsorbentes (e.g., caolín y bentonita); emulsores; conservantes; edulcorantes; estabilizadores; colorantes; agentes aromatizantes; sustancias aromáticas; lubricantes (e.g., talco, calcio y estearato de magnesio); polietil-glicoles sólidos; y mezclas de los mismos.

45 Las expresiones “portador farmacéutica o cosméticamente aceptable” o “vehículo farmacéutica o cosméticamente aceptable” son utilizadas aquí para referirse, sin limitaciones, a cualquier líquido, sólido o semisólido, ya sea acuoso o salino, un gel, crema, bálsamo, solvente, diluyente, pomada, pasta, implante, liposoma, micela, micela gigante y similares, que sea apropiado para usarse en contacto con tejido animal o humano vivo sin causar respuestas fisiológicas o cosméticas adversas, y que no interactúe de forma perjudicial con los otros componentes de la composición. Pueden usarse otros portadores o vehículos farmacéutica o cosméticamente aceptables conocidos por los expertos en la técnica para administrar las moléculas de la presente invención.

Las formulaciones pueden estar constituidas de forma que liberen el ingrediente activo sólo o preferiblemente en una zona en particular, posiblemente durante un período de tiempo. Estas combinaciones proporcionan otro mecanismo más para controlar la cinética de liberación. Los revestimientos, envolturas y matrices protectoras pueden estar hechas, por ejemplo, de sustancias poliméricas o ceras.

Los usos de administración *in vivo* de las composiciones de la presente invención o de formulaciones que comprenden tales composiciones y otros materiales como portadores de la presente invención que son particularmente apropiados por varias razones, incluyen la administración oral (e.g., administración bucal o sublingual), administración anal, administración rectal, administración en supositorios, aplicación tópica, aplicación con aerosol, inhalación, administración intraperitoneal, administración intravenosa, administración a través de la piel, administración intradérmica, administración subdérmica, administración intramuscular, administración intrauterina, administración vaginal, administración en una cavidad corporal, administración quirúrgica en el lugar del tumor o herida interna, administración en el lumen o parénquima de un órgano y administración parenteral. Técnicas útiles en las diferentes formas de administración mencionadas, incluyen, aplicación tópica, ingestión, administración quirúrgica, inyecciones, vaporizadores, dispositivos de entrega a través de la piel, pulverizadores osmóticos, colocación de electrodos directamente en el lugar deseado, u otros medios conocidos para un experto en la materia. Los sitios de aplicación pueden ser externos,

como en la epidermis, o internos, como por ejemplo, en una úlcera gástrica, en un campo quirúrgico o en cualquier otra zona.

Las composiciones de colágeno electroprocesado de la presente invención pueden ser aplicadas en forma de crema, gel, solución, suspensión, liposoma, partículas u otros medios conocidos para un experto en la técnica de la formulación y entrega de compuestos terapéuticos y cosméticos. Los tamaños de partículas ultrafinas de materiales de colágeno electroprocesado pueden usarse para entrega por inhalación de los terapéuticos. Algunos ejemplos de formulaciones apropiadas para administración subcutánea incluyen implantes, depósito, agujas, cápsulas y bombas osmóticas. Algunos ejemplos de formulaciones apropiadas para administración vaginal incluyen pero no se limitan a cremas y anillos. Algunos ejemplos de formulaciones apropiadas para administración oral incluyen: píldoras, líquidos, jarabes y suspensiones. Algunos ejemplos de formulaciones apropiadas para administración a través de la piel incluyen geles, cremas, pastas, parches, pulverizadores y geles. Algunos ejemplos de mecanismos de entrega apropiados para administración subcutánea incluyen implantes, depósitos, agujas, cápsulas y bombas osmóticas. Formulaciones apropiadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estéril acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, búferes, bacteriostatos y disoluciones que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporal pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y pastillas estériles comúnmente utilizados por los especialistas.

Las realizaciones en las que pueden combinarse las composiciones de la invención, por ejemplo, uno o más excipientes o "portadores farmacéutica o cosméticamente aceptables" pueden presentarse ventajosamente en forma de dosis individual y ser preparadas por técnicas farmacéuticas convencionales. Estas técnicas incluyen la etapa de asociar las composiciones que contienen el ingrediente activo y el(los) portador (es) o excipiente(s) farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación íntima y uniforme el ingrediente activo con los portadores líquidos. Las formulaciones preferidas de dosis única son las que contienen una dosis o unidad, una fracción apropiada de las mismas, del ingrediente administrado. Debe entenderse que además de los ingredientes particulares mencionados arriba, las formulaciones que comprenden las composiciones de la presente invención pueden incluir otros agentes usados comúnmente por los especialistas. El volumen de administración variará dependiendo de la ruta de administración. Por ejemplo, las inyecciones intramusculares pueden oscilar en volumen de unos 0,1 ml a 1,0 ml.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse a personas o animales para proporcionar sustancias en cualquier rango de dosis que produzca resultados farmacológicos o fisiológicos deseados. La dosificación dependerá de la sustancia o las sustancias administradas, el punto final terapéutico deseado, la concentración eficaz deseada en el sitio de acción o en un fluido corporal, y el tipo de administración. Información con respecto a las dosis apropiadas de sustancias es conocida para los expertos en la técnica y se puede encontrar en referencias tales como L.S. Goodman y A. Gilman, eds., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ediciones Macmillan, Nueva York, y Katzung, *Basic and Clinical Pharmacology*, Appleton and Lang, Norwalk, Connecticut, (6ª ed. 1995). Un intervalo deseable de dosificación es 0,01 μg a 100 μg . Otros intervalos deseables de dosificación son de 0,1 μg a 50 μg . Otros intervalos deseables de dosificación son de 0,1 μg a 1,0 μg . Un experto en la técnica de la terapia deseada puede elegir dosis e intervalos de dosis específicos, y frecuencia de la administración, según sea necesario por las circunstancias y las sustancias a administrar. Por ejemplo, un especialista en el técnica de la terapia del reemplazo de la hormona puede elegir dosis e intervalos de dosis específicos, y frecuencia de la administración para una sustancia tal como progesterona, para administrarlo conjuntamente con estrógeno y moléculas moduladoras de estrógeno según los requisitos de las circunstancias. Por ejemplo, se puede administrar progesterona y otras progestinas conocidas para un experto en la técnica en cantidades que van de unos 50 μg a 300 μg , preferiblemente de 100 μg a 200 μg , preferiblemente de 1 μg a 100 μg . Las dosis específicas y combinaciones de dosis de estrógeno y moléculas moduladoras de estrógeno y progestinas moduladoras de estrógeno dependerán de la ruta y la frecuencia de administración, y también de la enfermedad que se trate. Por ejemplo, cuando la composición se formula para la administración oral, preferiblemente en la forma de una unidad de dosificación tal como una cápsula, cada unidad de dosificación puede contener preferiblemente de 1 μg a 5 μg de estrógeno y moléculas moduladoras de estrógeno y de 50 μg a 300 μg de progesterona. La Patente de los EE.UU. No. 4 900 734 proporciona ejemplos adicionales de combinaciones de dosis aceptables de moléculas y de progestinas de estrógeno.

Otros usos que implican constituyentes eléctrica o magnéticamente activos

Las composiciones de la presente invención tienen una serie de aplicaciones adicionales aparte de la entrega de la sustancia. Existen realizaciones en que la incorporación de constituyentes eléctrica o magnéticamente activos en el material electroprocesado permite al material electroprocesado moverse rítmicamente en respuesta a un campo eléctrico o magnético oscilante. Tal material electroprocesado puede ser utilizado, por ejemplo, en un dispositivo de ayuda al ventrículo izquierdo proporcionando una acción de bombeo o un masaje ventricular a un paciente de corazón. Las oscilaciones pueden ser logradas por el movimiento pasivo de un campo magnético o eléctrico con respecto al material conductor, o viceversa. Por la manipulación de la selección de material, el material electroprocesado se puede diseñar para permanecer en lugar permanentemente o para disolverse en un cierto plazo, eliminando la necesidad de la cirugía para recuperar el dispositivo una vez que el corazón se hubiera recuperado suficientemente. También existen realizaciones en que el material electroprocesado implantado se utiliza para transportar una carga o corriente eléctrica al tejido. Por ejemplo, los componentes eléctricamente activos se pueden estimular eléctricamente para promover el crecimiento interior, diferenciación de la célula madre, o contracción de los nervios del músculo diseñado, o promover la formación de hueso en los usos ortopédicos en los cuales el material electroprocesado se utiliza como portador para

reconstruir el hueso. En una realización, por ejemplo, el material electroprocesado se aplica a un sitio de lesión del hueso y se utiliza para aplicar una corriente eléctrica al material para facilitar y promover la curación. El uso de una corriente eléctrica pequeña en un hueso dañado se sabe que acelera la curación o promueven la curación de lesiones del hueso.

5 En otras realizaciones que implican los materiales reactivos magnéticamente, un campo magnético se utiliza para colocar un material electroprocesado que contiene sustancias por medios relativamente no invasivos, por ejemplo dirigiendo el movimiento del material dentro del peritoneo. En otras realizaciones, una composición que contiene los compuestos eléctricamente activos se utiliza para producir migración de la célula conducido por campo eléctrico. Este
10 enfoque acelera el proceso curativo y reduce al mínimo el riesgo de la colonización bacteriana. En un ejemplo, un implante ortopédico está cubierto con una capa muy fina (< 100 micrómetros) de un polímero eléctricamente activo. Con un electrodo muy fino unido a la capa, sobre el post-implante, un campo eléctrico puede ser aplicado vía un electrodo externo tal que la migración de la célula conducida por campo eléctrico va hacia la superficie del implante. La dirección puede ser invertida si así se desea. La orientación del campo depende de la geometría del implante y del
15 electrodo externo.

En usos quirúrgicos, péptidos antivascuales o oligonucleótidos contra sentido se pueden incorporar en el material electroprocesado que entonces se envuelve alrededor o es colocado dentro de un tumor el cual es inaccesible para
20 tratamientos convencionales para permitir una liberación y efecto localizados. La liberación de las sustancias antivascuales suprime el crecimiento del tumor. Los oligonucleótidos de antisentido pueden ser liberados de la construcción en el tumor y ser usados para suprimir la expresión de las secuencias génicas en cuestión. En otro ejemplo, las secuencias antisentido dirigidas contra las secuencias génicas que controlan la proliferación puede ser entregado dentro de un molde recubierto de matriz electroprocesada. El estiramiento normalmente asociado a la colocación de los moldes iniciados inicia la proliferación de la célula del músculo blando, y las secuencias antisentido diseñadas para suprimir
25 la división celular reducen los efectos deletéreos de la proliferación de célula del músculo blando asociados al procedimiento. En otras realizaciones, el material electroprocesado entrega oligonucleótidos sentido y antisentido para promover o inhibir la función localizada de la célula por un período de tiempo. Por ejemplo, un oligonucleótido de antisentido se libera del material electroprocesado para suprimir la expresión de una enzima deletérea en una herida. Ejemplos de tales enzimas son las metalo-proteinasas de la matriz (MMPs), que son sobreexpresadas a menudo en he-
30 ridas crónicas. En otro ejemplo, el material electroprocesado aplicado a una herida libera los plásmidos que contienen secuencias del nucleótido que codifican para los inhibidores del tejido de metalo-proteinasas (TIMPs). Las células en la herida expresarán TIMPs, resultando en la entrega local de TIMPs que inhibirá la función de MMP.

