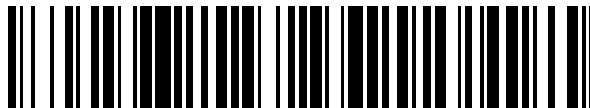


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 516**

51 Int. Cl.:
A61L 27/20 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/48 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07752154 .0**
96 Fecha de presentación: **01.03.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1988942**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.11.2008**

54 Título: **MATERIAL COMPUESTO GELIFICADO.**

30 Prioridad:
01.03.2006 US 777869 P
05.12.2006 US 872844 P
11.12.2006 US 874174 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.11.2011

73 Titular/es:
FMC BIOPOLYMER AS
TOMTEGT. 36
3013 DRAMMEN, NO y
FMC CORPORATION

72 Inventor/es:
GASEROD, Olav; ANDERSEN, Therese;
MELVIK, Jan, Egil; DORNISH, Michael y
RILEY, Peter, J.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 368 516 T3

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

DESCRIPCIÓN

Material compuesto gelificado

5 La invención se refiere a un material compuesto que comprende un gel de polisacárido gelificado dentro de los poros de una espuma, procedimientos de preparación del material compuesto y usos del mismo. El material compuesto es útil en particular en aplicaciones biomédicas, por ejemplo, medio de cultivo celular e implantes, sistemas de suministro de liberación controlada, aplicaciones alimenticias, aplicaciones industriales y aplicaciones para el cuidado personal incluyendo cosmética e higiene oral.

10 El documento US 5.948.429 (Bell) divulga procedimientos para preparar espumas de biopolímero recubiertas incluyendo espumas de biopolímero reticuladas por radiación ultravioleta, opcionalmente lavado con tampón estéril seguido por agua desionizada para aumentar la resistencia a la tracción y después recubrir con un colágeno no reticulado.

15 El documento WO 0154735 A2 (Bentz) divulga esponjas infundidas con gel en las que un precursor de gel constituido por una disolución de proteínas o polisacárido modificado y un agente de reticulación, si se necesita, es añadido típicamente a una esponja previamente a su transición a consistencia de gel sólido. Se puede provocar la iniciación de gel, enzimáticamente, térmicamente, fotoquímicamente o químicamente. En la presente memoria, sin embargo, el agente formador de gel no está integrado en la matriz de la espuma pero es añadido a la matriz.

20 El documento US 6.306.169 (Lee) divulga un implante biomecánico que comprende dos componentes de la matriz, siendo uno un implante de colágeno y el otro un gel de alginato hidratado que ejerce una presión de hinchamiento. El implante comprende una población de células. En la fabricación del material compuesto, se puede hacer que una disolución de alginato de sodio se hinche por inmersión en una solución salina para crear fuerzas de deformación entre el alginato y la matriz de colágeno. La construcción de material compuesto se puede sumergir después en una disolución que contiene una sal de un catión divalente para inducir la reticulación del alginato para formar un gel hidratado.

25 El documento US 6.203.845 (Qin) divulga un procedimiento para formar un hidrogel (poroso) deshidratado dispensando fibras que contienen catión en una disolución acuosa de un precursor de hidrogel que incorpora un plastificante para formar un hidrogel y deshidratar después el hidrogel.

30 El documento US 6.656.974 (Renn) divulga un material de espuma absorbente que comprende una forma reticulada sólida de un polímero aniónico y fibras u otros materiales poliméricos en forma de partículas con cationes donados para efectuar la reticulación del polímero aniónico. Las fibras quedan en la espuma final para actuar como refuerzo. No hay indicio de que la espuma final reaccione más para producir un producto más ni de que la espuma contenga más cationes adecuados para la donación a reactivos adicionales.

35 Permanece la necesidad de proporcionar un producto adecuado para uso, por ejemplo, en tratamiento de heridas, ingeniería de tejidos, regeneración de tejidos e inmovilización celular. Los presentes inventores han encontrado que se puede producir un material compuesto que posee una excelente combinación de características formando un material compuesto que comprende una espuma con poros y un gel formado in situ dentro de los poros de la espuma.

40 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para formar un material compuesto que comprende proporcionar una espuma que comprende un polisacárido seleccionado de alginato, pectina, carragenina, hialuronato, quitosán y mezclas de los mismos e iones formadores de gel y para formar un gel con poros, poniendo en contacto un componente líquido con dicha espuma, comprendiendo dicho componente líquido un polisacárido soluble seleccionado de alginato, pectina, carragenina, hialuronato, quitosán y mezclas de los mismos, teniendo dicho polisacárido soluble en dicho componente líquido sitios gelificantes capaces de formar un gel tras el contacto con dichos iones, según lo cual tras el contacto con dichos iones, se forma un gel que comprende el polisacárido soluble del componente líquido dentro de los poros de dicha espuma.

45 Ventajosamente, el gel en el material compuesto tiene buena integridad estructural para el uso deseado, por ejemplo el gel no se fuga de la espuma a menos que se desee. El material compuesto tiene una excelente combinación de características físicas cuando se compara con hidrogeles conocidos y se puede emplear el material compuesto para transportar componentes funcionales, por ejemplo, los productos farmacéuticos y las poblaciones celulares y proporciona características de suministro deseables, por ejemplo liberación del material que se tiene que liberar. La liberación se puede desencadenar de cualquier manera adecuada, por ejemplo, mediante contacto con un disolvente, por cambio de temperatura o por manipulación mecánica. El material compuesto se puede emplear ventajosamente para inmovilizar las células.

55 El material compuesto se puede producir por un procedimiento *in situ* en el que se emplea la espuma en la posición deseada y después el polisacárido soluble se añade a la espuma de manera que se forme el material compuesto *in situ*. La espuma se puede conformar previamente a o durante el uso, como se desee. La espuma se puede asegurar a un sustrato con un fijador, por ejemplo, una sutura, y se añade el polisacárido soluble después a la espuma para producir el gel y formar el material compuesto. Como se desea el material compuesto se puede formar y después

asegurar a un sustrato usando un fijador, por ejemplo una sutura.

5 Los materiales sensibles a la temperatura se pueden incorporar convenientemente en el material compuesto ya que el material compuesto se forma de manera conveniente mediante un procedimiento en o cerca de la temperatura ambiente. El procedimiento de la invención no requiere incluir una etapa de secado a temperatura elevada o reducida, por ejemplo, una etapa de liofilización aunque esto puede estar incluido si se desea. La opción de evitar secar el material compuesto, especialmente a temperatura elevada, permite ventajosamente la producción de un material compuesto en el que el material sensible a la temperatura incorporado puede distribuirse uniformemente y no estar desactivado o modificado.

10 El procedimiento incluye convenientemente absorber un componente líquido que contiene un polisacárido en una espuma con poros en la que se incorporan iones formadores de gel en la espuma y gelificar el polisacárido dentro de los poros de la espuma. El polisacárido en el componente líquido es convenientemente reactivo con los iones formadores de gel en la espuma de manera que se forme el gel.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un material compuesto producido por el procedimiento de la invención.

15 En un cuarto aspecto, la invención prevé el uso de un material compuesto producido según el procedimiento de la invención.

El material compuesto comprende un gel formado *in situ* dentro de la estructura de la espuma y el gel se dispersa dentro de la espuma. El material compuesto es adecuado en particular para uso en aplicaciones médicas, por ejemplo, en el tratamiento de heridas, ingeniería de tejidos y regeneración de tejidos e inmovilización celular.

20 Convenientemente, el material compuesto tiene un pH fisiológicamente compatible. La espuma o el gel puede ser degradable y preferiblemente los dos son degradables. La espuma y el gel pueden ser degradables en las mismas condiciones o en diferentes o a diferentes velocidades o veces dentro del ser humano o dentro del cuerpo de un animal.

25 El material compuesto que comprende un gel de polisacárido formado *in situ* dentro de los poros de la espuma se prepara añadiendo un componente líquido que contiene un polisacárido a una espuma que tiene poros e iones formadores de gel incorporados dentro de la espuma induciendo de ese modo la gelificación del polisacárido.

30 Espumas adecuadas incluyen las que tienen redes de poro abierto preferiblemente con un tamaño de poro de 5 a 1.000 micrómetros, más preferiblemente en el intervalo de 25 a 500 micrómetros, capaz de absorber un componente líquido añadido que contiene un polisacárido en sus poros. Las espumas adecuadas para uso en la presente invención tienen poros abiertos en al menos una superficie y deseablemente tienen al menos una porción de poros interconectados para permitir el transporte del polisacárido absorbido dentro de la espuma y/o aumentar eficazmente el volumen de componente líquido que puede ser absorbido por la espuma.

35 La espuma es convenientemente hinchable y preferiblemente puede absorber hasta 30 veces su peso, más preferiblemente de 1 a 20 veces su peso de un líquido, por ejemplo una disolución fisiológica acuosa o una disolución de polisacárido. La espuma puede tener una distribución de tamaños de poro homogénea o heterogénea. No se requiere que todos los poros absorban el componente líquido.

40 Convenientemente, la espuma, el material compuesto o un dispositivo que contiene el material compuesto se esteriliza, preferiblemente por irradiación- γ , haz-E, óxido de etileno, en autoclave o poniendo en contacto la espuma con alcohol previamente a la adición del componente líquido o poniéndola en contacto con gases NO_x, gas hidrógeno esterilización con plasma. La esterilización no se debería emplear donde afecte perjudicialmente el material compuesto o un componente funcional contenido en el material compuesto.

El polímero en la espuma puede ser iónicamente o covalentemente reticulable pero no se requiere que sea reticulable siempre que el polisacárido soluble sea reticulable con el polímero en la espuma o con un componente de la espuma, por ejemplo los iones formadores de gel.

45 Las espumas se pueden fabricar según procedimientos de la técnica anterior, por ejemplo, como se describe en el documento US 5.888.987 (Hayes) o el documento WO 2005023323 (Gaserod), el documento US 6.203.845 (Qin) o el documento US 6.656.974 (Renn).

Los iones formadores de gel en la espuma están presentes en cantidad suficiente para formar un gel con al menos una porción del polisacárido.

50 Los iones formadores de gel para reaccionar con el componente líquido que comprende el polisacárido se pueden incorporar durante la preparación de la espuma o añadir a la espuma preferiblemente previamente a la adición del componente líquido. Los iones formadores de gel se pueden incorporar dispersándolos dentro de una mezcla, preferiblemente una mezcla de biopolímeros, previamente a la formación de la mezcla en una espuma húmeda o añadir a la espuma formada. Opcionalmente, se pueden añadir iones formadores de gel adicionales al material compuesto que comprende una espuma y el gel que comprende el polisacárido añadido. Los iones formadores de

gel se pueden incorporar en la espuma o mezcla para fabricar la espuma por ejemplo, lavando o empapando la espuma con una disolución de iones gelificantes que no disuelva la espuma. La disolución en exceso se puede retirar por compresión.

5 Proporcionando suficientes iones formadores de gel en la espuma previamente a la adición del componente líquido que comprende el polisacárido, se puede asegurar un material compuesto con un gel formado por al menos una parte del volumen del material compuesto.

10 En un aspecto más, la invención proporciona un material compuesto que comprende una espuma, preferiblemente una espuma que comprende un biopolímero, en el que la espuma tiene poros y comprende iones formadores de gel distribuidos, preferiblemente sustancialmente uniformemente distribuidos, por la espuma y un gel que comprende un polisacárido en el que el gel está situado dentro de los poros de la espuma e interactúa con la espuma.

15 Preferiblemente, los iones formadores de gel están presentes en al menos algunos de los poros internos de la espuma más bien que sólo poros de la superficie. Los iones formadores de gel están preferiblemente sustancialmente distribuidos de manera uniforme en la espuma. Proporcionando iones formadores de gel en la espuma previamente a la introducción del componente líquido que comprende un polisacárido, el polisacárido puede interactuar con los iones de manera que en la adición del componente líquido que comprende el polisacárido, se forme un gel en al menos parte de y preferiblemente por sustancialmente todo el volumen interno de la espuma.

La interacción entre el gel y la espuma puede ser química a través del enlace entre la espuma y el polisacárido por medio de los iones formadores de gel que forman "puentes". La interacción puede ser física a través del gel que está retenido en los poros de la espuma por entrecruzamiento físico del gel y la espuma.

20 La espuma comprende los iones formadores de gel y tras la adición del líquido que contiene el polisacárido, el polisacárido puede penetrar ventajosamente al interior de la espuma por los poros y canales en la espuma y reaccionar con los iones formadores de gel de manera que se forme el material compuesto. De este modo, se forma el gel por al menos una parte del volumen interior de la espuma. La adición del polisacárido a la espuma antes de
25 incorporar los iones formadores de gel no es ventajosa porque con la adición de dichos iones, es probable que tenga lugar reacción en o cerca de la superficie de la espuma formándose así una capa de gel que puede impedir la penetración de dichos iones en el volumen interior de la espuma. Además, el gel y el material compuesto pueden ser indeseablemente no homogéneos.