35 Ejemplo 1

Liberación del factor de crecimiento de fibroblasto (FGF) de un implante compuesto de colágeno de Tipo I, PGA y PLA

40 El factor de crecimiento del fibroblasto (FGF, obtenido de Chemicon, Temecula, CA) fue disuelto en una solución de material de matriz compuesto de colágeno de Tipo I (80%), PGA (10%) y PLA (10%). Los porcentajes se refieren al peso de los materiales unos respecto a otros. Estos materiales fueron disueltos en HFIP en una concentración final de 0,08 g por ml. Se añadió suficiente FGF a 1 ml de solución para proporcionar una concentración de FGF de 50 ng/ml de la solución electrogiro de colágeno/PGA/PLA. El material fue electrocentrifugado en forma de cilindro sobre la
45 superficie externa de una aguja puesta a tierra y que hace girar 16 cerca de 25-35 milímetros en longitud. Después de la terminación de electrogiro, el material fue retirado de la aguja y el cilindro del electrocentrifugado fue cerrado por suturada pasando una sutura alrededor del exterior de la construcción y tirando para sellar firmemente los extremos. Un resultado similar puede ser obtenido usando un fórceps caliente que se utiliza para pellizcar los extremos juntos y soldar en caliente los extremos cerrados. Se formó una construcción que incluye un hueco. La construcción entonces
50 fue implantada quirúrgica dentro del músculo vasto lateral de una rata. La construcción se dejó en el lugar durante siete días y recuperado para la inspección. FGF en la matriz aceleró la formación del músculo dentro de la matriz del electrocentrifugado promoviendo la formación del músculo dentro de la pared del cilindro del electrocentrifugado.

55 Ejemplo 2

Liberación del Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) de un material del implante que comprende el tipo colágeno de I, PGA y PLA

60 El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, obtenido de Chemicon, de Temecula, CA) fue disuelto dentro de una solución del material de la matriz que comprende el tipo colágeno I (el 80%), PGA (el 10%) y PLA (el 10%) según lo descrito en ejemplo 1. Estos materiales fueron disueltos en HFIP en una concentración final de 0.08 gm por ml. Fue agregado suficiente VEGF a 1 ml de solución para proporcionar una concentración de VEGF de 50 ng/ml de la solución electrogiro de colágeno/PGA/PLA. El material era electrocentrifugado para formar una construcción
65 cilíndrica e implantado en el músculo lateral vastus de la rata utilizando los mismos procedimientos expuestos en el Ejemplo 1. VEGF aumentó la densidad de los tubos capilares funcionales que estaban presentes a través de la construcción. Esto fue evidenciado por la presencia de tubos capilares continentes células de sangre rojas (RBCs).

Ejemplo 3

Liberación de VEGF de construcciones de Colágeno electroprocesado, PGA, y PLA

Las construcciones el colágeno electroprocesado y PGA: Copolímero del PLA, con VEGF hecho girar en la matriz fueron preparados usando el colágeno y el 20% PGA del 80%: Pla. El colágeno y el PGA: El PLA fue disuelto en HFIP en a concentración combinada final de 0.08 gm por soluciones del ml fueron preparados en que diversas cantidades de VEGF estaban agregado a 1 ml de la solución del colágeno y de PGA: Copolímero del PLA. Las soluciones separadas para electrogiro eran preparado conteniendo 0 ng, 25 ng, 50 ng, y 100 ng por cada uno de VEGF en 1 ml de solución electrogiro. Construcciones fueron preparados para cada solución electrogiro 1 ml del material sobre una construcción cilíndrica (2 mm en diámetro). Las construcciones fueron retiradas de la aguja del blanco y cortar adentro a medias. Una mitad de cada muestra del electrocentrifugado entonces fue expuesta a fijación del vapor del glutaraldehído para reticular fibras del colágeno. El ligarse reticulada fue logrado cerca exponiendo las construcciones al glutaraldehído vaporizarse por 15 minutos. Para la fijación del vapor, las muestras del electroprocesado las construcciones fueron puestas en un tejido de 100 milímetros plato de cultivo. Unas placas de cultivo del tejido de 35 milímetros que contiene 1 ml de el 50% el glutaraldehído fue colocado dentro de los 100 milímetros plato de cultivo del tejido. La tapa de cultivo del tejido de 100 milímetros las placas fue substituido y la muestra fue permitida sentarse para 15 minutos en la temperatura ambiente. El vapor fijado y las muestras de las construcciones desmontadas del electrocentrifugado entonces estaban sumergido en PBS y la cantidad de VEGF (expresado en picogramos por 1 mg de material del electrocentrifugado) para las muestras ligadas y reticuladas no de la reticulación eran medidas en diversas horas se presentan en los Figuras 7 y 8, respectivamente. La liberación de VEGF en el PBS fue medido en función de tiempo por el método de ELISA. El kit de ELISA para VEGF fue comprado de Chemicon InternaTional (número de pieza cyt214) y las direcciones proporcionaron en el kit fueron seguidos para realizar al ELISA. Muestras fueron centrifugados para retirar la materia de partículas y almacenado en -20C antes del uso.

En la Figura 7 y la Figura 8, los diamantes abiertos representan la liberación del electrocentrifugado de las fibras de la solución que contiene PGA: Copolímero y colágeno del PLA al cual no se agregó ningún VEGF. Los cuadrados abiertos representan liberar de las fibras de electrocentrifugado de la solución que contiene PGA: Copolímero y colágeno del PLA al cual 25 ng de VEGF fueron agregados. Los círculos abiertos representan la liberación del electrocentrifugado de las fibras de una solución conteniente PGA: Copolímero y colágeno del PLA al cual 50 ng VEGF fueron agregados. Los triángulos abiertos representan la liberación del electrocentrifugado de las fibras de una solución conteniente PGA: Copolímero y colágeno del PLA al cual 100 ng VEGF fueron agregados. Los resultados demuestran no solamente que la matriz libera VEGF en PBS pero también que la reticulación con glutaraldehído retarda la liberación de la matriz.

Ejemplo 4

Matriz del colágeno de electroprocesado: islote pancreático

Una mezcla de las células de secreción cultivadas de la insulina sembradas en la matriz electroprocesada del colágeno para formar el tejido que contenía el colágeno electroprocesado. La matriz electroprocesada que contenía la insulina que secretaba las células se implanta en un recipiente diabético en la necesidad de la insulina. Esto electroprocesado colágeno o tejido que contiene la fibrina-contiene opcionalmente un recipiente. Se implanta la matriz en el espacio retroperitoneal y el recipiente está anastomosado en la circulación porta hepática. La insulina se libera de la célula que contiene insulina y se transmite a la circulación.

La matriz electroprocesada que contiene las células de secreción de la insulina se suple opcionalmente con las células que sintetizan y secretan el glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático, o combinaciones de éstas, para imitar el complemento hormonal del islote pancreático.

Opcionalmente, células heterólogas, (por ejemplo, bacterias o células dirigidas de un donante coespecífico) se colocan en una matriz con un tamaño de poros que permita la difusión de nutrientes a las células pero no permite o inhibe o retrasa la detección de las células por el sistema inmune del recipiente.

Ejemplo 5

Matriz del colágeno de Electroprocesado para la reparación de la herida

Queratinocitos se cosechan de un sitio sano de un paciente que sufre de una herida crónica. Las células han crecido en cultivo y transferido por la electroporación a VEGF expreso. Luego, las células transferidas se mezclan o preparadas en una matriz del colágeno del electrocentrifugado. Antisentido oligonucleótido para los metalo-proteinasas de la matriz (MMPs) también se hace girar en la matriz. La matriz tópicamente se aplica a la superficie de la herida. Las células cerca y adentro el implante toman las secuencias contrarias, expresan sus secuencias del gen transferido y la producción de MMP se reduce. En otros usos las células pueden estar genéticamente diseñadas para secretar VEGF, de tal modo promoviendo curativo. La liberación de los oligonucleótidos del antisentido suprime la expresión de MMPs, que están típicamente sobreexpresadas en una herida crónica. Así el sitio de la herida se repara con un implante que promueve simultáneamente natural respuestas curativas. Opcionalmente, la matriz está hecha por fibrina o una mezcla de fibrina y de colágeno. La fibrina las ayuda en la cesación de la sangría y promueve la curación.

Ejemplo 6

Matriz del colágeno de electrocentrifugado para la reparación del hueso

5 Osteoblastos de un paciente con lesión del hueso se cultivan y se incorporan en una matriz del electrocentrifugado que comprende el colágeno de tipo I. La matriz se forma en forma de una cavidad o de un defecto en el sitio de lesión. El factor de crecimiento del hueso (BGF), la proteína morfogénica del hueso (BMP) o secuencias de los genes que codifican para estas proteínas, están electrocentrifugados en la matriz y se incorporan opcionalmente en la matriz del electrocentrifugado. La matriz ayuda el crecimiento del hueso nuevo, y el BGF o el BMP en la matriz promueven el
10 crecimiento del hueso.

Opcionalmente, el colágeno usado se produce *in vitro* por las células dirigidas genéticamente que expresan un colágeno polímero con más sitios del p 15 que en colágeno normal. El exceso de los sitios del p 15 promueve osteoblastos para producir y secreta el hidroxipatita y ayuda el crecimiento adicional del hueso.

15 Opcionalmente, la matriz está electroprocesado más a fondo con los polipirroles, que son eléctricamente materiales activos. Los electrodos se unen a cada extremo de la matriz implantada. Luego los electrodos cargados se aplican a la superficie sobre los electrodos para crear un eléctrico pequeño corriente a través del implante para facilitar curativo de lesión del hueso. En otra realización los elementos piezoeléctricos pueden estar el electrocentrifugado en la matriz
20 para producir descargas eléctricas que promueven la curación.

Ejemplo 7

Matriz de colágeno electroprocesada: Parche Cardíaco

25 En este ejemplo se prepara un parche cardíaco. Se prepara una lámina de material electroprocesado con filamentos alineados de colágeno. La lámina se dobla como una lámina plisada de la forma deseada y o se enrolla en un cilindro. Una segunda construcción es electrohilada en la forma deseada, por ejemplo un rectángulo. La lámina plisada que remeda las capas celulares del corazón intacto se inserta en la forma rectangular electroprocesada. La construcción se
30 llena con células, se cierra con sutura y se coloca en un bioreactor o directamente *in situ*. Al alinear las fibrillas de la lámina plisada electrohilada en paralelo con el eje mayor de la forma rectangular externa se obtiene una construcción del tipo del músculo cardíaco. El tejido cardíaco nativo está compuesto por capas de células dispuestas a lo largo de un eje común con capas adyacentes de células ligeramente desalineadas respecto al eje con las capas suprayacente y subyacente. Esta estructura puede ser remedada más precisamente por los métodos descritos más adelante en los cuales
35 se prepara una matriz y las células son directamente electroprocesadas, rociadas o goteadas sobre la matriz a medida que se prepara. Las células en contacto con las fibrillas de colágeno que están dispuestas a lo largo del eje mayor de la lámina se distribuyen en paralelo con las fibrillas subyacentes de la lámina, formando una construcción muscular de células dispuestas y depositadas en un modelo de organización de tipo in-vivo. La construcción se implanta directamente o se coloca en un bioreactor RCCS. Los regímenes de rotación para mantener este tipo de construcción en
40 suspensión en el bioreactor RCCS van de 4 a 20 rpm, dependiendo de la masa del tejido y de los materiales específicos usados para fabricar el cilindro externo. Variaciones de este diseño incluyen la adición de factores angiogénicos a la matriz, secuencias de genes, y agentes para suprimir la inflamación y/o el rechazo. Puede añadirse otros tipos de células a la construcción, por ejemplo, células endoteliales microvasculares, para acelerar la formación de un sistema capilar dentro de la construcción. Pueden usarse otras variaciones en este principio de diseño. Por ejemplo, las células
45 pueden electroprocesarse dentro de la matriz a medida que se deposita en la placa de masa. Variando el paso de las fibras durante el hilado y rociado, goteado o electroprocesado de células sobre las fibras a medida que se depositan se controla de forma muy precisa el posicionamiento de las células dentro de la construcción.

Ejemplo 8

50 *Electrohilado de colágeno del tipo I*

Se utilizó colágeno de Tipo I (piel de ternero, SigmaChemical Co.).El colágeno fue suspendido en 1.1.1.3.3.3-hexafluoro-2-isopropanol (HFIP) en una concentración de 0.1181 gramos en 3 ml HFIP. Una vez en solución o suspensión (solución de color lechoso), la solución se cargó en una jeringuilla de émbolo de 1 ml. Un adaptador luer de calibre 15 fue luego colocado en la jeringuilla para actuar como boquilla de electrohilado y punto de carga para la solución de colágeno contenido. La jeringuilla llenada fue colocada dentro de una bomba de jeringuilla (KD Scientific) preparada para dispensar la solución a 18 ml/h utilizando un émbolo de jeringuilla de 1.0 ml (Becton Dickinson). El borne positivo de la alimentación a alta tensión fue unida a la porción metálica del adaptador de espiga luer. Se arrancó la bomba de jeringa. El suministro de alta tensión se conectó y ajustó a 20 kilovoltios. El objetivo puesto a tierra era un mandril de acero inoxidable 303 (anchura 0.6 centímetro x altura 0.05 centímetros x longitud 4 centímetros puesto aproximadamente a 6 pulgadas de la punta del adaptador. Se hizo girar el mandril aproximadamente 500 rpm durante el proceso de hilado. Cerca de 1 ml de la solución de colágeno fue electrohilada para formar una placa blanca sobre el mandril puesto a tierra. Después del electrohilado, la placa de colágeno fue retirada del mandril y procesada por
65 microscopia electrónica de barrido. La placa producida tenía aproximadamente 200 micras de espesor.

La microscopia electrónica de transmisión reveló un diámetro aproximado de fibra de colágeno de 100 nm y la típica banda de 67 nm indicativa de la polimerización del colágeno nativo (Figura 9).

Ejemplo 9

Electrohilado de colágeno y elastina

Los métodos para este ejemplo son iguales que en el ejemplo 8 a excepción de la solución electrohilada. En este caso, la solución electrohilada consistió en 0.1155 gramos de colágeno, 0.1234 gramo de elastina del ligamento nual (Fluka), y 5 ml HFIP. Cerca de 2 ml de la suspensión fue hilado para formar la placa. La placa producida aproximadamente 50 micras de grosor.

10 Ejemplo 10

Electrohilado de colágeno de tipo I, colágeno de tipo III y elastina

Los métodos para este ejemplo son iguales que los del Ejemplo 8 a excepción de la solución electrohilada. En este ejemplo, el electrohilado de la solución se componía de 0.067 gramos de colágeno de tipo I, 0.067 gramo del colágeno tipo III, 0.017 gramo de elastina del ligamento nual, y 2 ml HFIP (44% del tipo I, 44% del tipo III y 12% de elastina). Este ratio es similar al encontrado en el tejido de la pared arterial natural. Las placas producidas eran aproximadamente de 100 micras de grosor.

20 Ejemplo 11

Electrohilado de colágeno (tipos I y III), reticulado, análisis estructural y ensayo de resistencia

Se usó colágeno soluble en ácido, liofilizado en toda la experimentación. A menos que se indique otra cosa todos los reactivos fueron comprados a Sigma Chemical Company (St. Louis, Mi). Para este estudio, se usó colágeno de Tipo I de piel de ternero, y colágeno tipo I y tipo III aislado de placenta humana. El colágeno fue disuelto en varias concentraciones en 1.1.1.3.3.3 hexafluoro-2-propanol (HFIP). Se colocaron suspensiones de colágeno en una jeringuilla de 1.0 ml montada en una bomba de jeringa (modelo 100, KD Scientific Inc., New Hope, PA). La jeringuilla fue tapada con una aguja de punta roma de calibre 18. El borne positivo de una fuente de alto voltaje (Spellman CZE1000R; Spellman High Voltage Electronics Corp.) fue unido por medio de una grapa alligátor a la superficie externa de la aguja metálica de la jeringa. Un objetivo cilíndrico (0.6 centímetro de ancho x 0.05 centímetro de alto x 4 centímetros de largo) puesto a tierra fabricada a partir de acero inoxidable 303 montó a 4-6 pulgadas de la punta de la jeringuilla. En el inicio del electrohilado, la bomba de jeringa se preparó para dispensar la solución fuente a regímenes variando de 0-25 ml/h. Simultáneamente, el alto voltaje se aplicó a través de la solución fuente y del mandril objetivo puesto a tierra (15-30 kilovoltios (kv)). El mandril giraba a aproximadamente 500 rpm, a menos que se indicare otra cosa. En resumen, durante el proceso de electrohilado fueron examinados el isotipo y concentración del colágeno, voltajes impuestos, la distancia de paso de aire, y los caudales. El colágeno Tipo I de piel de ternero fue electrohilado sobre una plataforma cilíndrica de cultivo de diámetro 4 milímetros (longitud = 1 cm). Las construcciones se reticularon se ligó en vapor de glutaraldehído durante 24 horas a temperatura ambiente y luego aclaradas mediante varios cambios de solución salina fosfatada.

Ejemplo 12

Ensayo de varias condiciones para el electrohilado de colágeno

La experimentación preliminar identificó al HFIP como un disolvente preferido para el electrohilado de colágeno. HFIP es un disolvente orgánico, volátil con un punto de ebullición de 61°C. El electrohilado de las fibras del colágeno exhibió una dependencia de la concentración respecto de los diámetros finales de fibra producida. Por ejemplo, en una concentración de 0.008 g/1.0 ml los extractos ácidos del colágeno de tipo I (piel de ternero) eran fácilmente solubles en HFIP. Sin embargo, en esta concentración el colágeno no exhibió ninguna evidencia de electrohilado (formación de fibra) y, sin importar el voltaje de entrada, la solución del polímero formó gotitas y se escapó de la punta de la jeringuilla. Un aumento en diez veces de la concentración del colágeno a 0.083 g/ml dio lugar a una suspensión nubosa y formación de fibras durante el electrohilado. Estas fibras fueron recogidas como una placa no tejida sobre el mandril blanco. Un aumento adicional de la concentración del colágeno en la solución fuente no alteró grandemente la formación de fibra.

A continuación, se examinaron los parámetros de la entrada de tensión. El colágeno de tipo I se suspendió en HFIP en 0.083 g/ml y luego sometido a tensiones variando entre 15 y 30 kilovoltios en incrementos de 2.0 kilovoltios. La formación de la fibra fue muy importante a 25 kilovoltios (magnitud del campo eléctrico = 2000 V/cm.). La variación de la distancia de paso de aire entre la solución fuente y el objetivo puesto a tierra a este voltaje de entrada afectó de modo marcado el proceso de electrohilado. La distancia óptima de paso de aire fue aproximadamente 125 milímetros. Las fibrillas de colágeno podían ser hiladas en distancias de paso de aire sustancialmente más cortas, sin embargo, estas fibrillas conservaron considerable solvente y fueron recogidas en el objetivo en un estado húmedo. Cuando la distancia de paso de aire excedió un intervalo crítico de 250 milímetro que las fibras electrohiladas no pudieron ser recogidas en el mandril objetivo.

El campo eléctrico generado en el proceso de electrohilado era suficiente extraer la solución fuente del colágeno de un depósito de la jeringuilla. Sin embargo, es posible generar una placa de colágeno más uniforme midiendo al

que se entrega la solución fuente del colágeno al campo de electrohilado vía una bomba de jeringa. La formación de la fibra fue óptima cuando la solución fuente del colágeno fue dispensada al campo eléctrico a una velocidad de aproximadamente 5.0 ml/h. A velocidades más lentas de dispensación, la formación de la fibra fue inconsistente.

- 5 La rotación del mandril objetivo también afectó la deposición del colágeno. Las fibrillas del colágeno electrohilado sobre un mandril girando a una velocidad de menos de 500 r.p.m. produjeron una matriz de filamentos porosa aleatoria. Aumentar la velocidad del mandril a 4.500 RPM (superficie del mandril moviéndose a aproximadamente 1.4 m/s) resultó en deposición de fibrillas en disposiciones lineales, paralelas a lo largo del eje de rotación. El análisis por microscopia electrónica de transmisión de fibrillas alineadas y no alineadas reveló que todos estos filamentos exhibieron las bandas de 67 nm que son características del colágeno natural.

Se midió el perfil tensión-deformación de este tipo de andamiaje de colágeno electrohilado

- 15 Se electrohiló colágeno de tipo I de piel de ternero en condiciones óptimas sobre un mandril rectangular objetivo girando a 4.500 r.p.m. El andamiaje fue retirado del objetivo y conformado en hojas de 25 milímetros (longitud) x 25 milímetros (anchura). Bajo las condiciones usadas para fabricar esta matriz el andamiaje promedió 0.187 milímetro en diámetro de sección. Se cortaron muestras replicadas en tiras que eran bien paralelas o perpendiculares al eje principal de rotación del mandril. Este enfoque permitió el examen de cómo la dirección local de fibra modula las características materiales de la electrohilada. El ensayo de materiales de los andamiajes en paralelo con el eje principal de alineación de la fibrilla indicó una carga media de 1.17 ± 0.34 N a rotura con una tensión máxima de 1.5 ± 0.2 MPa. El módulo promedio para las muestras longitudinales fue 52.3 ± 5.2 MPa. En orientación reticulada de la fibra la carga máxima a rotura fue 0.75 ± 0.04 N con una tensión máxima de 0.7 ± 0.1 MPa. El módulo a través del eje largo de la fibra era 26.1 ± 4.0 MPa. Estos datos indican que la orientación local de las fibras que componen un andamiaje electrohilado modula directamente las características materiales de la matriz creada. La incorporación de vario grados de reticulación que se ligan en este tipo de matriz no tejida se puede utilizar para adaptar más en detalle las características materiales de la matriz a los usos específicos.

- 30 La identidad y fuente del colágeno fueron investigadas a los efectos sobre el proceso de electrohilado. El colágeno de Tipo I aislado de placenta humana fue electrohilado usando las condiciones optimizadas para el colágeno tipo I de piel de ternero. Con respecto al colágeno de piel de ternero, el electrohilado de este material produjo una matriz menos uniforme de fibras. Los filamentos individuales variaron de 100-730 nm en diámetro. El colágeno de 0.083 g/ml usado en estos experimentos parece representar una concentración crítica de transición para el colágeno de tipo I cuando se aísla de la placenta. El aumento de la concentración del colágeno placentario humano presente en la solución fuente (viscosidad creciente en el electrohilado de la solución fuente) manteniendo iguales todas las otras variables, parece favorecer la formación de fibras de mayor diámetro. Inversamente, disminuyendo el concentración de la solución fuente (viscosidad decreciente en el electrohilado de la solución fuente) pareció el diámetro promedio del filamento y produce una matriz compuesta sobre todo de fibras de 100 nm.

- 40 La secuencia primaria del colágeno afecta directamente la formación de este polímero en el proceso de electrohilado. Intentos preliminares de electrohilar colágeno de tipo III indicaron que la concentración óptima de este péptido es aproximadamente 0.04 g/ml HFIP, un valor 50% menor que la concentración óptima de la piel de ternero del tipo I. El electrohilado de colágeno Tipo III a 0.04 g/ml HFIP, usando todas las otras condiciones optimizadas para el electrohilado de colágeno de piel de ternero tipo I, produjo fibras con diámetros promedio de 250 ± 150 nm. La relación de colágeno del tipo I y tipo III dentro del ECM natural afecta las características estructurales y funcionales de la red en base a colágeno. Mezclando concentraciones óptimas de colágeno placentario humano tipo I (0.08 g/ml HFIP) y colágeno placentario humano tipo III (0.04 g/ml HFIP) en proporción 50:50 (concentración final de colágeno 0.06 g/ml) afectó la formación de fibrillas durante el proceso de electrohilado. Bajo condiciones optimizadas de electrohilado para el colágeno de piel de ternero de tipo I, el material mezclado formó un andamiaje compuesto de fibras que promediaron de 390 ± 290 nm en diámetro (figura 10).