En una realización preferida, el material compuesto comprende un gel sustancialmente homogéneo.

30 En una realización, el polímero usado para la matriz de la espuma comprende un polisacárido que es gelificado con iones formadores de gel. En una realización preferida, la espuma comprende un biopolímero reticulado que contiene opcionalmente un agente espumante por ejemplo como se describe en el documento WO 2005023323.

35 La espuma comprende preferiblemente un polisacárido y/o un polisacárido modificado químicamente. Los polisacáridos modificados, por ejemplo, los polisacáridos acoplados a péptidos, se preparan por medios conocidos en la técnica. Por ejemplo, se describen alginatos modificados en el documento US 6.642.363 (Mooney). Se prefieren polisacáridos acoplados a péptidos para uso, por ejemplo, en inmovilización celular para activar la proliferación celular y la diferenciación celular. Los polisacáridos acoplados a péptidos se emplean preferiblemente junto con polisacáridos no modificados.

La espuma es preferiblemente espuma absorbente seca.

40 En una realización preferida, la invención proporciona un procedimiento para formar una espuma absorbente seca con una red de poros abiertos y poros y que comprende iones formadores de gel para gelificar una disolución de polisacáridos añadida con posterioridad, procedimiento que comprende:

a) formar una espuma húmeda a partir de una dispersión acuosa que comprende un polisacárido, y un agente espumante y opcionalmente uno o más de un plastificante, un agente de reticulación y un modificador de pH;

45 b) mezclar una espuma de la dispersión acuosa, opcionalmente por agitación mecánica;

c) opcionalmente llevar a cabo una o más etapas de:

i) moldear o conformar la espuma y

ii) formar una espuma reticulada a partir de la espuma;

d) secar la espuma para formar una espuma seca que contiene poros abiertos y

50 e) añadir iones formadores de gel en una o más de las etapas a) a d) o después de la etapa d).

En una realización especialmente preferida, los iones formadores de gel se añaden en la etapa a) para proporcionar

una distribución sustancialmente uniforme de dichos iones formadores de gel por toda la espuma.

Se pueden emplear modificadores del pH conocidos para reducir o aumentar el pH y plastificantes por ejemplo, los descritos en el documento WO 2005023323.

5 La espuma se puede secar por secado al aire y como se desee se puede someter a moldeado, conformación o compresión.

La espuma usada en la presente invención es un polisacárido seleccionado de alginatos, pectinas, carrageninas, hialuronatos, quitosán y mezclas de los mismos. Son polisacáridos preferidos los alginatos, el quitosán y los hialuronatos.

10 La espuma se puede preparar usando una sola espuma preferiblemente o alternativamente de estructura heterogénea comprendiendo las espumas de diferente densidad o tamaño de poro y regiones de la espuma y no de la espuma.

15 Los polisacáridos adecuados para uso en la presente invención incluyen los que son solubles en un disolvente, tal como agua, y se pueden formar en un gel por interacción con iones formadores de gel. Ejemplos de polisacáridos adecuados incluyen alginatos, pectinas, carrageninas, quitosán, hialuronatos y mezclas de los mismos, siempre que el polisacárido solo o en una mezcla con otro polisacárido pueda formar un gel. Los alginatos son un polisacárido preferido para uso en la presente invención.

20 Los alginatos son sales de ácido algínico. El ácido algínico, que se aísla de algas marinas, es un poli(ácido urónico) fabricado a partir de dos ácidos urónicos: ácido D-manurónico y ácido L-gulurónico. La relación de ácido manurónico y ácido gulurónico varía con factores tales como la especie de alga marina, la edad de la planta y la parte del alga marina (por ejemplo, tallo, hoja). El ácido algínico es sustancialmente insoluble en agua. Forma sales solubles en agua con metales alcalinos tales como sodio, potasio y litio; magnesio; amonio y los cationes amonio sustituidos procedentes de aminos inferiores, tales como metilamina, etanolamina, dietanolamina y trietanolamina. Las sales son solubles en medios acuosos por encima de pH 4, pero se convierten en ácido algínico cuando el pH disminuye por debajo de aproximadamente pH 4. Se forma un gel de alginato insoluble en agua termoirreversible en presencia de iones formadores de gel, por ejemplo, calcio, bario, estroncio, cinc, cobre (+2), aluminio y mezclas de los mismos en las concentraciones apropiadas. Los geles de alginato se pueden solubilizar empapándolos en una disolución de cationes solubles o agentes quelantes para los iones formadores de gel, por ejemplo EDTA, citrato y similares.

30 Las sales de alginato insolubles en agua, en que el catión principal es calcio se encuentran en las hojas y los tallos de las algas marinas de la clase Phaeophyceae, ejemplos de las cuales son *Fucus vesiculosus*, *Fucus spiralis*, *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera*, *Alaria esculenta*, *Eclonia maxima*, *Lessonia nigrescens*, *Lessonia trabeculata*, *Laminaria japonica*, *Durvillea antarctica*, *Laminaria hyperborea*, *Laminaria longicuris*, *Laminaria digitata*, *Laminaria saccharina*, *Laminaria cloustoni* y *Saragassum sp.* También se conocen procedimientos para la recuperación de ácido algínico y sus sales solubles en agua, especialmente alginato de sodio, de fuentes naturales y se describen por ejemplo, en Green, Patente de EE.UU. N° 2.036.934 y Le Gloahec, Patente de EE.UU. N° 35 2.128.551.

40 En una realización más, el polímero comprende quitosán. Quitosán es un polisacárido lineal que comprende 2-acetamido-2-dexoi-D-glucopiranososa β -(1 \rightarrow 4) ligada (GlcNAc) y 2-amino-2-dexoi-D-glucopiranososa (GlcN). Quitosán es un derivado N-desacetilado de quitina, que consiste casi completamente en 2-acetamido-2-dexoi-D-glucopiranososa β -(1 \rightarrow 4) ligada (GlcNAc). El quitosán comercial se fabrica por N-desacetilación alcalina de quitina. El proceso de desacetilación heterogéneo junto con la eliminación de compuesto insoluble da como resultado un producto de quitosán que posee una distribución aleatoria de unidades GlcNAc y GlcN a lo largo de la cadena polimérica. El grupo amino en el quitosán tiene un valor de pK_a aparente de aproximadamente 6,5 y a un pH por debajo de este valor, el grupo amino libre se protonará así que la sal de quitosán disuelta en la disolución transportará una carga positiva. De acuerdo con esto, el quitosán podrá reaccionar con componentes cargados negativamente, siendo una 45 función directa de la densidad de carga positiva del quitosán.

50 Ventajosamente, la naturaleza catiónica del quitosán proporciona una propiedad bioadhesiva. Además, el quitosán puede precipitar glóbulos rojos debido a su carga negativa proporcionando beneficios en la formación de coágulos de sangre y en la reducción del nivel de fibrina durante la curación para reducir la formación de tejido de cicatriz. El quitosán se puede degradar por lisozima y otras enzimas relacionadas que se encuentran en el cuerpo de los mamíferos, por ejemplo el cuerpo humano. En su uso el quitosán en una espuma de la presente invención se degradará convenientemente por la lisozima encontrada en la saliva, las lágrimas, el suero sanguíneo y en el fluido intersticial. Un material compuesto con una espuma de quitosán se puede emplear ventajosamente en el tratamiento de heridas, como bioadhesivo y en otras aplicaciones en el ser humano o el cuerpo de un animal. La degradación enzimática permite que se diseñe la espuma de tal manera que el producto pueda realizar su función y ser eliminado 55 después del cuerpo por degradación.

La pectina es un polisacárido natural encontrado en las raíces, tallos, hojas y frutos de diversas plantas, especialmente la piel de los cítricos tales como limas, limones, pomelos y naranjas. Las pectinas contienen unidades poliméricas procedentes de ácido D-galacturónico. Los productos comerciales incluyen metoxipeptina superior y

metoxipeptina inferior (y derivados tales como pectinas amidadas), donde el 20-60% de las unidades procedentes de ácido D-galacturónico, dependiendo de la fuente de la pectina, se esterifica con grupos metilo. El pectato (pectinato) es pectina completamente desesterificada con hasta el 20% de las unidades procedentes de ácido D-galacturónico.

5 Carragenina se refiere a un grupo de galactanos sulfatados que se pueden extraer de algas marinas rojas. Las carrageninas son cadenas lineales de unidades D-galactopiranosilo unidas con enlaces (1→3) α-D y (1→4) β-D-glicosídicos. Las carrageninas se pueden distinguir en parte por el grado y la posición de sulfatación. La mayoría de las unidades azúcar tienen uno o dos grupos sulfato esterificados a un grupo hidroxilo en los carbonos 2 ó 6. Las carrageninas adecuadas incluyen carragenina kappa, carragenina iota y carragenina kappa II y mezclas de las mismas. Las carrageninas de sodio son solubles a temperatura ambiente. Las carrageninas se pueden preparar con bajo contenido en iones formadores de gel por técnicas conocidas. Los geles de carragenina son termorreversibles. Niveles mayores de iones formadores de gel pueden aumentar la temperatura a la que el gel puede fundir. Las carrageninas kappa producen geles rígidos fuertes mientras que las carrageninas iota son elásticas y deformables. Las carrageninas kappa II que son copolímeros de kappa y iota forman geles débiles. Se conocen iones formadores de gel para carrageninas específicas en la técnica e incluyen potasio y calcio. Las carrageninas lambda no forman geles en agua pero pueden ser útiles en mezclas, por ejemplo, para modificar las propiedades mecánicas del gel resultante. Una carragenina preferida es carragenina iota. La carragenina iota tiene una unidad repetitiva de D-galactosa-4-sulfato-3,6-anhidro-D-galactosa-2-sulfato proporcionando un contenido en éster sulfato de aproximadamente 25 a 34%.

20 Un biopolímero preferido más comprende ácido hialurónico (AH), sales del mismo y hialuronato modificado. El hialuronato de sodio es un glucosaminoglucano abundante encontrado en la matriz extracelular de la piel, las articulaciones, los ojos y la mayoría de los órganos y ejidos de todos los animales superiores. El AH de origen no animal se puede fermentar de *Streptococcus zooepidemicus*. El ácido hialurónico de origen no animal es preferido para uso en la presente invención. El ácido hialurónico es un copolímero lineal compuesto de D-glucuronato (β-1,4) (D) y (β-1,3)-N-acetil-D-glucosamina (N). La estructura enrollada del hialuronato puede atrapar aproximadamente 25 1.000 veces su peso en agua. Estas características dan a la molécula ventajosas propiedades fisicoquímicas así como distintas funciones biológicas y es deseable para uso como un bloque de construcción para materiales biocompatibles y biointeractivos en el suministro farmacéutico, ingeniería de tejidos y viscoenriquecimiento.

30 El ácido hialurónico o hialuronato es un componente natural en organismos de mamíferos y es enzimáticamente biodegradable por las hialuronidasas. La semivida del hialuronato en tejido endotelial es menor que un día y el recambio natural del polímero en adultos es aproximadamente 7 g al día. Una modificación covalente de leve a moderada de hialuronán aumentará la estabilidad *in vivo* y el tiempo de retención de días hasta meses o un año.

35 Hialuronatos modificados adecuados incluyen los que contienen restos unidos mediante enlaces covalentes a los hialuronatos y pueden incluir por ejemplo hialuronatos acoplados a péptidos. Un hialuronato modificado preferido convenientemente tiene un grupo carboxilo covalentemente modificado y/o grupo hidroxilo en las unidades de monómero D y N, respectivamente. Los hialuronatos modificados se pueden adaptar por selección de restos y su concentración en los hialuronatos modificados para añadir, modificar o alterar propiedades o funcionalidades de los hialuronatos tales como capacidad de reticulación, solubilidad, velocidad de biodegradabilidad de la capacidad para unirse, por ejemplo, células específicas, fármacos o péptidos.

40 Se cree que el ácido hialurónico desempeña un papel importante en las etapas tempranas de curación de tejido conjuntivo y curación de heridas fetales sin cicatriz y regulan la movilidad celular, la adhesión y la proliferación y es especialmente útil en aplicaciones de ingeniería de tejidos y regeneración de tejidos.

45 Los polisacáridos modificados, también conocidos como derivados de polisacáridos, se pueden aplicar en aplicaciones de la presente invención siempre que sean reactivos con iones formadores de gel. Por ejemplo, se puede hacer reaccionar alginato con un óxido de alquileo, tal como óxido de etileno u óxido de propileno, para formar un glicol alginato. El glicol está unido al alginato por los grupos carboxilo. Típicamente, se hace reaccionar alginato con óxido de propileno para formar alginato de propilenglicol (PGA). La preparación de alginato de propilenglicol se describe en Strong, Patente de EE.UU. Nº 3.948.881, Pettitt, Patente de EE.UU. Nº 3.772.266 y Steiner, Patente de EE.UU. Nº 2.426.125. Preferiblemente, el alginato de propilenglicol tiene un grado de esterificación de aproximadamente 40% a aproximadamente 95%, más preferiblemente aproximadamente 70% a 50 95%. Se pueden usar también mezclas de alginatos de propilenglicoles de diferentes pesos moleculares.