- 50 La reticulación también fue investigada. Con independencia de la cantidad de tiempo que las placas de colágeno fueron expuestas a luz UV, cada muestra se disolvió inmediatamente cuando fueron colocadas en medios calientes. La exposición al glutaraldehído produjo resultados algo diferentes. Mientras que las placas de 1, 2, y 5 minutos se disolvieron en los medios calientes, la velocidad a la que esto ocurría era más lenta que para las placas expuestas a UV en cualquiera de los intervalos del tiempo investigados. Las placas de 10 y 20 minutos llegaron a ser algo transparentes cuando se colocó en los medios pero no se disolvieron. La placa expuesta durante toda la noche al glutaraldehído apareció algo más oscura en color que cuando se colocó en la cámara. Tenía una conformidad muy pequeña y cuando se colocó en los medios no se disolvió ni mostró ningún signo de adelgazamiento. La exposición de placas de 45:35:20 (colágeno tipo I, III, elastina) al glutaraldehído por más de 10 minutos produce reticulado bastante para hacer la placa insoluble.

Ejemplo 13

Propiedades biológicas del colágeno electrohilado

- 65 Las propiedades biológicas del colágeno electrohilado fueron examinados en experimentos de cultivo de tejido. Células del músculo liso aórtico fueron suspendidas en un biorreactor de RCCS y depositadas en forma de lámina sobre diversas formulaciones de colágeno electrohilado. El entorno de baja rigidez y alto en nutrientes producido por

el biorreactor RCCS fomenta las interacciones matriz-célula y la formación de masas de tejido a gran escala *in vitro*. El examen microscópica de estos cultivos reveló que los andamiajes estaban densamente poblados con las células de músculo liso, en el plazo de siete días. El análisis seccional indicó que el colágeno electrohilado promovió una infiltración celular extensa en la red fibrilar. Se observaron células de músculo liso profundamente dentro la matriz y completamente enredadas dentro de las fibrillas del colágeno electrohilado.

Ejemplo 14

Biocompatibilidad de la matriz de Colágeno Electrohilado-Elastina In vivo

Para investigar la biocompatibilidad material *in vivo*, se implantaron matrices de colágeno electrohilado 80: 20 tipo I/elastina en ambas piernas traseras de una rata de Sprague Dawley (Charles River) durante 2 semanas. La rata hembra usada para este estudio pesó aproximadamente 200 g. Fueron implantadas construcciones cilíndricas para probar el funcionamiento de esta plataforma particular de fabricación. Antes de cirugía, la rata fue anestesiado con una inyección i.p. de pentobarbital (5-7 mg/100 g de peso corporal). Se hizo una incisión 10-15 milímetros de longitud a lo largo de la porción lateral del miembro trasero directamente superior al músculo *vastus lateralis*. Un canal pequeño fue preparado en el interior del músculo por disección roma. Las construcciones de colágeno electrohilado/elastina fueron puestas en el canal. El músculo endógeno fue suturado de nuevo junto al material implantado, la incisión de la piel fue reparado y el área fue irrigada con betadine. Después de 14 días el animal fue sedado con una inyección IP de Pentobarbital y sacrificado por neumotórax bilateral. El colapso del pulmón fue verificado visualmente e fue recuperado el tejido implantado para evaluación histológica. Para la preparación histológica, este tejido se fijó durante 24 horas en fijador Kamovsky de intensidad media, encajado y seccionado en espesor.

Para ver la infiltración de la célula *in vivo*, los recipientes fueron visto bajo e SEM. La eliminación de los recipientes del modelo rata después de una semana rebeló migración de las células, infiltración, y cobertura similar a los recipientes después de dos semanas en cultivo. No había inflamación (hinchazón) en o alrededor del área de la implantación. La rata también exhibió movimiento fluido alrededor de la jaula. No había encapsulación visible de las fibras de colágeno en la matriz, y en su lugar casi la matriz entera del recipiente fue cubierta con células esqueléticas del músculo de la rata.

Ejemplo 15

Infiltración de células en las matrices electroprocesadas in vitro

La investigación por SEM de las tres matrices de tipo I/elastina 80: 20 depositadas cultivadas con células de músculo liso revelaron una unión y maduración importantes de células, incluyendo migración celular tridimensional en la matriz. Después de solamente una semana, había migración y ligación visibles de las células, según lo visto explorando con microscopía electrónica de barrido (Figura 11).

Después de 2 semanas en los biorreactores, la maduración de las células fue mucho más importante. Las células parecieron formar una capa confluyente a través de la región luminal del tubo. SEM (microscopía electrónica de barrido) de una sección transversal tubular mostró migración de las células y remodelación de la región central de la pared. No fue observada migración celular a la región externa de la pared del andamiaje en los tubos de dos semanas. Sin embargo, la región de centro de la pared fue infiltrada totalmente antes de la cobertura de la región luminal.

Después de 3 semanas en cultivo, se formó una capa completamente confluyente alisa de células de músculo liso a través de la superficie lumina del recipiente. Aumentó la migración celular hacia la región externa del recipiente en la muestra de dos semanas. Mientras que algunas células no maduras seguían siendo visibles en la superficie luminal, ninguna fibra de colágeno era visible.

Bajo tinto histológica (H&E y tricromo), se vió infiltración celular en las muestras de 2 y 3 semanas. Mientras que era evidente la remodelación de la matriz en la muestra de 2 semanas, era mucho más pronunciada en la muestra de 3 semanas. Esta remodelación parece ser más luminal, ya que se observa en esa región una capa de la matriz de alguna forma laminar. Además, las muestras de de 3 semanas demostraron infiltración de células de músculo liso (SMC) de forma general, según lo evidenciado por igual densidad celular en toda la pared de la muestra.

Ejemplo 16

Demostración del diseño del ligamento

Para determinar la viabilidad del diseño del ligamento, 4.0 ml de tipo I de colágeno al 96% de y elastina al 4% eran electrocentrifugado sobre un mandril cuadrado de 25 x 25 milímetros. La muestra era electrocentrifugada usando los mismos métodos referidos en Ejemplo 8. La placa resultante después fue fijada y sembrada con las células de fibroblasto por 3 horas en un compartimiento sembrador. La placa sembrada entonces fue colocada en cultivo de cámara rotatoria para 1 semana para permitir la infiltración de la célula. Después de 1 semana en cultivo, la placa fue sostenida en ambos extremos con las abrazaderas estériles de teflón y rotada a la derecha en un extremo hasta que se sentía resistencia. Los fibroblastos adicionales fueron sembrados en la placa torcida por 3 horas en un compartimiento

sembrador. La matriz entonces fue retirada y colocada en cultivo de cámara rotatoria por otra 1 semana, después de lo cual fue fijada para SEM e histología.

Demostración del diseño del cartílago

5 Para las investigaciones del diseño del cartílago, la viabilidad de crecimiento del condrocitos en el tipo colágeno II electrocentrifugado fue determinada. Inicialmente, una muestra de 100 mg del tipo colágeno II fue colocado en 1.1.1.3.3.3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) en una concentración de 0.10 g/ml, y electrocentrifugado. La muestra era electrocentrifugada usando los mismos métodos referidos en el ejemplo 8. Una vez que el volumen entero de 1 ml de la solución del colágeno de tipo II fue hecha rotar, las placas electrocentrifugadas resultantes fueron retiradas del mandril y fijadas en glutaraldehído al 3% gaseoso para formar una matriz fija de colágeno de tipo II, según lo demostrado explorando por microscopia electrónica (figura 12). Una solución de condrocitos suspendidos en el medio (1.000.000 células) después fue agregada a la matriz y colocada en un compartimiento sembrador por 3 horas. Las placas entonces fueron retiradas del compartimiento y cultivadas por 1 y 2 semanas respectivamente en un sistema rotatorio de cultivo de células. La muestra de la semana 1 demostró cobertura casi completa en el lado sembrado y algo de remodelación dentro de la placa (figura 13).

Muestra de diseño prostético de tres capas

20 En una tentativa de imitar de cerca la distribución fisiológica de una matriz de una proteína de un vaso sanguíneo de diámetro pequeño, fue producida una mezcla 80:20 de 3 ml de colágeno del tipo I/elastina en una concentración de 0.083 g/ml y electrocentrifugada sobre un mandril tubular (4 milímetros D.I.), retirada y fijada en glutaraldehído gaseoso al 3%. La muestra era electrocentrifugada con los mismos métodos relacionados en el ejemplo 8. Similar a una pared fisiológica del vaso, esta capa sirve como una pared externa del prostético que se sembrará con los fibroblastos y células del músculo liso. El tubo fue atado cerco en ambos extremos con la sutura catgut, su superficie externa fue sembrada con fibroblastos, y colocada en un sistema rotatorio de cultivo de células. Después de 4 días en cultivo, el tubo fue retirado, desatado en un extremo, y una solución suspendida de células de músculo liso fue inyectada en el lumen del tubo. Abierto de nuevo el extremo entonces, fue atado con la sutura y el tubo era colocado en cultivo por 4 días. Mientras que permanecía el primer tubo en cultivo, un segundo tubo que consistía en la elastina al 70% y un tipo I al 30% era electrocentrifugado sobre un mandril con un D.I. de 2 milímetros. Después de la fijación, el tubo de D.I. de 2 milímetros fue deslizado dentro del tubo de D.I. de 4 milímetros, y dos fueron colocados en la cámara rotatoria para cultivo por 3 días. Esto fue hecho para asegurar la migración de SMC en el tubo más pequeño. Después de 3 días en cultivo, las células endotelial humanas de la vena umbilical fueron inyectadas en el interior del tubo de D.I. de 2 milímetros y cultivadas por 2 días más. El prostético resultante después fue retirado y fijado para la histología.

Ejemplo 17

Matriz acuosa electroprocesada de fibras de tamaño nano

40 En esta realización el agua fue utilizada como solvente portador para entregar el colágeno de la cola de rata para electroprocesado. Para aumentar la volatilidad del agua, fue conducido el electrogiro en al vacío. El dispositivo consistió en dispositivo de electrogiro estándar que consiste en una fuente de solución (agua/colágeno), una fuente de alto voltaje (30,000 V), y una tierra.

45 Los frascos de vacío fueron unidos en tándem y conectados a una bomba de impulsión directa. El compartimiento usado para el electrogiro fue tapado con un tapón de goma. Una jeringuilla de 1 ml equipada con una aguja de 30 calibre fue pasada a través de un puerto que se preparó en el tapón. Una válvula de 2 vías fue colocada entre la fuente de la jeringuilla y la jeringuilla. El puerto de la jeringuilla era cerrado y la bomba era iniciada. El compartimiento se le dejó bombear a un vacío por 5-10 minutos. El volumen total de dos los frascos de vacío era aproximadamente 6.25 litros. Una vez el equilibrio fue establecido, la manguera que conectaba la bomba con el primer compartimiento del vacío fue sellada con una abrazadera. La parada el martillo en la jeringuilla fue abierto y la solución del colágeno (colágeno de 5 mg/ml) fue cargado al solvente 20-25 kV. Inicialmente fue goteado de la fuente de la jeringuilla, cuando el voltaje alcanzó un nivel crítico tuvo lugar una formación transitoria de un cono de Taylor y de la formación subsiguiente de fibras. Mientras que el agua se evaporaba y el vacío se disipaba el proceso de electrogiro era cesado. 55 La SEM demostró que las fibras parecían exhibir un poco de subestructura fina y la evidencia de una periodicidad congregada. Las fibras seleccionadas se acercaron a un milímetro en longitud linear total, y las fibras en la escala de diámetro de submicrómetros.

Ejemplo 18

60 *Desarrollo de las válvulas dirigidas tejido del corazón y Hojas de la válvula del corazón que utilizan una matriz de Electrocentrifugado*

Una matriz polimérica se forma directamente en un mandril (molde) para producir una válvula del corazón, o de hojas de la válvula del corazón. Recipientes con las puntas unidas de las micropipetas (inyectores) se llenan de las soluciones del colágeno y de las soluciones poliméricas, y colocados a una distancia de un blanco puesto a tierra. El blanco puesto a tierra es un mandril de metal (superficie no adherente). Un filamento fino se coloca en la solución dentro de cada una de las puntas de las pipetas (inyector de spray) para cargar la solución polimérica, o la fusión a un alto

voltaje. En un voltaje específico, la solución polimérica, o la fusión suspendida, en la punta de la pipeta se dirige desde la punta de la pipeta hacia el blanco puesto a tierra (mandril). Esta corriente (derrame) de la solución comienza cuando un monofilamento, situado entre una pipeta punta y el blanco puesto a tierra, se convierte en multifilamentos (fenómenos conducidos por el campo eléctrico). Esto permite la producción de una estructura “tipo tela” a acumular en el sitio del blanco. Cuando se alcanza el blanco puesto a tierra, los multifilamentos se recogen y secan para formar la matriz polimérica interconectada en 3 D (tela). En los experimentos para probar la eficacia de este enfoque, esta técnica fue utilizada para producir filamentos biodegradables de polímeros de ácidos poliláctico/poliglicólico (PLA/PGA;50/50) y poli(etileno-co-acetato de vinilo) ambos de los cuales fueron disueltos en cloruro de metileno.

El electrogiro de los andamiajes poliméricos para las válvulas del corazón y las hojas de la válvula del corazón podría ser al azar en la orientación, pero se producen generalmente en orientaciones específicas según lo descrito abajo. Si la fibra deseada es longitudinal en la orientación, entonces el mandril/substrato blanco puesto a tierra es movido perpendicular al derrame polimérico. Esta configuración permite la producción directa de matrices tubulares compuestas sobre todo por fibras orientadas específicamente (una sola orientación).

La orientación específica en este caso se desea cualquiera con respecto al eje principal del blanco puesto a tierra. Esta orientación es controlada por el movimiento simultáneo de rotación y longitudinal del mandril/blanco puesto a tierra. Esto permite la producción de una matriz compuesta de un paso específico o un conjunto de pasos múltiples (configuraciones tramadas en reticulado).

Si se utilizan los materiales biodegradables, las sustancias tales como ácidos nucleicos (vectores) se agregan opcionalmente en la solución polimérica de electrogiro para la incorporación en el andamiaje. Después de la consumición/reorganización del andamiaje por las células sembradas, las células incorporan el vector (es decir, es ingeniería genética) en su ADN y producen un efecto deseado. Factores de crecimiento u otras sustancias se incorporan opcionalmente en la matriz electrocentrifugada como ayuda en la regeneración/curación del tejido.

Ejemplo 19

Capa de electrogiro de un stent con las soluciones del polímero

Para este ejemplo, 1/7 p/vol del polímero (95% PGA y 5% PCL) en HFIP fueron utilizados. El voltaje aplicado era 24.5 kilovoltios con una distancia desde la punta de la jeringuilla a la superficie del stent (stent Palmaz-Schatz) de 7 pulgadas. El girar era realizado por aproximadamente 20-30 segundos. Para hacer girarlo, el stent fue montado en una aguja de 25 calibre, por el centro y doblado a un ángulo de 90 grados en el extremo de sustentación en su lugar en la aguja en el stent durante la rotación del stent/mandril durante el electrogiro. El montaje plástico de la jeringuilla fue asegurado al final de un mandril de diámetro de 4 milímetros en un aparato de giro para la rotación durante el electrogiro para obtener una distribución uniforme de la capa. El despliegue del stent fue realizado colocando dos agujas de calibre 25, a través del lumen del stent y físicamente tirando el stent abierto. El stent estaba uniformemente cubierto con fibras de PGA-PCL, y su diámetro era en 83% mayor que antes del despliegue.

Ejemplo 20

Procedimiento de stent recubierto con colágeno electrocentrifugado

Una aguja del calibre 25 fue insertada a través del centro del stent (stent Palmaz-Schatz). Para asegurar que el stent permaneciese en la aguja durante la rotación del mandril, la punta de la aguja fue doblada 90°. La aguja unida al stent y el stent entonces fueron unidos al extremo de una extensión de metal del mandril (2 milímetros de D.I.) Después de que el stent fuera preparado, 0.080 g del colágeno (tipo I de la cola de la rata) fue puesto en 1 ml de solución de HFIP. La solución del colágeno entonces fue colocada en una jeringuilla de 1 ml y fue unida una aguja del calibre 18, con su terminación embotada. La muestra fue electrocentrifugada usando los mismos métodos expuestos en el ejemplo 8. Aproximadamente 400 μ l de la solución fueron electrocentrifugados sobre el stent. El stent después de retirada de la aguja fue ensayado por SEM. Los resultados se comparan en las figuras 14 y 15. Las fibras del colágeno de electrocentrifugado recubrieron el stent.

Ejemplo 21

Ingeniería vascular de árbol

Las fibras electrocentrifugadas se forman sobre un mandril de cualquier forma. Así, un árbol vascular se hace con múltiples bifurcaciones que es una estructura continua sin costuras. Un ejemplo es el electrogiro de un puente (bypass) árbol vascular coronario para un procedimiento cuádruple de puente. El molde puede incluso ser el acostumbrado hecha uniforme (a medida de 3 D hecho por biosimulación de la estructura), o los árboles vasculares podían ser diseñados para cumplir con la especificación media de la población con varias dimensiones disponibles.

Un injerto ilíaco aórtico bifurcado de rata sin costuras fue producido de poli(etileno-co-acetato de vinilo). Para este ejemplo el molde fue formado de una barra de acero inoxidable y un clip de papel. El polímero fue entonces electrocentrifugado para formar una bifurcación sin costuras alrededor del molde. La bifurcación fue entonces justo deslizada del mandril como una construcción sin costuras.

Ejemplo 22

Electrogiro en bioingeniería de aplicaciones biomédicas: Un estudio de bioingeniería de electrogiro del 111musclo

5 PGA, PLA, PGA:PLA, y el colágeno fueron preparados suspendidos (peso 7-8% por volumen) en HFIP (Sigma, St. Louis). Las varias soluciones del polímero fueron cargadas en una jeringuilla de 1 ml, cargada a 20 kilovoltios y dirigida a un mandril rotatorio puesto a tierra a través de un abertura de aire de 25-30 cm. Las construcciones usadas en este estudio fueron preparadas en una aguja del calibre 14 y 20-25 milímetros en longitud. Las construcciones cilíndricas fueron retiradas de los mandriles y esterilizadas en alcohol al 70% antes del uso.

10 *Aislamiento de células*

Las ratas neonatales fueron sacrificadas y la piel fue retirada. El músculo esquelético fue disecado de los miembros y del tórax, picado y sometido a una digestión de la colagenasa de 12 horas (actividad de colagenasa 200 unidades/ml, 15 Worthington bioquímico, NJ). En la conclusión de la digestión el tejido era canulado, filtrado a través un filtro de acoplamiento de 100 micrómetros y diluido en DMEM-F12 suplido con el suero del caballo al 10% (Sigma, St. Louis) y suero vacuno fetal al 5% (Mediatech, VA). Los fibroblastos eran purificados parcialmente del aislado por una, dos horas de un ciclo de adherencia diferenciada. Los mioblastos parcialmente purificados eran suspendidos en el colágeno (1 mg/ml) y colocados en un electrocentrifugador de construcción cilíndrica. Células aisladas en las construcciones 20 cilíndricas fueron cultivadas por 24 horas en un Synthecon Biorreactor de pared rotatoria (Houston, TX) antes de la implantación.

Procedimientos Quirúrgicos

25 Ratas adultas Sprague Dawley (150-200 g) fueron anestesiadas con pentobarbital. La piel sobre el cuarto trasero fue retirada. La piel fue lavada en betadina y una incisión fue preparada dentro del vientre de los *vastus lateralis* (vasto externo). Las construcciones cilíndricas fueron puestas dentro del canal oculto. El músculo de sobreposición fue suturado sobre el implante y la piel de la incisión fue reparada. El área entera entonces fue limpiada una segunda vez con betadina. Los implantes fueron recuperados siete días después y preparados para la examinación histológica 30 y ultraestructural. Todo el tejido fue fijado rutinariamente por 24 horas en arreglo Karvonsky antes del procedimiento rutinario por microscopia de luz o electrónica de transmisión.

Los experimentos preliminares del implante fueron conducidos para caracterizar las características biofísicas del electrocentrifugado PGA, PLA, PGA: PLA o mezclas del colágeno de tipo I y PGA: Pla. Ratas de Sprague Dawley 35 adultas (150-200 g) fueron anestesiadas y un canal pequeño fue preparado adentro del *vastus lateralis*. Construcciones cilíndricas (electrocentrifugadas en una aguja de 14 calibre, de aproximadamente 25 milímetros de longitud) compuesta del PGA, PLA, PGA: Mezcla del PLA (50: 50) electrocentrifugados o una mezcla del colágeno de tipo I:PGA:Pla (80: 10: 10) fueron preparadas y colocadas en el canal. Los extremos distales de las construcciones electrocentrifugadas fueron suturadas, cerradas para formar un cilindro cerrado. Las construcciones entonces fueron colocadas en los 40 canales preparados. La mezcla de pequeñas cantidades de PGA:PLA con el colágeno electrocentrifugado produjeron una matriz de fuerza material considerable que aceptó una sutura. La matriz electrocentrifugada simultáneamente funciona como una envoltura fascial y una inserción tendinosa para el músculo biodiseñado. Una vez que los implantes estaban en lugar, el músculo fue suturado para cerrar sobre el implante y la incisión de la piel fue reparada. El objeto de estos experimentos era determinar el grado al cual diversos materiales integran y permiten la infiltración de células 45 del tejido circundante en las construcciones. Después una semana las muestras fueron recuperadas y preparadas para evaluación microscópica.

Las construcciones de PGA fueron integradas mal en el tejido del anfitrión. Una cápsula fibrótica era claramente evidente en la interfaz del implante y del músculo del tejido circundante del anfitrión. Las células redondeadas grandes, 50 multinucleadas, que se presumía eran macrófagas, eran evidentes en los dominios inmediatamente subyacentes a la cápsula fibrótica. Pocas células invadían más allá de la periferia de la construcción. Los dominios centrales de los implantes fueron ocupados por los remanente de la matriz y estaban casi desprovistos de células. Construcciones integradas por el PLA no promovieron la formación de la cápsula fibrótica prominente que caracterizaban los implantes de PGA. Estos implantes exhibieron una transición más suave en la zona en la interfaz de la construcción y del tejido 55 del anfitrión. Las células fueron dispersadas a través de los implantes cilíndricos. Los vasos sanguíneos pequeños del calibre fueron observados dentro de en la matriz basada en PLA. Una subpoblación de células dentro del PLA basada en los implantes manchados intenso con tetróxido de osmio, y parecían haber acumulado los lípidos. Características biofísicas de las construcciones compuestas por mezclas 50/50 de PGA:PLA eran intermedias. Una zona fibrótica en el borde del implante era evidente. Algunas células grandes, multinucleadas estaban presentes en la zona de la transición, 60 sin embargo la mezcla de PGA:PLA no parecía promover la acumulación de estas células en el mismo grado que construcciones basadas en PGA. Un número pequeño de células invadieron el núcleo central de las construcciones, las células positivo grandes del osmio estaban ausentes.

Por el contrario con estos resultados, los implantes fabricados de fibras de mezclas del colágeno de tipo I:PGA:PLA 65 (80: 10: 10) fueron poblados densamente con las células del tejido circundante. No había evidencia de una cápsula fibrótica en la zona de la transición. Numerosos vasos sanguíneos estaban presentes a través de las construcciones. Las células dentro de la matriz electrocentrifugada eran alargadas y orientadas en paralelo el eje local de la matriz electrocentrifugado. Los dominios centrales de los implantes fueron poblados densamente con las células. La

matriz basada en colágeno fue integrada bien en el tejido anfitrión y apoyó la formación de tubos capilares y de arteriolas.