Preferiblemente, la espuma se prepara convenientemente usando un mezclador, por ejemplo un mezclador auxiliar de cocina equipado con un batidor de alambre para airear una disolución acuosa del polímero para producir la espuma junto con otros componentes tales como plastificantes por ejemplo, glicerina y sorbitol.

55 Se puede incluir un agente espumante en la dispersión acuosa para favorecer la espumación. Cuando está presente, el agente espumante produce convenientemente una espuma húmeda resistente a la desaparición de la espuma. El agente espumante puede ser un solo material o una mezcla de materiales que favorezcan la espumación. El agente espumante puede ser un agente espumante polimérico, un tensioactivo o una mezcla de los mismos.

- Agentes espumantes poliméricos, tales como hidrocoloides superficialmente activos se prefieren en general para la mayoría de las aplicaciones biológicas debido a que se fugan más difícilmente de la espuma gelificada resultante que los tensioactivos. Ejemplos de hidrocoloides superficialmente activos incluyen metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxietilcelulosa (HEC), albúmina y glicol alginatos, tales como alginato de propilenglicol. Para algunas aplicaciones, puede ser ventajoso añadir un polisacárido adicional, por ejemplo un derivado de celulosa tal como carboximetilcelulosa, además del agente espumante. El agente espumante polimérico es preferiblemente soluble en agua de manera que se produzca una espuma gelificada homogénea. Agentes espumantes solubles en agua preferidos incluyen albúmina e hidroxipropilmetilcelulosa ya que producen pequeñas burbujas que dan como resultado poros finos en la espuma.
- 5
- 10 Cuando se empapan espumas reticuladas secas que contienen altos niveles de calcio en agua, la estructura de la espuma no se rompe típicamente debido al alto nivel de reticulación de la espuma. Sin embargo, los componentes solubles en la espuma, incluyendo agentes espumantes solubles en agua tales como hidroxipropilmetilcelulosa, pueden difundirse fuera de la espuma. Esta pérdida de agente espumante se puede evitar, por ejemplo, en una aplicación de curación de heridas, por uso de un agente espumante que no sea soluble en las condiciones de uso.
- 15 Algunos agentes espumantes forman geles a la temperatura corporal, por ejemplo la metilcelulosa forma geles por encima de 35°C. Cuando se usa una espuma que comprende metilcelulosa como agente espumante en una aplicación en la que la espuma está a temperatura corporal, la metilcelulosa permanecerá en el estado gelificado y se en la espuma y contribuirá a la resistencia en condiciones húmedas de la espuma.
- 20 Cuando se usa un agente espumante polimérico tal como hidroxipropilmetilcelulosa, la concentración del agente espumante polimérico en la dispersión acuosa es típicamente aproximadamente 0,5% en peso a aproximadamente 6% en peso, preferiblemente aproximadamente 1% en peso a aproximadamente 4% en peso, más preferiblemente aproximadamente 1,5% a aproximadamente 2% en peso. Esto produce una espuma que comprende aproximadamente 3% en peso a aproximadamente 37% en peso, preferiblemente aproximadamente 6% en peso a aproximadamente 25% en peso, más preferiblemente aproximadamente 6% a aproximadamente 12,5% en peso, del agente espumante polimérico, excluyendo el agua y cualquier aditivo o aditivos que pueden estar presentes en la espuma.
- 25
- Para ciertas aplicaciones, un tensioactivo, con o sin un agente espumante polimérico añadido, se puede usar como agente espumante. Los tensioactivos son conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en McCutcheon's Detergents and Emulsifiers, y Laughlin, Patente de EE.UU. N° 3.929.678. Los tensioactivos no iónicos son típicamente productos de condensación de un compuesto aromático alifático o alquílico orgánico hidrófobo y óxido de etileno hidrófilo y/u óxido de propileno. La longitud de la cadena de poliéter resultante se puede ajustar para conseguir el equilibrio deseado entre las propiedades hidrófobas e hidrófilas. Los tensioactivos no iónicos incluyen, por ejemplo, etoxilatos de alquilfenoles que contienen aproximadamente 8 a 18 átomos de carbono en un grupo alquílico de cadena lineal o ramificada, tal como terc-octilfenol y terc-nonilfenol con aproximadamente 5 a 30 moles de óxido de etileno, por ejemplo nonilfenol condensado con aproximadamente 9,5 moles de óxido de etileno, dinonilfenol condensado con aproximadamente 12 moles de óxido de etileno; alcoholes etoxilados y propoxilados, especialmente alcoholes C₁₀₋₂₀, con 2 a 100 moles de óxido de etileno y/u óxido de propileno por mol de alcohol, especialmente etoxilatos de alcoholes primarios que contienen aproximadamente 8 a 18 átomos de carbono en una configuración de cadena lineal o ramificada con aproximadamente 5 a 30 moles de óxido de etileno, por ejemplo, los etoxilatos de alcohol decílico, alcohol cetílico, alcohol laúrico o alcohol miristílico; etoxilatos de alcoholes alifáticos secundarios que contienen 8 a 18 átomos de carbono configuración de cadena lineal o ramificada con 5 a 30 moles de óxido de etileno; condensación de alcoholes alifáticos que contienen aproximadamente 8 a aproximadamente 20 átomos de carbono con óxido de etileno y óxido de propileno; polietilenglicol y poli(óxido de etileno); aceite de ricino etoxilado CREMOPHOR® CO 40; aceite de ricino hidrogenado etoxilado; aceite de nuez de coco etoxilado; lanolina etoxilada; resinas de lejiás celulósicas etoxiladas; aceite del sebo etoxilado y etoxilatos de ésteres de sorbitán tales como monolaurato de polioxietileno y sorbitán (TWEEN® 20), monopalmitato de polioxietileno y sorbitán (TWEEN® 40), monoestearato de polioxietileno y sorbitán (TWEEN® 60), monooleato de polioxietileno y sorbitán (TWEEN® 80) y trioleato de polioxietileno y sorbitán (TWEEN® 85). Para aplicaciones físicas tales como apósitos de heridas, cuando está incluido un tensioactivo la espuma gelificada seca, se prefieren los tensioactivos no iónicos, tales como los etoxilatos de éteres de sorbitán. Ejemplos de tensioactivos aniónicos son estearato de sodio, cetilsulfato de sodio, laurilsulfato de sodio, laurilsulfato de amonio, laurilsulfato de trietanolamina, miristilsulfato de sodio y estearilsulfato de sodio, dodecilbencenosulfonato de trietanolamina, dodecilbencenosulfonato de sodio, sulfato del polioxietilénlauril éter de sodio y sulfato del polioxietilénlauril éter de amonio. Un tensioactivo aniónico preferido es laurilsulfato de sodio (dodecilsulfato de sodio). Los tensioactivos catiónicos incluyen, por ejemplo, tales como bromuro de cetil trimetilamonio, cloruro de lauril trimetilamonio, cloruros de alquilbencil metilamonio, bromuros de alquilbencil dimetilamonio, bromuro de cetil piridinio y sales de haluros de polioxietilalquilaminas cuaternizadas. También se pueden usar tensioactivos zwitteriónicos.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60 Cuando se usa el tensioactivo con un agente espumante polimérico, un tensioactivo útil es un éster de sorbitán, tal como tensioactivo TWEEN® 20. Cuando se usa un tensioactivo, tal como tensioactivo TWEEN® 20, con un agente espumante polimérico, la espuma gelificada seca puede comprender aproximadamente 0,05% en peso a 1,0% en peso, típicamente 0,1% en peso a 0,5% en peso, del tensioactivo. Sin embargo, para ciertas aplicaciones, tales como las aplicaciones del cuidado oral en las que se usa un tensioactivo, tal como, por ejemplo, laurilsulfato de

sodio, sin un agente espumante polimérico, la espuma gelificada seca puede comprender aproximadamente 0,5% en peso a 5,0% en peso, típicamente 1,5% en peso a 3,0% en peso, del tensioactivo, excluyendo el agua y cualquier aditivo o aditivos, tales como sílice u otros abrasivos o agentes abrillantadores, que pueden estar presentes en la espuma.

- 5 Los componentes de un material compuesto según la invención para tratamiento del ser humano o cuerpo de un animal son deseablemente biocompatibles y opcionalmente biodegradables.

La propia espuma se puede usar como producto en las mismas aplicaciones como el material compuesto de la invención.

- 10 Los iones formadores de gel adecuados para uso en la presente invención incluyen iones monovalentes y polivalentes, preferiblemente un ión divalente y/o uno trivalente o mezcla de iones capaz de formar un gel con el polisacárido o que no formen una sal soluble con el polisacárido. Los iones formadores de gel para polisacáridos específicos son conocidos por la bibliografía. Para los alginatos, los cationes polivalentes adecuados incluyen, por ejemplo, calcio (2+), bario (2+), estroncio (2+), hierro (2+), cinc (2+), cobre (2+) y aluminio (3+). Los cationes preferidos son cationes de metales divalentes, más preferiblemente el catión calcio (2+). Un catión monovalente tal como potasio no se consideraría un ión gelificante para un alginato puesto que el alginato de potasio es una sal de alginato soluble; sin embargo, el catión potasio sería un ión gelificante adecuado para carragenina kappa o tensioactivo kappa II. En el caso de que la sal del polisacárido esté cargada de manera positiva, se puede emplear por ejemplo, quitosán, iones formadores de gel cargados de manera negativa, por ejemplo fosfato.
- 15

- 20 Se puede usar una sal o combinación de sales que proporcione los iones formadores de gel deseados o se puede usar una mezcla de iones formadores de gel como los iones formadores de gel. Se pueden incorporar iones formadores de gel en la espuma o durante la preparación o añadir con posterioridad a la espuma previamente a la adición del líquido con el polisacárido. Las disoluciones de lavado típicas para la espuma de polisacárido tienen aproximadamente 30 mM a aproximadamente 200 mM, más preferiblemente de 50 a 100 mM, de una sal gelificante soluble en agua tal como cloruro de calcio, cloruro de bario o cloruro de estroncio. Convenientemente, la velocidad de gelificación se puede controlar para retrasar la gelificación usando sales poco solubles en las condiciones de pH en que se solubilizan lentamente o usando iones formadores de gel solubles junto con agentes secuestrantes. Se puede usar el lavado o remojo para modificar las propiedades del material compuesto en el caso de que se puedan añadir iones formadores de gel adicionales para reforzar o endurecer el material compuesto y también para controlar la proliferación celular, al tiempo que se pueden usar otros tratamientos tales como agentes secuestrantes o iones no formadores de gel para debilitar o disolver el material compuesto. Los geles de alginato se pueden disolver por adición de una disolución acuosa de citrato, EDTA o hexametáfosfato. Los tratamientos de lavado para uso con células vivas deben ser isotónicos. Las propiedades del material compuesto se pueden adaptar de acuerdo con esto como se desee.
- 25
- 30

- 35 Los iones formadores de gel pueden formar un gel con el polímero de la espuma y/o el polisacárido soluble. Los iones formadores de gel pueden formar enlaces entre la espuma y el polisacárido soluble. Preferiblemente, los "iones formadores de gel" en la espuma se pueden donar al polisacárido y están presentes en la espuma a un nivel tal que al menos algunos de los sitios de gelificación del polisacárido son ocupados tras poner en contacto el componente líquido con la espuma. Convenientemente, los iones formadores de gel pueden estar presentes en la espuma a un nivel subestequiométrico, estequiométrico o super-estequiométrico con respecto a los sitios en la espuma para unir los iones formadores de gel siempre que suficientes iones formadores de gel estén presentes para ocupar al menos algunos de los sitios de gelificación en el polisacárido que se tiene que añadir.
- 40

En una realización, los iones formadores de gel no pueden formar un gel con el polímero de la espuma.

- 45 En otro aspecto, la espuma puede comprender un exceso de iones formadores de gel con respecto a los sitios de gelificación en el polisacárido soluble. Al menos algunos de los iones formadores de gel se pueden incorporar en la espuma previamente a la adición de un polisacárido soluble que después gelifica por interacción con los iones formadores de gel dentro de la estructura de la espuma.

- 50 La concentración de iones formadores de gel se puede controlar para que el gel resultante contenga polisacárido con los sitios de gelificación que no reaccionan completamente con iones formadores de gel; es decir, los iones formadores de gel o la mezcla de iones formadores de gel está presente en una cantidad molar menor que la requerida para saturar el 100% de los sitios de gelificación del polisacárido. Por ejemplo, cuando hay suficientes iones formadores de gel, tales como ión calcio, para reaccionar con todos los sitios de gelificación disponibles (por ejemplo, las unidades de ácido L-gulurónico en el caso de alginato, unidades de ácido D-galacturónico en el caso de sustancias pectínicas, el polímero formador de gel está 100% saturado. La cantidad de catión requerida para saturar completamente los sitios de gelificación de alginato, por ejemplo, se considera que es 1 mol de catión divalente por 2 moles de ácido L-gulurónico en el alginato o 1 mol de catión trivalente por 3 moles de ácido L-gulurónico en el alginato cuando sólo se usa un catión divalente o sólo un catión trivalente en la gelificación. Cuando se usa una mezcla de un catión o cationes divalentes y un catión o cationes trivalentes, las cantidades requeridas para saturar el alginato se pueden terminar debido a que un catión divalente ocupa dos sitios de gelificación y un catión trivalente ocupa tres sitios de gelificación. Así, cualquier cantidad menor que esta se considera que es una cantidad menor
- 55

que la requerida para saturar completamente los sitios de gelificación del alginato. Convenientemente, los iones formadores de gel presentes en la espuma son suficientes para saturar aproximadamente 5% a 250%, más convenientemente 5% a 200%, preferiblemente aproximadamente 35% a 150%, incluso más preferiblemente aproximadamente 50% a 100%, de los sitios de gelificación del polisacárido.

5 La propia espuma se puede preparar usando un polisacárido y también se requieren iones formadores de gel. En el caso en que tanto la espuma como el polisacárido cuentan con los mismos iones formadores de gel, la espuma sola puede tener una saturación inicial cuando se prepara, por ejemplo, de 150%, sin embargo cuando se añade polisacárido adicional como un líquido y se absorbe en los poros de la espuma, algunos de los iones formadores de gel se usan para gelificar el polisacárido añadido. En este caso, la saturación del polisacárido añadido se calcula basándose en la cantidad total de los iones formadores de gel y la cantidad total de sitios de gelificación para tanto el polisacárido en la espuma como el polisacárido añadido para formar los geles en los poros.

10 Para el alginato, la resistencia de los geles formados por reacción de alginato con cationes polivalentes está relacionado con el peso molecular del alginato, el contenido en ácido gulurónico "contenido en G" del alginato así como la disposición de los ácidos gulurónico y manurónico en la cadena polimérica. Además, el tamaño de poro y el espesor de la espuma, la concentración de alginato, el nivel de los iones formadores de gel y el tipo de iones empleados también contribuye a la resistencia. El contenido en G del alginato es convenientemente al menos 15 aproximadamente 30%, preferiblemente aproximadamente 40% a aproximadamente 90% y más preferiblemente aproximadamente 50% a aproximadamente 80%. El alginato procedente de, por ejemplo, *Lessonia trabeculata* y de los tallos de *Laminaria hyperborea* tiene un alto contenido en G y se puede usar, como preferencia, para formar las 20 espumas gelificadas de la invención. Los alginatos completamente saturados con un alto contenido en G proporcionan geles con la resistencia mecánica más alta.

La cantidad de catión divalente, tal como calcio, requerida para reaccionar estequiométricamente con estos bloques G se puede calcular para cada tipo de alginato considerando que se requieren dos unidades de ácido gulurónico más un catión divalente para crear una reticulación iónica. La cantidad de calcio requerida para la saturación estequiométrica de una disolución de alginato de sodio al 1% disolución de alginato de sodio se da en la tabla 25 siguiente:

Fuente de Alga Marina	% G	mM Ca
<i>Laminaria hyperborea</i> (tallo)	70	14-16
<i>Laminaria hyperborea</i> (hoja)	54	11-13
<i>Lessonia trabeculata</i>	68	13-15
<i>Macrocystis pyrifera</i>	39	8-9

Una lista de diversos alginatos comercialmente disponibles, sus propiedades y sus fuentes se encuentra en Shapiro, Patente de EE.UU. N° 6.334.968, Tabla 1, columna 16, línea 49, a columna 17, línea 18. Se pueden usar mezclas o 30 mezclas de alginatos, por ejemplo alginatos de diferente peso molecular y/o contenido en G como el polímero formador de gel.

La saturación completa (saturación al 100%) de los sitios de gelificación tiene lugar cuando la composición contiene 1 mol de catión divalente por 2 moles de unidades de ácido L-gulurónico. Por ejemplo, se requiere una disolución aproximadamente 15 mM de iones calcio para saturar al 100% una disolución al 1% de alginato de sodio extraído de los tallos de *Laminaria hyperborea*, se requiere una disolución aproximadamente 12 mM de calcio para saturar al 100% una disolución al 1% de alginato de sodio extraído de las hojas (fronda) de *Laminaria hyperborea* y se requiere una disolución aproximadamente 14 mM de iones calcio para saturar al 100% una disolución al 1% de alginato de sodio extraído de *Lessonia trabeculata*. Así, cuando se usa alginato como el polímero formador de gel, la 35 composición formadora de gel comprende preferiblemente 0,2 a 0,9 mM de catión divalente, preferiblemente 20% a 90% de ión calcio (2+), por 2 mM de unidades de ácido L-gulurónico presentes en el alginato. Cuando se usa una sal poco soluble como iones formadores de gel, la extensión de reticulación se puede controlar controlando o la cantidad de la agente de gelificación, por ejemplo, carbonato de calcio y/o la cantidad de agente de solubilización, por ejemplo un modificador de pH tal como glucono delta-lactona, presente durante la formación de gel. Preferiblemente, debería haber una relación estequiométrica entre el modificador de pH y el agente de gelificación de manera que 45 sustancialmente todos los iones formadores de gel están disponibles.

Cuando todos los sitios de gelificación en el polisacárido no están saturados con iones formadores de gel, los sitios restantes están ocupados por iones de no reticulación. Si se desea, se pueden usar iones activos, tales como el catión Ag(1+) para ocupar algunos o todos los sitios restantes. Scherr, documento US 2003/0021832 A1, describe que se puede usar alginato de plata se puede usar para el tratamiento de quemaduras, heridas, lesiones ulceradas y 50 estados patológicos relacionados.

El componente líquido adecuado para añadir la espuma contiene el polisacárido disuelto en un disolvente, típicamente agua.

5 Ejemplos de polisacáridos solubles adecuados para producir el gel a partir del polisacárido soluble incluyen alginatos, pectinas, carrageninas, hialuronatos, quitosán y mezclas de los mismos. Los polisacáridos solubles preferidos son alginatos, quitosán y hialuronatos.

10 La velocidad de absorción del componente líquido y la velocidad de gelificación del polisacárido puede impactar en la estructura del material compuesto. La velocidad de absorción y la capacidad absorbente del componente líquido dependerá de las características de la espuma tales como tamaño de poro y volumen, características del polisacárido tales como composición y peso molecular; y propiedades del componente líquido con respecto a absorción tal como concentración de sólidos y viscosidad. Cuando la viscosidad del componente líquido impacta en su capacidad para ser absorbido rápidamente en la espuma, puede ser adecuado usar una concentración menor del alginato o usar un alginato de un peso molecular inferior.

15 Factores que afectan a la resistencia mecánica del gel incluyen la concentración del polisacárido, peso molecular del polisacárido, la composición química, la mezcla de diferentes componentes del polisacárido como sea apropiado, por ejemplo la relación de alginatos ricos en M y ricos en G, el tipo y el nivel de iones formadores de gel y otros componentes del gel. La resistencia del gel se puede adaptar por manipulación de estos parámetros según la aplicación deseada.

20 Convenientemente la viscosidad del componente líquido es de aproximadamente 5 mPas a aproximadamente 1.000 mPas, más típicamente aproximadamente 8 mPas a 600 mPas, más preferiblemente aproximadamente 10 mPa a 200 mPas. El componente líquido está preferiblemente completamente absorbido en los poros de la espuma a menos que se desee crear una capa de gel en sólo una parte de la espuma, por ejemplo en la superficie de la espuma. El líquido debería estar suficientemente gelificado de manera que se retenga en los poros para evitar que se fugue material no gelificado o parcialmente gelificado de la espuma a menos que se desee recubrir sólo los poros.

25 La formación de gel dependerá de la cantidad y el tipo de iones formadores de gel, las características del polisacárido tales como composición y peso molecular; y propiedades del componente líquido relativas a la absorción tales como concentración de sólidos y viscosidad, y la proporción relativa de líquido al volumen poro disponible. En algunas realizaciones, el líquido se absorberá, el polisacárido empieza a gelificar y el gel rellenará los poros. Otras realizaciones, por ejemplo, una porción sustancial del polisacárido puede gelificar como recubrimiento en las paredes de los poros a medida que se absorbe el líquido.

30 Un polisacárido preferido es alginato. Cuando se usa alginato, el líquido típicamente comprende aproximadamente 0,5% en peso a aproximadamente 10% en peso, preferiblemente aproximadamente 1% en peso a aproximadamente 6% en peso. Un peso molecular medio ponderal adecuado es aproximadamente 4.000 Daltons a 500.000 Daltons, preferiblemente 4.000 a 300.000 Daltons. Como se usa en todo el documento, el peso molecular medio ponderal se determina usando Cromatografía de Exclusión por Tamaños con Detección por Dispersión de Luz Láser Multiángulo (SEC-MALS).

35 El líquido que contiene el polisacárido puede incluir además un componente funcional que se dispone convenientemente, por ejemplo en inclusión en el gel de polisacárido. Se puede añadir cualquier componente funcional siempre que no evite que el componente líquido se absorba en la espuma o que el polisacárido forme un gel. El componente funcional puede ser un líquido o un sólido y, si es insoluble, se dispersa como partículas finas en el líquido. Los componentes deseables que se pueden disponer en el gel incluyen agentes beneficiosos tales como sabores, aromas, medicamentos farmacéuticos y veterinarios, enzimas, modificadores del crecimiento y probióticos, células vivas, incluyendo células de plantas, células de animales y células del ser humano, levaduras, bacterias y similares. La incorporación de productos farmacéuticos, materiales en forma de partículas, células, agregados multicelulares, tejido y similares puede requerir mezclado suave en el polisacárido, preferiblemente alginato, disolución. El componente puede incluir materiales sensibles al calor, fármacos, sabores o aromas que, si se desea, se pueden liberar más tarde del gel.

40 En el caso en que esté presente, el componente funcional se selecciona según el uso intencionado del material compuesto. El material compuesto actúa convenientemente como portador para el componente funcional, liberando el componente en su uso. El material compuesto se puede adaptar a una liberación del componente de una manera particular particularmente en el caso de que el componente funcional sea un producto farmacéutico. El "perfil de liberación" del componente puede ser inmediato, de liberación rápida, de liberación controlada o de liberación pulsada, como se desee.

45 En algunas realizaciones se desea una liberación del componente incluido del gel. La liberación se puede conseguir por desgaste físico del gel o disolución del gel o por simple difusión o fuga del gel. El procedimiento seleccionado para liberar el componente depende de la aplicación y la naturaleza del componente que se tiene que se tiene que liberar y podría incluir la aplicación de energía mecánica o sónica, temperatura o cambio de pH o adición de agentes "de gelificación" tales como agentes quelantes.

55 Los materiales compuestos de la presente invención son útiles en aplicaciones biomédicas tales como matrices de

cultivos celulares, implantes ascendentes soporte de ingeniería de tejidos y sistemas de suministro de liberación controlada para fármacos, productos biológicos, antibióticos y agentes probióticos y para aplicaciones alimenticias, aplicaciones industriales y aplicaciones para el cuidado personal tales como cosmética e higiene oral.

5 En una realización, la invención proporciona un procedimiento para preparar materiales compuestos estériles con células, productos farmacéuticos o materiales en forma de partículas inmovilizados en geles dentro de una espuma de alginato seca, estéril en una o dos etapas fáciles.

10 Las aplicaciones para los materiales compuestos de alginato estériles incluyen inmovilización celular y/o proliferación celular para aplicaciones de cultivos de tejido *in vitro* o *in vivo*, terapia celular y órganos artificiales, un sistema de suministro usado *in vivo* para liberación controlada, para tratamiento de heridas o como una capa anti-adhesión *in vivo*.

15 Los dispositivos para implante en seres humanos tienen convenientemente un contenido en endotoxina menor que 350 EU por dispositivo. Se pueden usar polisacáridos ultrapuros que poseen un bajo contenido en endotoxinas por ejemplo menor que 350 EU/g, preferiblemente menor que 100 EU/g, o para la espuma o como el polisacárido soluble, o ambos, como sea apropiado, dependiendo de la estructura deseada para implante en animales vivos y seres humanos. Por ejemplo, cuando se usan alginatos para implante dentro del cuerpo de un ser humano, los alginatos tienen convenientemente un contenido en endotoxina menor que 100 EU/g.

En una realización preferida, el material compuesto tiene un contenido en endotoxina menor que 10 EU/g.