Después, una matriz basada en colágeno de tipo I fue investigada para determinarse cómo funcionaría como una plataforma para la entrega de células exógenas para recibir el tejido. Construcciones cilíndricas compuestas por el tipo I del colágeno electrocentrifugado PGA:PLA (80: 10: 10) o mezcla 50:50 de PGA: PLA fueron preparadas. Las construcciones fueron suturadas cerradas en un extremo y llenadas de una suspensión de células de mioblastos enriquecidos. Después de la suplementación de mioblastos, el extremo abierto de la construcción fue sellado con un segundo sistema de suturas, formando un cilindro cerrado. Las construcciones eran entonces colocadas dentro de un canal preparado en el *vastus lateralis* de la rata. Como antes, el tejido de superposición del músculo fue suturado sobre los implantes. Después de siete días los implantes basados en colágeno fueron integrados bien en el tejido del anfitrión. No había evidencia de la inflamación o de la encapsulación fibrótica. En conjunto, las construcciones fueron pobladas densamente con las células. Las arteriolas y los tubos capilares eran evidentes a través de los implantes. Como antes, las células dentro de la matriz electrocentrifugada fue orientada en paralelo a la orientación local de los filamentos del colágeno. Los miotubos diferenciados fueron concentrados dentro, pero no limitados, a estos dominios. En algunos dominios restrictos los miotubos fueron organizados en órdenes paralelas. Sin embargo, los miotubos a menudo en otras secciones del implante fueron orientados a lo largo de eje enteramente diverso. Los núcleos centrales de los implantes fueron llenados de las células, los miotubos diferenciados fueron observadas de vez en cuando. Vasos sanguíneos funcionales se mezclaron con células del dominio central del núcleo. Por el contrario con estos resultados, los músculos biodiseñados fabricados en las plataformas PGA: PLA fueron encapsulados con una cápsula fibrótica y fueron integrados pobremente en el tejido circundante del anfitrión. Las células multinucleadas grandes se alinearon en mucha de la zona fronteriza a lo largo de la interfaz del implante y del tejido endógeno. La masa de células que existió dentro del las construcciones cilíndricas aparecían estar delaminadas de las paredes internas del implante.

En el corto plazo del estudio del implante, el tejido diseñado fue colocado en un estado descargado dentro del vientre del músculo del *vastus lateralis* de la rata. Para examinar cómo las fuerzas mecánicas asociadas a la actividad pudieron afectar la diferenciación y la integración del músculo biodiseñado, se realizaron estudios del implante de tendón-tendón. Fueron preparadas construcciones electrocentrifugadas compuestas por mezclas (80: 10: 10) de colágeno de tipo I: PGA: PLA, llenadas de un suspensión enriquecida con mioblastos y selladas. El tejido diseñado entonces fue pasado profundamente al vientre del *vastus lateralis* dentro del plano, el cual separa este músculo de los músculos subyacentes de los cuádriceps. El extremo próximo del implante fue suturado al tendón del origen para el músculo del *vastus lateralis*. El extremo distal fue suturado a la inserción tendinosa de este músculo. La incisión fue reparada y a las ratas les fue permitido recuperarse durante ocho semanas. Durante este intervalo los animales estaban rutinariamente observados, no había indicación de malestar, comportamiento o movimiento anormal.

En la recuperación, el tejido implantado exhibió características a la luz y ultraestructurales microscópicas clásicas del músculo distinguido. Muestras del tejido tomadas en punto medio entre el origen y el sitio de inserción exhibidos órdenes en paralelo de los miotubos que fueron empacados densamente con las miofibrillas. Las bandas adyacentes Z estaban en registro lateral completo en muchos de los miotubos. Subdominios dentro de alguno de estos miotubos fueron manchados más intenso con mancha violeta azul/cristalina del toluidina que los subdominios adyacentes. Por el contrario con estos resultados, los miotubos localizados en los extremos distales de los implantes no exhibieron alineación paralela. En las secciones longitudinales, los miotubos individuales exhibieron un perfil convolucionado. Dentro de cualquiera miotubos dados, las miofibrillas fueron empacadas denso con el sarcoplasma, y las bandas Z estaban en alineación lateral. La naturaleza convolucionada de estos miotubos puede reflejar el proceso de la fabricación. Estos dominios están en la vecindad inmediata de las suturas usadas para incluir las construcciones, y anclar posteriormente los implantes a los adosados tendinosos de los *vastus lateralis*. Las fuerzas mecánicas colocadas a través de estos dominios pueden ser muy complejas, resultando en la diferenciación pero con pobre alineación de los miotubos. En el nivel ultraestructural el tejido diseñado exhibió órdenes paralelos de las miofibrillas entremezcladas con mitocondrias. El retículo sarcoplásmico invirtió estos filamentos y terminó en asociación con los túbulos en T a nivel de las bandas Z. Un porcentaje pequeño de los miotubos exhibidos evidencian anomalías estructurales; las sarcómeras con patrones accesorios de bandas fueron evidentes. Fueron observadas las bandas electrónicas densas ocasionalmente de cualquier lado de las bandas Z, cerca de la frontera de A I. Fueron también observadas bandas de los dobletes M y H en algunos miotubos.

Ejemplo 23

Electrogiro del colágeno a partir de 2,2,2-Trifluoro-etanol

El colágeno usado era del tipo I (cola de rata, extraído con ácido). El colágeno fue suspendido en 2,2,2-trifluoro-etanol (TFE) en una concentración de 0.100 gramo en 4 ml HFIP. Una vez en la solución o suspensión (solución de un color lechoso), la solución fue cargado en el émbolo de una jeringuilla de 10 ml. Una aguja de espiga del calibre 18 fue colocada entonces en la jeringuilla para actuar como el inyector de electrogiro, y el punto de carga para la solución contenida de colágeno. La jeringuilla llena fue colocado en una bomba de jeringuilla (KD Scientific) puesta a punto para dispensar la solución a la velocidad de 11 ml/h, utilizando un émbolo Becton Dickinson de la jeringuilla de 10 ml. La toma positiva de la fuente de alto voltaje fue unida a la porción del metal del adaptador de la espiga. La bomba de la jeringuilla fue puesta en marcha y la fuente de alto voltaje se estableció para 20 kilovoltios. El blanco puesto a tierra era un mandril de acero inoxidable 303 (0.6 centímetro W x 0.05 centímetro H x 4 centímetros L) puestos aproximadamente a 6 pulgadas de la punta del adaptador. En el experimento, la solución del colágeno fue

electrocentrifugada para formar una agradable, placa blanca en el mandril puesto a tierra. Después del electrogiro, la placa del colágeno fue retirada del mandril y procesada para la evaluación por la microscopia electrónica de barrido. La placa producida era aproximadamente 100 micrómetros de grosor. El tamaño medio de la fibra en esta placa era 0.11 ± 0.06 micrómetros. El TFE no modifica la estructura secundaria del colágeno, según lo demostrado por transformadas de Fourier de la espectroscopia infrarroja.

Ejemplo 24

Migración de las células del músculo liso en Poli(láctico ácido) electrocentrifugado y de Colágeno/Elastina

Fue construido un andamiaje para el desarrollo de un injerto vascular de diámetro pequeño usando migración de nanofibras de colágeno electrocentrifugado/elastina, y fueron examinadas células del músculo liso (SMC) en este andamiaje en relación a un andamiaje de poli(ácido láctico) electrocentrifugado. Fueron electrocentrifugados los tubos de diámetro de cuatro milímetros preparados a partir de poli(ácido láctico) (PLA) (Alkermes, Inc.) y de mezcla 80:20 de colágeno (tipo I)/elastina, respectivamente, con un grosor de pared en el intervalo de 300-400 micrómetros y una longitud de 1 centímetro. Las muestras fueron electrocentrifugadas con los mismos métodos disponibles en el ejemplo 8. Éstas construcciones cilíndricas fueron puestas en un recipiente de 55 ml STLV (Sistema rotatorio de cultivo de células, "Rotary Cell Culture System", Synthecon, Inc.) con células del músculo liso aórtico (500.000 SMC/ml) para la siembra. Los medios de cultivo fueron cambiados cada dos días sin agregar células adicionales. Los andamiajes fueron retirados del recipiente STLV y procesados por la microscopia electrónica de barrido (SEM) y evaluaciones histológicas. En la examinación de los andamiajes, la matriz electrocentrifugada de colágeno/elastina reveló un tamaño medio de poros de 3.7 ± 1.6 micrómetros y dimensión de la fibra de 0.08 ± 0.02 micrómetro. Mientras que fue demostrada la migración SMC a través de la pared del andamiaje después de 1 semana, la migración de las células fue mucho más prominente después 2 semanas. Después de 3 semanas en cultivo, fue encontrada una capa SMC completamente confluyente en las superficies externas junto con una alta densidad de SMCs a través de la pared del andamiaje (una distribución uniforme a través de la pared). La examinación del andamiaje de PLA reveló una dimensión media de poros de 26 ± 4 micrómetros y dimensión de la fibra de 10 ± 1 micrómetros. Los injertos del PLA demostraron una migración limitada de SMC en el núcleo de la pared. Incluso después de 111 días, las células formaron una capa predominantemente confluyente en las superficies externas del andamiaje cilíndrico con escasas células encontradas en la sección transversal del andamiaje.

Los presentes resultados demuestran que las células emigrarán a los andamiajes compuestos por nanofibras del colágeno electrocentrifugado/elastina con dimensiones de poros de algunos micrómetros, por el contrario con los puntos de vista presentes que los tamaños de poros de 10-30 micrómetros no permitirían la infiltración/migración celulares. El andamiaje de colágeno electrocentrifugado/elastina no sigue el paradigma aceptado según lo evidenciado por los 3.7 micrómetros de dimensión media de poros, donde uno esperaría de poca a ninguna migración celular en base de la estructura. Así, en un orden de magnitud de la disminución en el tamaño de poros (respecto al PLA), el SMCs comenzó inmediatamente a emigrar en esta estructura fina de diámetro de poros. Estos resultados son un soporte de paradigma según en el cual las células emigrarán en andamiajes del colágeno electrocentrifugado (nanoestructurado) basado en los usos del campo entero de ingeniería de tejidos.

Ejemplo 25

Colágeno electrocentrifugado/nano-fibras poliméricas y el paradigma de nano-poros

Se han hecho estructuras electrocentrifugadas compuestas por nanofibras poliméricas con nanoporos y proporcionan un nuevo paradigma para los usos médicos. Las muestras eran electrocentrifugadas que usando los mismos métodos expuestos en ejemplo 8. SEM de una matriz del colágeno electrocentrifugado de tipo I reveló ramificación compleja de filamentos con un 0.1 ± 0.04 micrómetro de diámetro medio. El diámetro de poros para este andamiaje eran 0.74 ± 0.56 micrómetro con un intervalo a partir de 0.2-2.3 micrómetros. Células del músculo liso fueron cultivadas con la matriz en un sistema rotatorio de cultivo (Synthecon, Inc.). El andamiaje electrocentrifugado de colágeno después de 21 días en cultivo mostraron infiltración celular extensa de las células del músculo lisas en la matriz de nano-estructura del colágeno con una distribución uniforme de las células a través de la sección transversal entera del andamiaje nanoestructurado producido.

Por el contrario, el PLA electrocentrifugado permitió una leve migración de SMCs (sobre todo una monocapa de células en las superficies externas) en el núcleo de la estructura, incluso después de 111 días. Los resultados demuestran que las células emigrarán en una estructura de diámetros de poros inferior a micrómetros creada con las fibras de nanómetros del colágeno electrocentrifugado.

Ejemplo 26

Laminados por electrogiro en capas

Se describe un método para formar materiales compuestos por fibras distribuidas a lo largo de diversas orientaciones. Este método proporciona la capacidad de formar una plantilla para el montaje de una construcción multiextendida del órgano cual no requiere que las células de electrogiro estén directamente en la matriz.