20 Los materiales compuestos de la presente invención son útiles en crecimiento de tejidos e ingeniería de tejidos en el que se crea el tejido funcional usando células sembradas en tres soportes dimensionales que proporcionan a patrón para guiar el crecimiento de nuevo tejido y asegurar que los nutrientes lleguen a las células y se retiren los productos de desecho. Se puede lograr que el material compuesto de la presente invención facilite el crecimiento hacia adentro deseado y experimente degradación de una manera controlable y predecible. Por ejemplo, cuando se propagan tejidos nuevamente desarrollados por el material compuesto, el material compuesto se degrada convenientemente y proporciona espacio para la formación de nuevo tejido. También se pueden fabricar materiales compuestos que estimulen interacciones específicas con células inmovilizadas y/o células en el área en que se implanta el material compuesto, por ejemplo, liberando moléculas que interactúan con las células y factores de crecimiento, por ejemplo, para la regeneración de hueso, nervios, piel y cartílago. El material compuesto puede liberar factores de crecimiento para favorecer el crecimiento hacia dentro de las células basándose en una geometría deseada y la degradación controlada del implante permite que el tejido óseo regenerado llegue a soportar la carga. El material compuesto de la presente invención se puede diseñar para favorecer o inhibir la proliferación celular como sea apropiado usando iones calcio o iones estroncio como los iones formadores de gel, respectivamente.

35 Se pueden implantar células inmovilizadas en el material compuesto en animales en que el gel actúa como una barrera inmune y evita la detección por el sistema inmunitario permitiendo de ese modo la implantación de xenoinjertos. Convenientemente se puede usar estroncio como iones formadores de gel cuando se desean células animales para implantación (xenoinjertos), puesto que cuando se usa este tipo órgano artificial, es importante que las células no crezcan fuera del material compuesto implantado y lleguen a estar expuestos al sistema inmunitario. El material compuesto también se puede usar para establecer células, tumores y xenoinjertos de tejidos en animales para, por ejemplo, investigación del cáncer. La inmovilización de agregados multicelulares, tales como islotes de Langerhans, en el material compuesto permite que se implanten dichos agregados multicelulares en animales o seres humanos sin rechazo inmunológico y tales agregados celulares implantados pueden funcionar entonces como un órgano artificial que produce, por ejemplo, insulina.

40 Se pueden usar cultivos celulares para fabricar muchos materiales biológicos, por ejemplo enzimas, hormonas, productos inmunobiológicos (tales como anticuerpos monoclonales, interleucinas, linfocinas) y agentes antineoplásicos. Se pueden cultivar células en materiales compuestos según la invención para aumentar el número total de células. Por ejemplo, se pueden cultivar células aisladas de un paciente en un material compuesto de la invención para aumentar el número de células, las células se pueden recuperar después del material compuesto y usar en aplicaciones de ingeniería de tejidos. También se pueden usar cultivos celulares en un material compuesto para explorar, caracterizar y especificar la diferenciación y el crecimiento celulares para producir estructuras similares al tejido. Por ejemplo, las células se ven afectadas por el tensión externo y la modificación de la elasticidad de los materiales de material compuesto (gel/espuma) puede influir la expresión genética.

45 Las células producidas *in vitro* en el material compuesto se pueden recuperar convenientemente del cultivo usando un agente de recuperación. Los agentes de recuperación adecuados incluyen citrato de sodio u otra sal soluble de ácido cítrico, EDTA sódico u otra sal soluble de EDTA y hexametáfosfato.

55 Sin desear estar limitados por ninguna teoría, se cree que la rigidez del material compuesto y el gel en el que se inmovilizan las células son factores importantes para el crecimiento celular puesto que parece que las propiedades mecánicas del gel regulan la proliferación, y se ha observado diferenciación basada en tipos de células. La rigidez del gel (cuando se mide, por ejemplo, por módulo elástico) en que está unida la célula determina la magnitud de la fuerza generada del exoesqueleto y la extensión del esparcimiento celular que asegura. Las propiedades de geles

de alginato varían por concentración de alginato, saturación de iones formadores de gel y tipo de iones formadores de gel. Además, los alginatos se pueden modificar químicamente para añadir secuencias peptídicas para adhesión celular, tales como secuencias peptídicas de adhesión celular tales como el tripéptido RGD.

5 Se pueden usar materiales compuestos según la invención en el tratamiento del cuerpo del ser humano o de un animal para evitar la adhesión entre tejidos. Las intervenciones quirúrgicas pueden causar la coagulación o crecimiento juntos de tejidos, por ejemplo, entre músculos, entre músculos y tendones o nervios u otros tejidos. Para evitar este crecimiento de los tejidos no deseado, se puede insertar una capa anti-adhesión entre músculos, músculos y tendones o nervios para cubrir la herida y evitar la formación de adhesión post-operatoria durante el proceso de curación. Los materiales compuestos de la presente invención se pueden formular para uso como una
10 capa anti-adhesión por selección de materiales por ejemplo una espuma de hialuronato en el material compuesto e iones de gelificación que retarden o eviten el crecimiento celular y la intrusión en la capa anti-adhesión evitando de ese modo la adhesión entre tejidos durante la curación. Los materiales compuestos se pueden lograr a partir de materiales biodegradables que se disuelvan cuando sane la herida (por variación de manera apropiada de la cantidad de iones de reticulación, tipo de polímero, concentración de polímero) y se degradan o excretan del
15 cuerpo.

Dependiendo de las propiedades de la formulación, el material compuesto se puede formular para degradar por diversos periodos de tiempo y liberar de ese modo materiales inmovilizados tales como agentes terapéuticos o agentes regeneradores de tejidos. Un uso preferido de la invención es en reparación de tejidos donde se puede
20 inmovilizar un material orgánico o inorgánico dentro del material compuesto y actuar como soporte para regeneración de tejidos. Uno de tales ejemplos sería la inclusión de hidroxiapatito en el gel dentro de la espuma y después implantación en un defecto óseo para inducir la regeneración ósea en el material compuesto de espuma/gel. Otro de tales ejemplos sería la inclusión de sustancias quimiotácticas o atractoras de células dentro del material compuesto seguido por implantación del material compuesto en un sitio de herida de tejido para fomentar la regeneración del tejido.

25 Cuando se tienen que usar materiales compuestos como aplicaciones de suministro controladas, por ejemplo, de productos farmacéuticos, factores de crecimiento, productos nutricéuticos, sabores o aromas, las propiedades mecánicas y químicas se pueden modificar para la liberación apropiada en el entorno deseado.

Glosario

Albúmina	<i>Albúmina bovina, Fracción V, aprox 99% (A-3059) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania)</i>
Antibiótico-Antimicótico	<i>disolución de Antibiótico-Antimicótico (0710) GIBCO® (Invitrogen Corp, Grand Island, NY, USA)</i>
C ₂ C ₁₂	<i>Línea celular de mioblastos de ratón (ATCC N° CRL-1772)</i>
CaCl ₂	<i>Cloruro de calcio dihidratado, Ph Eur (Riedel-de Haën, Seelze, Alemania)</i>
CaCl ₂	<i>Cloruro de calcio dihidratado (1.02382.1000) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)</i>
CaCO ₃	<i>Eskal 500, Carbonato de calcio, tamaño de partícula ~ 5,2 μm (KSL Staubtechnik, Launing, Alemania)</i>
CaCO ₃	<i>HuberCAL 500 Elite, Carbonato de calcio, tamaño de partícula – 4,2 μm (Huber Engineered Materials, Hamina, Finlandia)</i>
CaCO ₃	<i>HuberCAL 250 Elite, Carbonato de calcio, tamaño de partícula – 8,7 μm (Huber Engineered Materials, Hamina, Finlandia)</i>
Calceína	<i>Calceína, AM, 1 mg/ml (C3099) (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)</i>
Citrato	<i>Citrato de sodio dihidratado, Reactivo A.C.S (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania).</i>
FBS	<i>Suero Fetal Bovino, GIBCO™ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemania)</i>
Dextrano fluorescente	<i>Dextrano 10 kDa, fluoresceína, Pm 10.000, aniónico (D-</i>

ES 2 368 516 T3

	1821) (Molecular Probes, Oregon, USA)
Dextrano fluorescente	Dextrano 70 kDa, fluoresceína, Pm 70.000, aniónico (D-1822) (Molecular Probes, Oregon, USA)
GDL	Glucono δ -lactona (Roquette, Alessandria, Italia).
Glicerina	Glicerina, Ph Eur (VWR Prolabo, Leuven, Bélgica).
Medio de crecimiento	Medio Eagle de Dulbeccos, (D-MEM) modificado para Condrocitos.
Condrocitos	(61965-026) GIBCO™ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemania). FBS inactivado por calor al 10% añadido (20 minutos a 56°C), Antibiótico-Antimicótico al 1% y piruvato de sodio al 1%.
Medio de crecimiento	Medio eagle de Dulbeccos, (D-MEM) modificado para células C ₂ C ₁₂ .
células C ₂ C ₁₂	(D-7777) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA). FBS inactivado por calor al 10% añadido (20 minutos a 56°C), NaHCO ₃ 3,7 g/l, 10 ml/l de aminoácidos no esenciales, 10 ml/l de disolución de Penicilina-Estreptomicina, 1,4 mg/l de puromicina y agua-MQ.
Medio de crecimiento	Medio eagle mínimo esencial (MEM) para células MDCK (M0643)
células MDCK	(Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA). FBS inactivado por calor al 10% añadido (20 minutos a 56°C), 10 ml/l de disolución de Penicilina-Estreptomicina, 2,2 g/l de NaHCO ₃ y agua-MQ.
GDL	Glucono δ -lactona (Roquette, Alessandria, Italia)
Glicerina	Glicerina, Ph Eur (VWR Prolabo, Leuven, Bélgica)
Hank	disolución de sal equilibrada de Hank; Modificada; Con NaHCO ₃ ; Sin rojo de fenol, cloruro de calcio y cloruro de magnesio (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania)
HPMC	Pharmacoa 603, Substitución tipo 2910, Hipromelosa USP, (hidroxipropilmetilcelulosa) (Shin-Etsu Chemical Co Ltd, Japón)
Isoton II	COULTER® ISOTON® Diluyente II (Beckman Coulter, Krefeld, Alemania)
Estuche de ensayo Vivo/Muerto	estuche de Viabilidad/Citotoxicidad para células animales (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)
Manitol	D-Manitol al 98% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania)
MDCK	línea celular de riñón canino Madin Darby (ATCC CCL-34)
Agua-MQ	agua MilliQ
NaCl	Cloruro de sodio, p.a. (Merck, Darmstadt, Alemania)
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania)
Na ₂ HPO ₄	Hidrógenofosfato disódico, art: 30.427 (Riedel-de Häen,

ES 2 368 516 T3

	<i>Seelze, Alemania)</i>
Na-trifosfato	<i>Trifosfato sódico pentabásico (T5883-500G) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania)</i>
NOVATACH RGD	<i>alginato MVG PRONOVA UP acoplado con péptido, lote: CBIFMC01A02122005, filtrado estéril y liofilizado Secuencia peptídica: GRGDSP. Relación péptido:alginato 9,11:1.</i>
NOVATACH VAPG	<i>alginato MVG PRONOVA UP acoplado a péptido, lote: CBIFMC02A02122605, filtrado estéril y liofilizado. Secuencia peptídica: VAPG. Relación péptido:alginato 13,5:1.</i>
Penicilina-Estreptomicina	<i>Disolución de Penicilina-Estreptomicina (P0781) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania)</i>
Protanal® LF 2S Sódico	<i>alginato, grado farmacéutico, viscosidad (disolución acuosa al 1% en peso a 20°C) = 302 mPas (FMC, Filadelfia, PA, USA)</i>
PRONOVA UP MVG	<i>Alginato de sodio, lote: 701-256-11, viscosidad (disolución acuosa al 1% en peso a 20°C) = 385 mPas (NovaMatrix, Oslo, Noruega)</i>
PRONOVA UP LVG	<i>Alginato de sodio, lote: FP-502-04, viscosidad (disolución acuosa al 1% en peso a 20°C) = 50 mPas (NovaMatrix, Oslo, Noruega)</i>
PRONOVA SLG 100	<i>Alginato de sodio estéril, viscosidad (disolución acuosa al 1% en peso a 20°C) = 166 mPas (NovaMatrix, Oslo, Noruega)</i>
PRONOVA SLG 20	<i>Alginato de sodio estéril, viscosidad (disolución acuosa al 1% en peso a 20°C) = 37,5 mPas (NovaMatrix, Oslo, Noruega)</i>
PRONOVA SLM 20	<i>Alginato de sodio estéril, viscosidad (disolución acuosa al 1% en peso a 20°C) = 9,0 mPas (NovaMatrix, Oslo, Noruega)</i>
PRONOVA SLM 20	<i>Alginato de sodio estéril, viscosidad (disolución acuosa al 1% en peso a 20°C) = 92 mPas (NovaMatrix, Oslo, Noruega)</i>
PRONOVA UP	<i>Alginato de sodio LVG, viscosidad (disolución acuosa al 1% en peso a 20°C) = 25 mPas (NovaMatrix, Oslo, Noruega)</i>
<i>PRONOVA UP LVG</i>	
<i>Alginato de sodio ultrapuro, lote: 221105, viscosidad (disolución acuosa al 1% en peso a 20°C) = 35 mPas (NovaMatrix, Oslo, Noruega)</i>	
<i>PRONOVA UP LVG</i>	
<i>Alginato de sodio ultrapuro, lote: FP-502-04, viscosidad (disolución acuosa al 1% en peso a 20°C) = 50 mPas (NovaMatrix, Oslo, Noruega)</i>	
PRONOVA UP LVG	<i>Alginato de sodio, viscosidad (disolución acuosa al 1% en peso a 20°C) = 92 mPas (NovaMatrix, Oslo, Noruega)</i>
PRONOVA UP MVG	<i>Alginato de sodio ultrapuro, lote: FP-310-01, viscosidad (disolución acuosa al 1% en peso a 20°C) = 296 mPas (NovaMatrix, Oslo, Noruega)</i>

PRONOVA UP MVG	<i>Alginato de sodio ultrapuro, lte: FP-312-03, viscosidad (disolución acuosa al 1% en peso a 20°C) = 248 mPas (NovaMatrix, Oslo, Noruega)</i>
PRONOVA UP MVG	<i>Alginato de sodio ultrapuro, lote: 701-256-11, viscosidad (disolución acuosa al 1% en peso a 20°C) = 385 mPas (NovaMatrix, Oslo, Noruega)</i>
PROTASAN CL 210 (214)	<i>Cloruro de quitosán, lote: 708-783-01, desacetilación: 94,5%, pH = 5,3, viscosidad de disolución acuosa al 1% a 20°C = 77 mPas (NovaMatrix, Oslo, Noruega)</i>
PROTASAN UP CL 213	<i>Cloruro de quitosán ultrapuro, lote: FP-104-02, viscosidad (disolución acuosa al 1% en peso a 20°C) = 74 mPas, grado de desacetilación = 86% (NovaMatrix, Oslo, Noruega)</i>
Yoduro de Propidio	<i>(P4170) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)</i>
Puromicina	<i>Dihidrocloruro de puromicina (P7255) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)</i>
Hialuronato de Sodio	<i>Grado farmacéutico 80, lote: 17053P, peso molecular: 1,08*10⁶ g/mol (NovaMatrix para Kibun Food Kemifa Co, Ltd, Kamogawa, Japón)</i>
<i>Piruvato de sodio Disolución de piruvato de sodio 100 mM (S-8636) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)</i>	
Sorbitol	<i>D(-)sorbitol para bioquímica, seco, 100% (Merck, KGaA, Darmstadt Alemania).</i>
Sorbitol especial	<i>Disolución al 70% de sorbitol (SPI Polyols, New Castle, DE, USA)</i>
SrCl ₂	<i>Cloruro de estroncio hexahidratado 99% A.C.S. Reactivo (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania)</i>
SrCO ₃	<i>Carbonato de estroncio 99,9+% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania)</i>

Ejemplo 1

Este ejemplo muestra cómo varía la rigidez o la elasticidad de las espumas como una función de saturación con iones formadores de gel y la temperatura.

- 5 Las formulaciones de espuma húmedas para las tres espumas diferentes ensayadas se presentan en la Tabla 1. Las formulaciones varían el carbonato de calcio de manera que los iones calcio son suficientes para saturar los sitios de gelificación del alginato con 66%, 111% y 155%, respectivamente.

Tabla 1: Formulaciones de espuma húmedas

Ingrediente	66% saturado	111% saturado	155% saturado
Disolución al 4% de alginato			
PRONOVA UP MVG, 701-256-11	111,2	111,2	111,2
Glicerina	6,0	6,0	6,0
Sorbitol especial	18,0	18,0	18,0
HPMC	3,0	3,0	3,0
CaCO ₃ (HuberCAL 500 Elite)	0,45	0,75	1,03

(continúa)

GDL	1,61	2,69	3,77
Agua-MQ	59,7	58,4	57,0
Total, Cantidad en [g]	200,0	200,0	200,0

Se preparó una disolución de alginato y se apartó se dispersó carbonato de calcio en el agua (25 gramos menor que la cantidad mostrada en la Tabla 1) en una cubeta de mezcla. Se añadieron glicerina, sorbitol especial, la disolución acuosa de alginato y HPMC a la misma cubeta y se mezcló la dispersión con un mezclador auxiliar de cocina Hobart equipado con un batidor de alambre a velocidad media durante un minuto para asegurar homogeneidad. Se continuó la mezcla unos siete minutos más a alta velocidad antes de añadir una disolución GDL recién mezclada (es decir, el GDL más los 25 gramos de agua) y más mezclamiento a alta velocidad durante 1 minuto, que proporcionó una densidad de la espuma húmeda resultante de 0,25 g/ml (como se determina a partir del peso de espuma húmeda requerido para rellenar un envase de 100 ml). Las espumas se moldearon en moldes de 2 mm de alto recubiertos con protector exterior Versi-Dry con el lado del polietileno hacia la espuma (Nalgene Nunc International, NY, USA) y se mantuvieron sin tapar durante 60 minutos a temperatura ambiente antes de secar a 80°C en una estufa de secado durante 30 minutos. Las láminas secas de las espumas parecían algo diferentes a medida que variaban en tamaño de poro y espesor. Como la velocidad de gelificación del material de espuma húmedo está relacionada con la saturación con iones formadores de gel, la coalescencia de los poros tendrá lugar más para las espumas saturadas más inferiores.

Se retiraron trozos circulares con un diámetro de 2,1 cm de las láminas de espuma secas. Algunos de los trozos de espuma de la espuma saturada al 111% se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

La espuma se preparó para ensayo mecánico poniendo un trozo de espuma de una placa de Petri con un diámetro de 3,5 cm y añadiendo 4 ml de una disolución fisiológica modelo (CaCl₂ 2,5 mM y 9 mg/ml de NaCl). La espuma se mantuvo en esta disolución durante 5 minutos antes de ser transferida a un Reómetro de Alta Resolución Bohlin CVO 120. La espuma se puso entre placas serradas (PP 25) con un hueco de 500 μm previamente a medidas de oscilación. Se realizaron barridos de tensión con una tensión de cizallamiento aplicada de 0,5 Pa a 50 Pa. Se fijó la frecuencia a 1 Hz. Se realizó el barrido tres veces para cada placa de espuma. El módulo elástico, G', leído en la región viscoelástica lineal (G'_{lin}) se indica en la Tabla. La temperatura de la disolución fisiológica añadida, la temperatura durante el hinchamiento y durante las mediciones fue o 20°C o 37°C.

Tabla 2: G'_{lin} de Composiciones de Espuma a dos temperaturas (n = 3).

Espuma	G' _{lin} ± SEM a 20°C, [Pa]	G' _{lin} ± SEM a 37°C, [Pa]
66% saturado	762 ± 5	736 ± 29
111% saturado	2.375 ± 52	1.820 ± 41
111% saturado (esterilizado en autoclave)	2.469 ± 39	No ensayado
155% saturado	5.374 ± 358*	3.943 ± 195

*n = 6

Los datos mostraron un incremento en módulo elástico como una función de la cantidad aumentada de iones formadores de gel. Las condiciones de esterilización en autoclave no parecieron afectar al módulo de la espuma a saturación del 111%.

Ejemplo 2

Este ejemplo muestra cómo los iones formadores de gel difunden desde la espuma a una disolución de alginato añadida y de ese modo se induce gelificación. El módulo elástico se midió como función del tiempo después de que se añadiera la disolución de alginato para describir la cinética de gelificación y el aumento en elasticidad del material.

Se preparó un material compuesto de discos de espuma seca (2,1 cm de diámetro) de las mismas espumas saturadas al 66% y 111% preparadas en el ejemplo 1 y 250 μl de PRONOVA UP LVG al 1% (99 mPas) por distribución de manera uniforme de la disolución por adición gota a gota desde una pipeta sobre la superficie superior de la espuma. Todo de la disolución de alginato añadida se absorbió y se llenaron los poros por la espuma. Los iones calcio presentes en las espumas saturadas al 66% y al 111% saturaron el 43% y el 71% de la cantidad total de alginato en el material compuesto. El material compuesto se transfirió al reómetro 5 minutos después de la adición de la disolución de alginato. Se fijó el hueco a 300 μm y la frecuencia y la deformación se mantuvieron constantes a 1 Hz y 0,001, respectivamente. El módulo de elasticidad, G, del material compuesto como una función

de tiempo se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3: G como una función de tiempo después de la adición de disolución de alginato a la espumas

Tiempo, [min]	G ± SEM a 20°C, [Pa]	
	espuma saturada al 66%	espuma saturada al 111%
6	828	1.787
15	858	2.931
30	893	3.499
45	919	3.863
60	942	4.020
75	970	4.059
90	997	3.986
105	1.067	4.027

5 Los resultados muestran un incremento en el módulo elástico como una función de tiempo para las dos espumas, que indica la difusión de iones formadores de gel de la espuma de alginato a la disolución de alginato añadida y la gelificación resultante. Los valores de G aumentan rápido y alcanzan una meseta después de 60 minutos para la espuma saturada al 111%. Para la espuma saturada al 66% los valores de G son menores, aumentan más lentamente y los resultados indican que la difusión no era completa dentro de los 105 minutos con ensayo.

Ejemplo 3

10 Este ejemplo muestra como se puede modificar la elasticidad de los biomateriales compuestos con el uso de espumas que contienen cantidades variables de iones formadores de gel y añadiendo soluciones de alginato con diferente contenido en G y peso molecular.

15 Las espumas ensayadas fueron la espuma saturada al 111% y la espuma saturada al 111% que se había esterilizado en autoclave del ejemplo 1 y una nueva espuma saturada al 155% como en el ejemplo 1 excepto usando una mezcla de carbonato de calcio donde la mitad del CaCO₃ fue reemplazada con un CaCO₃ con diámetro de partícula mayor (HuberCAL 250 Elite, 87 μm). Esta espuma tenía poros algo mayores que la espuma saturada al 155% del ejemplo 1 y podía absorber más disolución de alginato con una viscosidad mayor. La densidad húmeda de la espuma saturada al 155% fue 0,24 g/ml. Se pusieron discos de espuma (diámetro 2,1 cm) como en el ejemplo 1 en cajas de petri y se añadieron en la superficie superior 250 μl de disolución de alginato con el uso de una pipeta. 20 Todo de la disolución de alginato añadida se absorbió y llenó los poros por las espumas. Las placas que contenían espumas con disolución de alginato añadida se mantuvieron a temperatura ambiente durante 60 minutos y después se añadieron 4 ml de la disolución fisiológica modelo. Después de 5 minutos, se transfirió el disco al reómetro y se realizó un barrido de tensión como se describe en el ejemplo 1 excepto que el hueco se fijó a 300 μm. El G_{lin} medido para estas muestras se presentan en la tabla 4. El contenido en G del PRONOVA UP LVG es aproximadamente 25 67% (alto-G) mientras que PRONOVA SLM 20 contiene aproximadamente el 43% de G (alto-M). Las muestras de alginato con la menor viscosidad se prepararon por degradación del peso molecular del alginato por esterilización en autoclave de disoluciones al 1% y 2% del PRONOVA SLM 20 y PRONOVA UP LVG, respectivamente, durante 20 minutos a 121 °C.

30 Tabla 4: G_{lin} de materiales compuestos con concentración de alginato variable de la disolución de alginato añadida durante para dos pesos moleculares (1% de viscosidad) de alginato de alto M.

Saturación de espuma	alginato PRONOVA SLM 20	Saturación completa de material compuesto	G _{lin} ± SEM a 20°C, [Pa] para materiales compuestos con SLM 20 visc = 9 mPas	G _{lin} ± SEM a 20°C, [Pa] para materiales compuestos con SLM 20 visc = 92 mPas

111%	1,0%	82%	3.373 ± 24	4.063 ± 208
111%	0,75%	88%	2.856 ± 139*	3.846 ± 196
111%	0,5%	94%	2.720 ± 164*	3.498 ± 168
111%	0,25%	102%	2.963 ± 38	3.089 ± 231
(*n = 5)				

Tabla 5: G_{lin} de materiales compuestos con concentración variable de la disolución de alginato añadida para dos pesos moleculares (1% de viscosidad) de alginato alto en G.

Saturación de espuma	alginato PRONOVA UPLVG	Saturación completa de material compuesto	$G'_{lin} \pm SEM$ a 20°C, [Pa] para LVG visc = 25 mPas	$G'_{lin} \pm SEM$ a 20°C, [Pa] Para LVG visc = 99 mPas
155%	1,0%	98%	5.037 ± 209	no ensayado
155%	0,5%	120%	3.792 ± 185	no ensayado
111%	1,2%	67%	4.344 ± 44	5.060 ± 259*
111%	1,0%	71%	3.870 ± 197	4.740 ± 71
111%	0,75%	78%	3.485 ± 114	3.522 ± 115
111%	0,5%	87%	3.189 ± 61	3.147 ± 70
111%	0,25%	97%	3.241 ± 174	2.786 ± 100
111%	1,0%	71%	no ensayado	4.768 ± 147
Esterilizado en autoclave				
(*n=5)				

- 5 Los datos mostraron que los materiales compuestos con el módulo elástico más alto con alginato al 1,0% y 0,5% añadido fueron espumas saturadas al 155% con el alginato alto en G añadido. El peso molecular del alginato es de importancia para alginatos tanto alto en G como alto en M ya que el módulo elástico G_{lin} disminuye con viscosidades decrecientes, excepto para concentraciones de alginato de 0,75% y por debajo para el alginato alto en G donde se obtuvieron resultados similares. En general, el módulo elástico G_{lin} disminuía a medida que disminuía la concentración del alginato añadida para espumas saturadas tanto al 155% como al 111% y para cuatro diferentes alginatos. Se observaron excepciones para los alginatos de baja viscosidad a las concentraciones más bajas. El módulo elástico G_{lin} del material compuesto no se modificó por esterilización en autoclave de la espuma.