Material de la matriz, polímeros biocompatible, las mezclas u otros materiales son electrocentrifugado sobre un mandril rotatorio como blanco. Este mandril es cilíndrico, o de cualquier otro forma deseada. Un mandril y un colágeno rectangulares blanco se utilizan en este ejemplo aunque otros materiales y otras formas de mandriles se pueden emplear y son considerados dentro del alcance de la presente invención. La primera capa del colágeno es electrorrociada sobre el mandril, formando una capa de filamentos alineados distribuidos a lo largo de eje de la rotación. Después, en una capa segunda, soluble en agua, de filamentos tales como PEG, PVOH, u otra matriz es preparada sobre la primera capa. Esta capa intermedia es rociada desde una fuente separada. Para evitar la interrupción, la capa del colágeno puede ser estabilizada por reticulada por UV, productos químicos u otros medios antes de la aplicación de la capa soluble en agua. Después, una segunda capa del colágeno es electropulverizada sobre la capa intermedia soluble en el agua (la capa 2 en este ejemplo). Esta tercera capa puede estar en la misma orientación que la capa inicial del colágeno o en diferente orientación que la capa inicial del colágeno. En haciendo un corazón o un vaso sanguíneo, esta tercera capa está levemente desplazada con respecto a la primera capa (no a lo largo del mismo eje que la primera capa, sino levemente desplazada respecto al eje imitador de la alineación estructural del corazón intacto). Después, las capas del colágeno son estabilizadas usando agentes de fijación por el vapor, u otra de estabilización. El proceso para la estabilización ocurre después en cada capa sucesiva para estabilizarlas a diferentes grados, o en la terminación del proceso de fabricación en o fuera del mandril blanco. Capas selectivas del colágeno o todas las capas del colágeno se suplen opcionalmente con adicionales sustancias semejantes como factores de crecimiento u otros agentes por ejemplo secuencias de la ADN, productos farmacéuticos, otros péptidos según lo descrito en la descripción. Proceso posterior a las construcciones puede también ser realizado. El número de las capas que se prepararán varía con el uso y está esencialmente no limitado.

Luego la construcción se retira después opcionalmente de el mandril y sumergido en agua. Esto da lugar al retiro selectivo de las láminas solubles en el agua. Otros solventes y las combinaciones son también posibles en esta estrategia del diseño y no se limitan a la combinación descrita dentro esta descripción. Si las capas del colágeno han sido preparadas a lo largo de diversas vías, se compone la construcción final de dos diversas capas del colágeno con polaridades leves o muy diversas.

La construcción ahora está preparada para la siembra de células. En este ejemplo el extremo distal de la construcción se sella y las células se infiltran en el lumen central (sitio donde el mandril existió). Las células ahora están dentro capas separadas y distintas. Este tipo de construcción se puede utilizar para muchos usos tales como la fabricación de una guía de nervios. La construcción cilíndrica se infiltra selectivamente con células (u otros materiales) en la capa externa. Células de Schwann, que rodean y protegen el nervio natural, pueden ser utilizadas. Este dispositivo se puede utilizar como guía del nervio, ya que las células de Schwann están en la localización necesaria para infiltrar la capa interna de la célula y cubrir el nervio cuando se regenera. La velocidad de infiltración de células a través de la capa del colágeno interno se retrasa opcionalmente usando un PGA: formulación del colágeno o un laminado de PGA, o acelerada haciendo la capa interna solamente de colágeno. En una guía del nervio la adición de laminina y otros materiales de la membrana el núcleo están opcionalmente empleados para acelerar, promover o apoyar el nuevo crecimiento del nervio. Los gradientes de los factores de crecimiento se utilizan opcionalmente a lo largo de la longitud de la construcción.

En otro uso de este método, la alineación de las células puede ser controlada dentro de una construcción sólida a lo largo del eje escogido. Este tipo de construcción es deseable para la fabricación del músculo esquelético, pero no se limita a este uso. Una envoltura exterior está preparada, en este ejemplo se describe la construcción cilíndrica compuesta por el colágeno, pero la invención no se limita a este tipo de diseño. Después, una hoja plana del material es electrocentrifugada sobre un mandril rectangular rotatorio. Se fabrica una hoja compuesta por el colágeno alineado y se sitúa en paralelo al eje de la rotación. La hoja se retira del mandril y se rueda o doblada en plisados (o según lo deseado) en paralelo al eje de las fibrillas. La hoja ahora se inserta (resbala) en la envoltura externa cilíndrica. Se compone la estructura que resulta de una envoltura cilíndrica que “se llena” con la hoja plisada o rodada del colágeno. El extremo se sella y se llena con las células. La malla resultante es un cilindro semisólido que tiene núcleo base de las fibrillas del colágeno (o de otras fibrillas) puestas en orden a lo largo del eje largo del cilindro. Las células sembradas en este tipo de la construcción se colocarán en paralelo a las fibrillas subyacentes de la hoja plisada. Esta invención es útil como una guía de nervios, en la formación de vasos sanguíneos, en la formación órganos basados en el músculo liso y otras aplicaciones.

Referencias citadas en la descripción

Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 4164559 A, Miyata
- US 5580859 A
- US 5910488 A

ES 2 312 495 T3

- US 5908777 A
- US 5787567 A
- 5 • US 6010573 A, Bowlin
- US 5723324 A, Bowlin
- US 5714359 A, Bowlin
- 10 • US 4900734 A

Literatura no relacionada con patentes citada en la descripción

- 15 • **BRANNON-PEPPAS**, LISA. Polymers in Controlled Drug Delivery. *Medical Plastics and Biomaterials*, November 1997.
- The Pharmacological Basis of Therapeutics. Macmillan Publishing.
- 20 • **KATZUNG**. Basic & Clinical Pharmacology. *Appleton & Lang*, 1995.

REIVINDICACIONES

- 5 1. El colágeno electroprocesado que comprende fibras del colágeno electrocentrifugado que tienen un patrón de banda repetido, en donde el patrón de banda repetido ocurre en un espaciamiento de 65 nm a 67 nm.
2. El colágeno electroprocesado de la reivindicación 1 en una matriz.
3. La matriz del colágeno electroprocesado de la reivindicación 2, que comprende además una o más sustancias.
- 10 4. La matriz del colágeno electroprocesado de la reivindicación 3, en donde una o más sustancias son células.
- 15 5. La matriz del colágeno electroprocesado de la reivindicación 3, en donde una o más sustancias son terapéuticas, cosméticas, factor de crecimiento, inductor de la diferenciación, antioxidante, vitamina, hormona, ácido nucleico, péptido, emoliente, humectante, o acondicionador.
- 20 6. La matriz del colágeno electroprocesado de la reivindicación 2, que comprende además material electroprocesado adicional, en donde el material electroprocesado adicional es uno o más materiales naturales, uno o más materiales sintéticos, o una combinación de éstos.
7. Un tejido diseñado que comprende la matriz del colágeno electroprocesado de la reivindicación 2 y células.
8. Una construcción que comprende la matriz del colágeno electroprocesado de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.
- 25 9. Un método de entregar una sustancia a la localización *in vitro* deseada que comprende:
combinación de la sustancia con el colágeno electroprocesado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes; y,
30 colocación del colágeno electroprocesado combinado con la sustancia en la localización deseada.
10. Un método de fabricación del colágeno electroprocesado de la reivindicación 1, o la matriz del colágeno electroprocesado de la reivindicación 2, que comprende:
35 electrodeposición de una o más soluciones cargadas eléctricamente que comprenden colágeno o moléculas capaces de formar colágeno en un sustrato blanco puesto a tierra en condiciones eficaces para electrodpositar colágeno o moléculas capaces de formar colágeno en el sustrato para formar el colágeno electroprocesado o la matriz del colágeno electroprocesado.
- 40 11. Un método de fabricar el tejido diseñado de la Reivindicación 7, que comprende:
electrodeposición de una o más soluciones cargadas eléctricamente que comprenden colágeno o moléculas capaces de formar colágeno sobre un sustrato blanco puesto a tierra en condiciones eficaces para depositar el colágeno electroprocesado o las moléculas capaces de formar el colágeno, y la adición de células sobre
45 o en el sustrato.
12. Un método de evaluar una respuesta biológica de una célula a una sustancia, que comprende:
50 aplicación de la sustancia a la matriz del colágeno electroprocesado y células de la reivindicación 4; y,
evaluación de la respuesta biológica de la célula.
13. Uso del colágeno electroprocesado de cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la entrega de una sustancia
55 o un material electroprocesado a una localización *in vitro* deseada.
14. El uso proporcionado en la reivindicación 13, en donde la sustancia comprende una o más moléculas, células, objetos, o combinaciones de éstos.
- 60 15. El uso proporcionado en la reivindicación 13, en donde la sustancia comprende una sustancia terapéutica, una sustancia cosmética o una combinación de éstas.
16. Uso del colágeno electroprocesado de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6 para la preparación de un medicamento útil para la entrega de una sustancia o un material electroprocesado.
- 65 17. El uso proporcionado en la reivindicación 16, en donde la sustancia comprende una o más moléculas, células, objetos, o combinaciones de éstos.

ES 2 312 495 T3

18. El uso proporcionado en la reivindicación 16, en donde la sustancia comprende una sustancia terapéutica, una sustancia cosmética o una combinación de éstas.

5 19. El colágeno electroprocesado de la reivindicación 1, en donde el colágeno electroprocesado es el tipo de colágeno I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII o XIX.

20. El colágeno electroprocesado de la reivindicación 19, en donde el colágeno electroprocesado es colágeno del tipo I, II o III.

10 21. El colágeno electroprocesado de la reivindicación 1, en donde el patrón de bandas repetido ocurre en un espaciado de 67 nm.

22. El colágeno electroprocesado de la reivindicación 1, que comprende además una o más sustancias.

15 23. El colágeno electroprocesado de la reivindicación 1, que además comprende material electroprocesado adicional que comprende uno o más materiales naturales, uno o más materiales sintéticos, o una combinación de éstos.

24. El colágeno electroprocesado de la reivindicación 1, que además comprende uno o más polímeros sintéticos.

20 25. El colágeno electroprocesado de la reivindicación 22, en donde una o más sustancias son una o más células.

26. El colágeno electroprocesado de la reivindicación 22, en donde una o más sustancias se seleccionan entre: elastina; laminina; integrina; o proteoglicano o una combinación de éstos.

25 27. El colágeno electroprocesado de la reivindicación 1, en donde el colágeno electroprocesado se selecciona entre el grupo que consta de colágeno natural, procolágeno, colágeno modificado genéticamente; colágeno modificado químicamente, o una combinación de éstos.