Ejemplo 4

- 15 Este ejemplo muestra cómo se ve influenciada la elasticidad del material compuesto por lavado del material compuesto en una disolución que contiene iones formadores de gel adicionales.

- 20 Se pusieron discos de espuma seca (diámetro de aproximadamente 2,1 cm) de la espuma saturada al 111% en el ejemplo 1 en cajas de Petri y se añadieron 250 microlitros de PRONOVA UP LVG al 1% (99 mPas) a la superficie superior de la espumas y se mantuvo a temperatura ambiente 60 minutos. Después los materiales compuestos se incubaron en 4 mililitros de o una disolución 50 mM de $CaCl_2$ o una disolución 50 mM de $SrCl_2$. Después de 5 minutos se reemplazó la disolución que contenía iones formadores de gel extra con disolución fisiológica modelo y después de otros 5 minutos se midió el G_{lin} como se describe en el ejemplo 1. Otra muestra que no recibió iones formadores de gel extra añadidos tuvo añadida la disolución fisiológica modelo 60 minutos después de que se añadiera el alginato y se midió el G_{lin} después de 5 minutos de hinchamiento. Los resultados se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6: El módulo G'_{lin} de materiales compuestos preparados con y sin lavado en una disolución que contiene iones formadores de gel extra (n = 3).

Lavado	$G'_{lin} \pm SEM$ a 20°C, [Pa]
50 mM CaCl ₂	13.100 ± 700
50 mM SrCl ₂	15.900 ± 600
No lavado	2.700 ± 100

5 Los datos muestran más de cuatro a casi seis veces de aumento en módulo elástico G'_{lin} por lavado de los materiales compuestos con una disolución que contiene iones calcio o estroncio, respectivamente. Se obtuvo un valor más alto para los materiales compuestos lavados en la disolución que contiene iones estroncio que crean una red de gel más rígida que el material compuesto lavado con iones calcio.

Ejemplo 5

10 Este ejemplo muestra cómo la proliferación y la viabilidad de células inmobilizadas MDCK (Riñón Canino Madin Darby) en alginato se ven influenciadas variando la saturación de calcio de la espuma de alginato, y el efecto de añadir iones formadores de gel adicionales al material compuesto después de la inmovilización celular.

Se prepararon dos espumas diferentes de alginato con iones calcio suficientes para saturar 100% y 200% de los sitios de gelificación del alginato. Las formulaciones de espuma húmedas se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7: Formulaciones de espuma húmedas

Ingrediente	Espuma saturada al 100%	Espuma saturada al 200%
disolución de alginato al 4% (PROTANAL LF 200S)	125	125
Glicerina	6,0	6,0
Sorbitol especial	18,0	18,0
HPMC	3,0	3,0
CaCO ₃ (Eskal 500)	0,76	1,52
GDL	2,66	5,32
Agua desionizada	44,6	41,2
Total [cantidad en g]	200,0	200,0

15 Se preparó una disolución acuosa de alginato. Después se dispersó el CaCO₃ en el agua como se enumeró anteriormente, excepto para 25 g, en una cubeta de mezcla. Se añadió glicerina, sorbitol especial, la disolución acuosa de alginato y HPMC en la misma cubeta y se mezcló la dispersión con un mezclador auxiliar de cocina Hobart equipado con un batidor de alambre a velocidad media durante 1 minuto para asegurar la homogeneidad.

20 Para la espuma saturada al 100%, se continuó el mezclamiento durante 3 minutos a alta velocidad. Después se disolvió GDL en los 25 g restantes de agua y se añadió a la espuma húmeda. La dispersión se mezcló más a alta velocidad durante 30 segundos. La densidad húmeda resultante de la espuma al 100% fue 0,23 g/ml. Para la espuma saturada al 200%, el tiempo de mezcla a alta velocidad fue 3,5 minutos antes de la adición de GDL y después adicionalmente 15 segundos de mezcla a alta velocidad. La espuma al 200% tenía una densidad húmeda

25 de 0,26 g/ml. Las dos espumas se moldearon en moldes recubiertos de Teflón altos de 1 mm y se mantuvieron sin cubrir durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de secar a 80°C en una estufa de secado durante 30 minutos.

Se cortaron discos (diámetro = 3,6 cm) de las láminas de espuma seca con un bisturí y se envasaron por separado. Los discos de espuma se esterizaron en autoclave después a 121°C durante 20 minutos.

30 Se disolvió alginato estéril (PRONOVA SLG 100) en medio de crecimiento celular (MEM) a una disolución de alginato al 1%. La disolución de alginato y una suspensión de células MDCK en medio de crecimiento se mezclaron

a una concentración final de 0,8% de alginato y 200.000 células/ml. Los discos de espuma de alginato se transfirieron a pozos en una placa de 6 pozos (Nuncion®, Nalgene Nunc International), donde se adaptaron estrechamente al tamaño del pozo. Se distribuyó 1,0 ml de la suspensión de células de alginato gota a gota con una pipeta para cada una de las espumas y los materiales compuestos de alginato se incubaron a 37°C durante 20 minutos. Los iones calcio presentes en la espuma saturada al 100% y 200% fueron suficientes para saturar el 67% y el 133% de los sitios de gelificación de la cantidad total de alginato, respectivamente. A la mitad de las muestras se le dio después un lavado post-tratamiento añadiéndolas a aproximadamente 5 ml de una disolución acuosa que contiene CaCl₂ 50 mM y NaCl 104 mM. Después de 10 minutos, se reemplazó la disolución de sal con medio de crecimiento celular. A las muestras restantes se añadió medio de crecimiento celular después de los 20 minutos de incubación. Los materiales compuestos de alginato con las células inmovilizadas se mantuvieron a 37°C y se cambió el medio de crecimiento tres veces a la semana. La cuantificación de la proliferación celular y la viabilidad se midieron después de diferentes veces después de inmovilización. Las células inmovilizadas se inmovilizaron transfiriendo los materiales compuestos de alginato para centrifugar tubos que contienen aproximadamente 8 ml de disolución de citrato isotónico trisodiocitrato dihidratado 50 mM y NaCl 104 mM). Se les dio la vuelta a los tubos con cuidado regularmente hasta que se disolvió el material compuesto dentro de aproximadamente 2-10 minutos y después se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos. Los sobrenadantes se separaron por vertido y los gránulos que contienen las células se resuspendieron en 1,0 ml de manitol 250 mM. Tres muestras de cada una de 100 microlitros, 80 microlitros y 50 microlitros de los gránulos resuspendidos se transfirieron después a pozos en una placa de 96 pozos (Nuncion®, Nalgene Nunc International). Después se añadieron cero, 20 microlitros y 50 microlitros de manitol respectivamente (es decir, para llenar cada pozo a un total de 100 microlitros) y después unos 100 microlitros más de reactivo vivo/muerto. El reactivo vivo/muerto se fabricó a partir de 5 ml de disolución de manitol (250 mM), 20 microlitros de disolución de etidio (2 mM) y 5 µl de disolución de calceína (4 mM). Se prepararon curvas patrón de células viables y fijadas con etanol dentro del intervalo de 0 - 10⁶ células.

La proliferación celular y la viabilidad se midieron con el uso de lector de microplacas Cytofluor. Las cargas usadas para Calceína fueron 485 nm (excitación) y 530 nm (emisión) y para Etidio fueron 530 nm (excitación) y 620 nm (emisión).

Tabla 8: Viabilidad y proliferación celular como una función de tiempo a partir de la variación de materiales compuestos (n = 3, ± SEM).

Tipo de muestra	Edad	Recuento celular total	Normalizado	Células muertas,%
100% no lavado	1 semana	231.800± 10.200,	1,2± 0,1	9± 2
	3 semanas	130.300± 28.700	0,65± 0,14	63± 18
	5 semanas	224.700± 121.000	1,1± 0,6	45± 23
	7 semanas	196.800± 28.400	1,0± 0,1	55± 9
100%, lavado	1 semana	189.600± 5.100	0,95± 0,03	7± 2
	3 semanas	304.900± 31.500	1,5± 0,2	37± 4
	5 semanas	322.200± 82.800	1,6± 0,4	39± 11
	7 semanas	660.300± 394.600	3,3± 2,0	40± 8
200% no lavado	1 semana	212.600± 34.700	1,1± 0,2	8± 3
	3 semanas	258.300± 62.500	1,3± 0,3	43± 4
	5 semanas	283.400± 73.300	1,4± 0,4	44± 6
	7 semanas	364.800± 22.300	1,8± 0,1	60± 2
(continúa)				
Tipo de muestra	Edad	Recuento celular total	Normalizado	Células muertas,%

200%, lavado	1 semana	255.600± 48.900	1,3± 0,2	8± 2
	3 semanas	712.800± 292.600	3,6±1,5	18± 2
	5 semanas	485.600± 217.400	2,4± 1.1	28± 5
	7 semanas	663.600± 176.500	3,3± 0,9	42± 5

Los datos en la Tabla 8 muestran que la etapa de lavado añadiendo iones calcio extra (que proporciona una red de gel más rígido) fomenta la proliferación celular. Como el número de células aumentó con el tiempo, se observó que la viabilidad celular disminuía. La investigación de los materiales compuestos en un microscopio de fluorescencia después de empaparlos en los reactivos vivo/muerto demostró que las muestras de materiales compuestos lavadas tenían más células esparcidas.

Ejemplo 6

Este ejemplo muestra cómo la proliferación y la viabilidad de las células de mioblastos de crecimiento rápido de ratón (células C₂C₁₂) se ven afectadas por la etapa de lavado después de inmovilización celular y el efecto del tipo de iones formadores de gel en las disoluciones de lavado.

Una espuma de alginato se fabricó con calcio como iones formadores de gel, suficientes para saturar el alginato por 155%. La formulación de espuma húmeda se presenta en la Tabla 9.

Tabla 9: Formulación de espuma Húmeda

Ingrediente	Cantidad, [g]
disolución de alginato al 4% (PRONOVA UP MVG, FP-312-30)	113,0
Glicerina	6,0
Sorbitol especial	18,0
HPMC	3,0
CaCO ₃ (HuberCAL 500 Elite)	1,05
GDL	3,77
Agua-MQ	57,0

La espuma húmeda se preparó como se describe en el Ejemplo 5, excepto la mezcla a alta velocidad durante 7 minutos antes de la adición de GDL disuelto en 30 g del agua total seguido por unos 30 segundos adicionales de mezcla a alta velocidad. La densidad de la espuma resultante fue 0,29 g/ml y la espuma se moldeó en un molde de 2 mm de profundidad recubierto con un protector exterior Versi-Dry con el lado de polietileno hacia la espuma. La espuma se mantuvo después sin cubrir a temperatura normal durante 1 hora antes de que se secase en una estufa de secado a 80°C durante 30 minutos.

Se retiraron discos (diámetro = 2,1 cm) de las láminas de espuma secas y envasadas por separado. Los discos de espuma se esterilizaron después en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Las espumas de alginato estériles se transfirieron a pozos en una placa de 12 pozos (Nunclon[®], Nalgene Nunc International), donde se adaptaron estrechamente al tamaño del pozo. Se distribuyeron 300 µl de una disolución de alginato al 1% (PRONOVA SLG 20) que contenía 25.000 células gota a gota con una pipeta a la espuma. Las espumas se incubaron después durante 20 minutos a 37°C. Los iones calcio presentes en la espuma fueron suficientes para saturar la cantidad total de alginato en el material compuesto por 97%. Se añadió medio de crecimiento D-MEM a un tercio de las espumas. Aproximadamente 2 mililitros de una disolución de calcio isotónica (CaCl₂ 50 mM y 250 mM de manitol) se añadieron a la mitad de las espumas restantes, mientras la otra mitad de las espumas restantes recibió una disolución de estroncio isotónica (SrCl₂ 50 mM y 250 mM de manitol). Las disoluciones de gelificación se reemplazaron con medio de crecimiento después de aproximadamente 2-5 minutos. Las espumas con las células inmovilizadas se mantuvieron a 37°C y se cambió el medio de crecimiento tres veces a la semana.