30

35

40

45

50

55

60

65

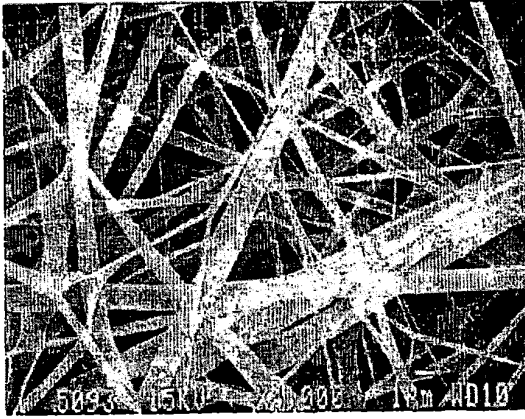


FIGURA 1

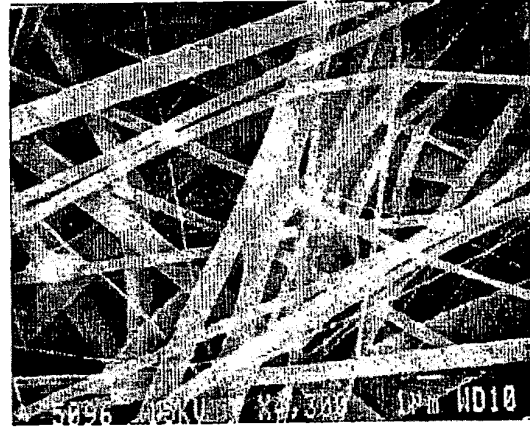


FIGURA 2

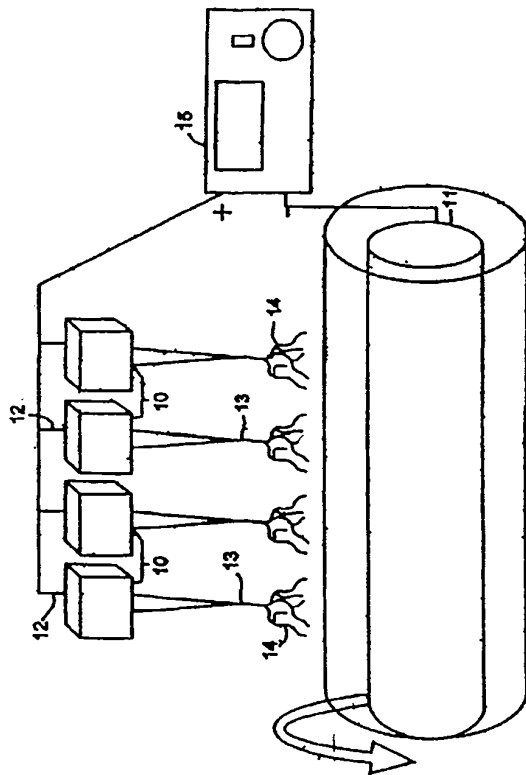


FIGURA 3

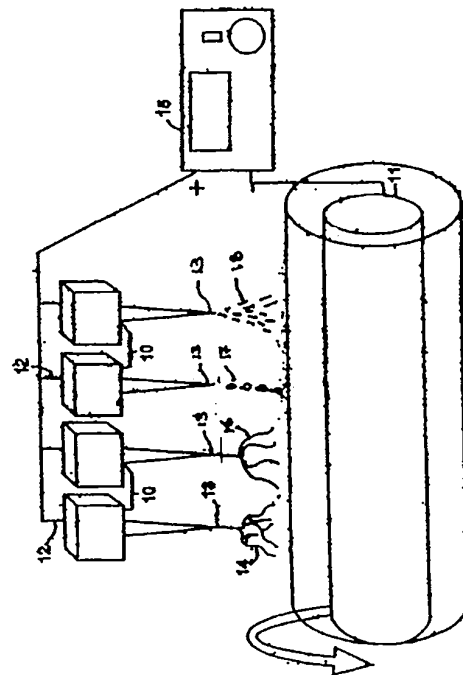


FIGURA 4

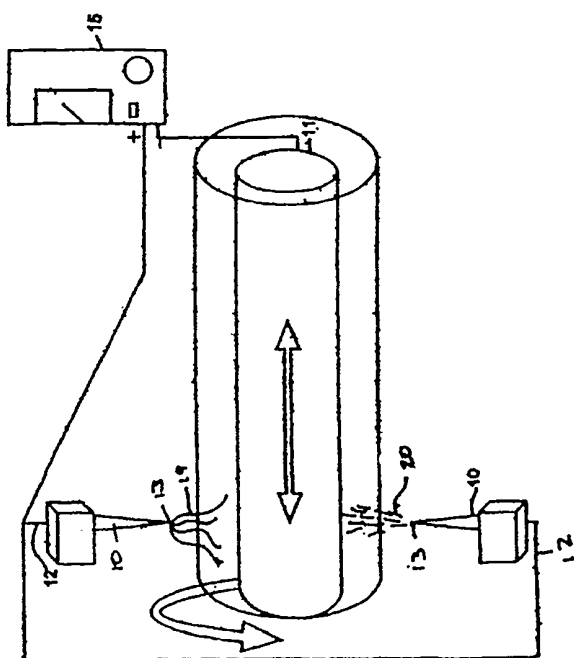


FIGURA 5

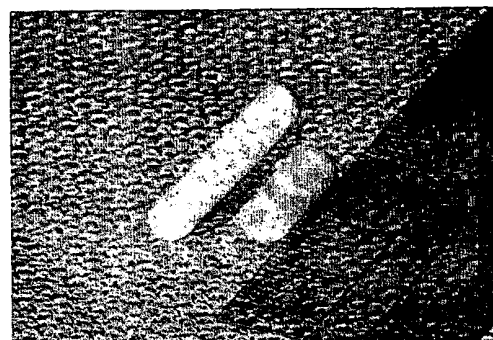


FIGURA 6

Entrega de VEGF desde una matriz electrocentrifugada

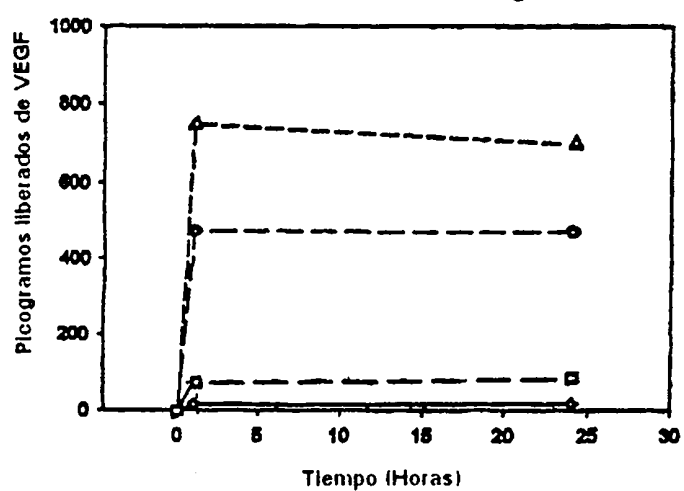


FIGURA 7

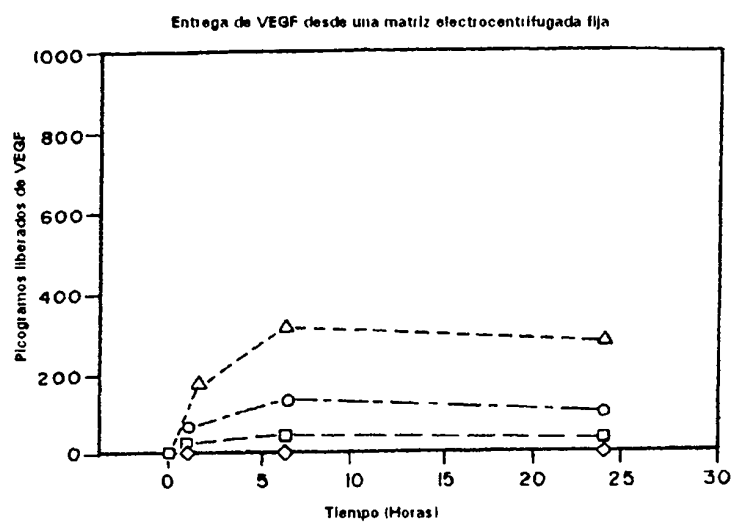


FIG. 8

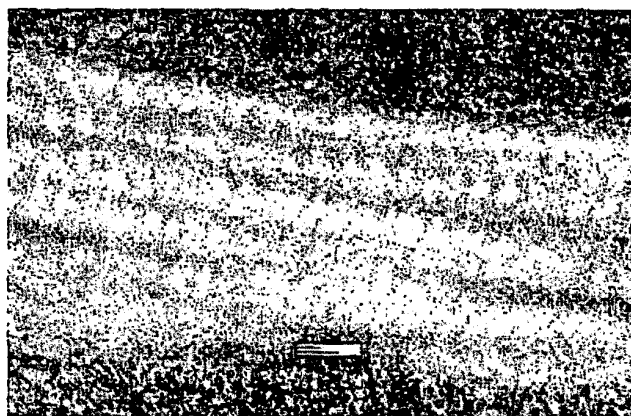


FIGURA 9

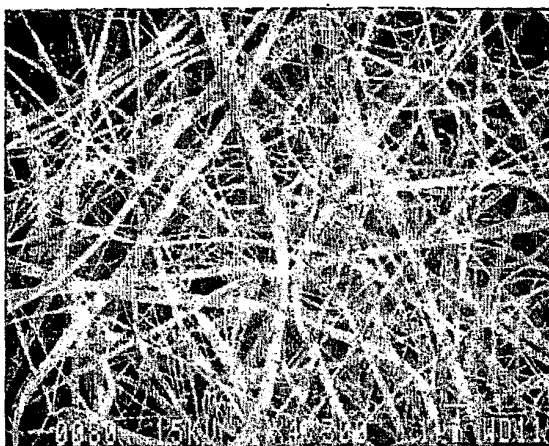


FIGURA 10

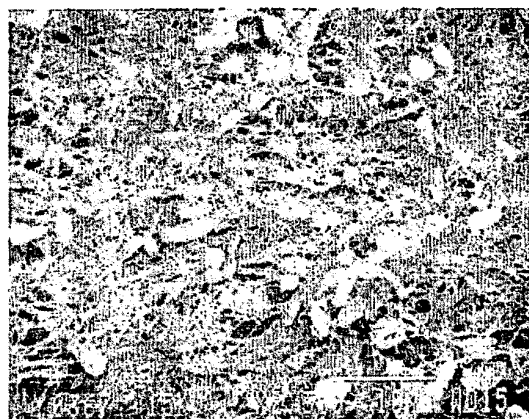


FIGURA 11

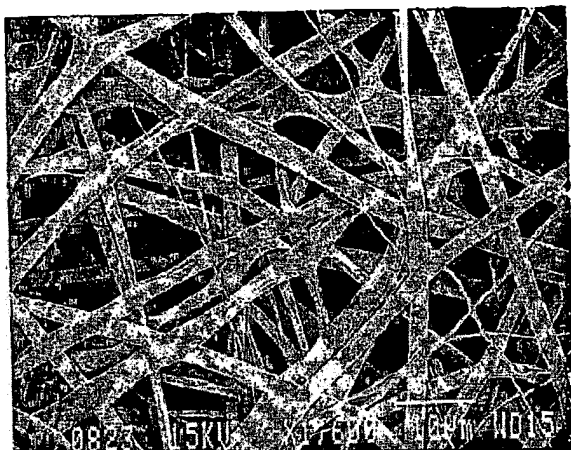


FIGURA 12

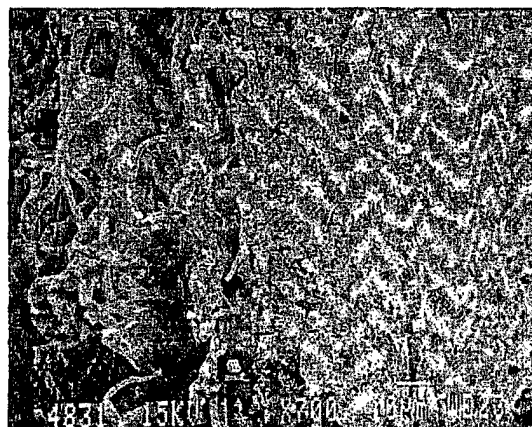


FIGURA 13

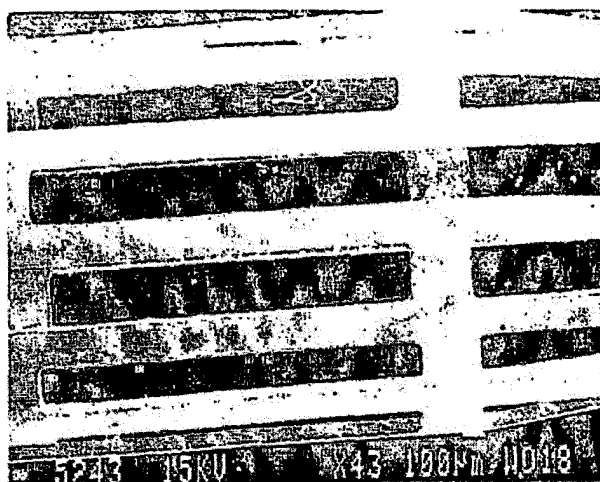


FIGURA 14

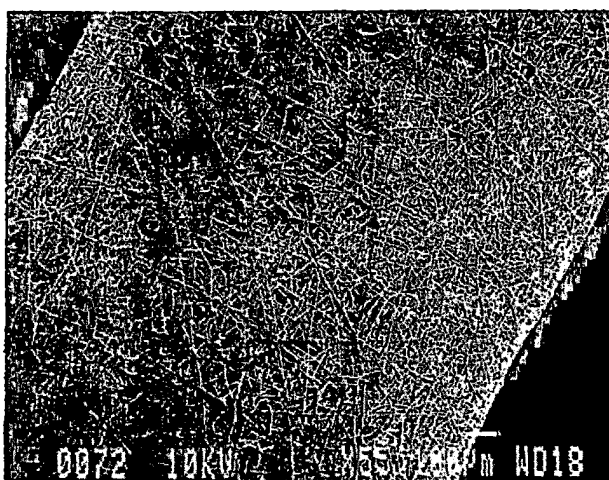


FIGURA 15