La cuantificación de la proliferación celular y la viabilidad se midieron dos veces, el día 1 y a las 10 semanas después de la inmovilización (Figura 2). Las células inmovilizadas se aislaron como se describe en el Ejemplo 5,

5 excepto diferentes disoluciones de desgelificación se usaron durante los ensayos el día 1 y a las 10 semanas. Las espumas ensayadas 1 día después de la inmovilización celular se disolvieron en 10 ml de una disolución que contenía citrato 50 mM y 250 mM de manitol. Las espumas ensayadas 10 semanas después de la inmovilización celular se disolvieron en 10 ml de disolución de Hank que contenía citrato 50 mM añadido. Los gránulos de células recubiertos se dispersaron en 1 ml de reactivo Vivo/muerto (fabricado a partir de 4 ml de Isoton II, 1 ml de yoduro de propidio (85 µg/ml) y 20 µl de calceína (1 mg/ml). Se añadieron dos gotas en una cámara de recuento Bürker para recuento celular en un microscopio fluorescente, mientras el resto de la dispersión celular se filtró por una malla de nailon de 60 µm y después cinco minutos después de resuspensión, se analizaron las células con el uso de un citómetro de flujo Elite EPICS Coulter.

10 Tabla 10: La proliferación y la viabilidad de células C₂C₁₂ en tres diferentes materiales compuestos se presentan como la media de 3 ó 4 materiales compuestos ± SEM.

	Proliferación celular, número total de células	Proliferación normalizada, [%]	celular, Células Muertas, [%]
Espuma sin lavado			
- 1 día	19.900 ± 1.600	0,8 ± 0,1	28 ± 3
- 10 semanas	216.300 ± 5.200	8,7 ± 0,2	70 ± 6
Espuma con lavado con CaCl₂			
- 1 día	25.500± 1.600	1,0± 0,1	21± 4
- 10 semanas	349.000± 66.400	14± 3	72± 4
Espuma con lavado con SrCl₂			
- 1 día	14.400± 1.200	0,6± 0,1	32±0
- 10 semanas	117.000± 11.500	4,7± 0,5	72± 6

15 Los resultados muestran un incremento del número total de células en los tres materiales compuestos. La proliferación de células C₂C₁₂ es lo más altamente fomentada para células inmovilizadas en los materiales compuestos que se lavaron con una disolución que contenía iones calcio adicionales después de la inmovilización celular. Las células de crecimiento más lento fueron las células inmovilizadas en los materiales compuestos que se lavaron con una disolución que contenía iones estroncio después de la inmovilización celular.

20 La investigación de los materiales compuestos en un microscopio de fluorescencia mostró que las células inmovilizadas en los materiales compuestos lavadas con iones calcio fueron extendidas y crecieron tanto en como por la estructura. Las células inmovilizadas en los materiales compuestos lavadas con iones estroncio fueron visibles como células solas o pequeños racimos.

Ejemplo 7

25 Este ejemplo muestra cómo la proliferación celular y la viabilidad de los condrocitos humanos se ven afectadas variando la fuente de iones formadores de gel en la espuma de alginato, la etapa de lavado después de inmovilización celular y el efecto de los diferentes iones formadores de gel en las disoluciones de lavado.

Se fabricaron espumas de alginato con o calcio o estroncio como el ión gelificante suficiente para saturar el alginato por 155% y 105%, respectivamente. Las formulaciones de espuma húmedas se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11: Formulación de Espuma Húmeda

Ingrediente	espuma-Ca	espuma-Sr
disolución de alginato al 4% (PRONOVA UP MVG, FP-	107,8	107,8

310-01)		
Glicerina	6,0	6,0
Sorbitol especial	18,0	18,0
HPMC	3,0	3,0
CaCO ₃ (HuberCAL 500 Elite)	1,05	0
SrCO ₂	0	1,05
GDL	3,77	3,77
Agua desionizada	57,0	57,0
Cantidad Total, en [g]	200,0	200,0

5 Las espumas húmedas se prepararon como se describe en el Ejemplo 6, excepto que se usan 8 minutos con mezcla a alta velocidad antes de la adición de GDL disuelto en 30 g de agua del agua total y que se usan 45 segundos de mezcla final a alta velocidad. Las densidades de espuma húmeda resultantes fueron 0,30 g/ml y la espumas se moldearon en moldes de 2 mm de profundidad recubiertos con protector exterior Versi-Dry. Las espumas se mantuvieron después sin cubrir a temperatura normal durante 1 hora antes de que se secan en una estufa de secado a 80°C durante 30 minutos.

10 La preparación de discos de espuma de alginato y la adición de células a la espumas se hicieron como se describe en el Ejemplo 7 excepto que 300 µl de una disolución de alginato al 1% (PRONOVA SLG 20) con 195.000 células/ml se añadió a las espumas. Los iones formadores de gel presentes fueron suficientes para saturar el total de monómeros G en los alginatos por 97% y 63% para la espuma gelificada con iones calcio y la espuma gelificada con ión estroncio, respectivamente.

15 La cuantificación de la proliferación celular y la viabilidad se midieron dos veces, a las 2 semanas y 11 semanas después de la inmovilización de células en las espumas de alginato gelificadas con iones Calcio (espumas de Ca) y una vez después de 13 semanas para las espumas de alginato gelificadas con iones Estroncio (espumas de Sr) y tales datos se muestran en la Tabla 12. Las células inmovilizadas se aislaron como se describe en el Ejemplo 6, excepto que se usaron 15 ml de disolución de desgelificación (Hank con citrato 50 mM) para las espumas de Sr. La preparación de la muestra para cuantificación celular y el uso del citómetro de flujo fueron como se describe en el Ejemplo 6.

20 Tabla 12: Proliferación y viabilidad de Condrocitos en seis diferentes materiales compuestos presentados como la media de 3 ó 4 materiales compuestos ± SEM.

Espuma	Lavado	Tiempo	Recuento celular total	Recuento celular normalizado	células muertas,%
espuma-Ca	ninguno	2 semanas	36.800± 3.000	0,6± 0,1	28± 4
espuma-Ca	ninguno	11 semanas	65.400± 4.200	1,1± 0,1	50± 4
espuma-Ca	CaCl ₂	2 semanas	50.600± 1.800	0,9± 0,1	22± 2
espuma-Ca	CaCl ₂	11 semanas	132.700± 12.900	2,3± 0,4	64± 5
espuma-Ca	SrCl ₂	2 semanas	32.800± 2.500	0,6± 0,1	27± 2
espuma-Ca	SrCl ₂	11 semanas	35.400± 4.800	0,6± 0,2	36± 2
espuma-Sr	ninguno	13 semanas	40.800± 2.100	0,7± 0,1	48± 2
espuma-Sr	CaCl ₂	13 semanas	89.700± 11.600	1,5± 0,1	63± 5
espuma-Sr	SrCl ₂	13 semanas	52.700± 1.800	0,9± 0,1	34± 3

Los resultados descritos en la Tabla 12 muestran que las matrices de alginato en materiales compuestos lavados

con disolución de ión calcio presentaban al menos dos veces tantas células después de 11 semanas como los otros materiales compuestos. Esto indica proliferación celular fomentada debido a ión calcio adicional y/o su efecto de proporcionar una matriz de gel más rígida. Los resultados también muestran una proliferación celular inhibida para las células inmovilizadas en matrices en materiales compuestos lavados en disolución de ión estroncio. Las tendencias similares se observaron para las espumas de estroncio. Las espumas de estroncio lavadas con ión calcio mostraron el mayor crecimiento celular de las series de espumas de estroncio. Las espumas de estroncio sin lavado o lavadas con la disolución que contiene estroncio mostró poco o ningún incremento en el número total de células. Se observó muerte celular incrementada en el tiempo a medida que proliferaban las células. Los porcentajes más altos de células viables se observaron en los materiales compuestos que contenían las células de crecimiento más lento. La investigación de los materiales compuestos en un microscopio de fluorescencia demostró que las células inmovilizadas en los materiales compuestos lavados con calcio se extendían y cultivaban tanto en como por la estructura. Las células inmovilizadas en los materiales compuestos lavados con iones estroncio fueron visibles como únicas células o pequeños racimos.

Ejemplo 8

Este ejemplo muestra cómo se pueden usar biomateriales de materiales compuestos como matriz proporcionando liberación controlada de un material inmovilizado y cómo el perfil liberado se puede modificar como una función del tamaño del material inmovilizado.

Las espumas de alginato ensayadas fueron igual como se presenta en el Ejemplo 1 y tenían calcio incorporado suficiente para saturar el 111% de los sitios de gelificación del alginato. Los discos de espuma con un diámetro de 1,0 cm se retiraron con un sacabocados. Una disolución de alginato acuosa al 1,1% se fabricó de PRONOVA UP LVG (FP-502-04). Esta disolución de alginato se diluyó con agua-MQ y una disolución con dextrano fluorescente (6,25 mg/ml) para dar cuatro disoluciones diferentes variando en concentración de alginato y tipo de dextrano fluorescente como se presenta en la Tabla 13. 80 µl de una disolución que contenía alginato y dextrano fluorescente se pipeteó en un disco de espuma de alginato y después de 10 minutos se absorbió completamente la disolución en la espuma. El calcio presente en la espuma de alginato fue suficiente para saturar los sitios de gelificación en la cantidad total de alginato en la disolución y la espuma por 62%. La cantidad de dextrano fluorescente añadida a cada uno de los discos de la espuma fue 45,63 µg. Los discos de espuma se mantuvieron a temperatura ambiente sólo cubiertos con hoja de aluminio para evitar la luz. Cada uno de los discos de espuma se transfirió después por separado a un tubo que contenía 10 ml de Hank. Los tubos se agitaron horizontalmente a aprox 20 rpm y se recogieron muestras de 10 µl para cuantificación de dextrano fluorescente que podía haberse fugado del material compuesto. La concentración de dextrano fluorescente en las muestras recogidas y las disoluciones patrón (dextrano fluorescente 10 kDa y - 70 kDa diluido en Hank) se analizó con el uso de lector de microplacas Cytofluor. Los filtros usados fueron 485 nm (excitación, ancho de banda de 2 nm) y 530 nm (emisión, ancho de banda de 25 nm). Las curvas estándar se hicieron de ambos tipos de dextranos fluorescentes con cinco paralelas en el intervalo de 0 mg/ml a 0,01 mg/ml. Las curvas de ajuste dieron coeficientes de correlación $R^2 = 0,998$ y $R^2 = 0,979$ para 10 kDa y 70 kDa, respectivamente.

Se recogieron muestras 5 -, 15 -, 30 -, 45 -, 60 -, 90 -, 120 - y 150 minutos después de que se transfirieran los discos a disolución Hank. Después de 150 minutos los valores medidos alcanzaron una meseta. Con el uso de curvas de ajuste no lineal descritas por $f(t)=100-100e^{-kt}$ (k: constante de velocidad, t: tiempo) y programas de cálculo en GraFit Workspace se determinaron los tiempos medios. Los resultados se presentan en la tabla 13.

Tabla 13: Disoluciones con discos de espuma de alginato añadido (V = 80 µl/disco, n=3).

Disolución	Concentración de alginato, [%]	Dextrano fluorescente, peso molecular, [kDa]	Tiempo medio, [min]% SD
1	1,0	10	16,9± 1,3
2	0,5	10	15,4± 1,3
3	1,0	70	22,0 ± 1,3
4	0,5	70	21,2±1,5

Los resultados muestran una diferencia significativa en la velocidad de liberación entre los dos pesos moleculares de dextrano fluorescente. Los resultados también indican una liberación más rápida de ambos dextranos inmovilizados en concentraciones menores de alginato.

Ejemplo 9

Este ejemplo muestra inmovilización de células en espumas de alginato y el uso de alginatos acoplados a péptidos para fomentar la proliferación celular.

A la espuma de alginato usado en este ejemplo se añadió suficiente calcio para saturar el 125% del alginato. La formulación de espuma húmeda se presenta en la tabla 14.

Tabla 14: Formulación de espuma húmeda

Ingrediente	Cantidad, [g]
Disolución de alginato al 4% (PRONOVA UP MVG, FP-311-01)	106,8
Glicerina	6,0
Sorbitol (seco)	13,9
HPMC	3,0
CaCO ₃ (HuberCal 500 Elite)	0,85
GDL	3,01
Agua-MQ	66,4
Total	200,0

5 La espuma se fabricó como se describe en el Ejemplo 1, excepto que la densidad húmeda fue 0,24 g/ml y la espuma se moldeó en un molde de 2 mm de alto recubierto con Teflón. El equipo usado fue o despirogenizado por tratamiento con calor a 250°C durante 4 horas o lavado en NaOH 1 M. La espuma seca se esterilizó por irradiación gamma (dosis: 29,5 kGy).

10 Se retiraron discos de espuma (diámetro = 2,1 cm) con el uso de un sacabocados y se transfirieron a pozos en una placa de 12 pozos. La Tabla 15 presenta tres mezclas diferentes de células (C₂C₁₂) y alginato que se prepararon. Las células se suspendieron en medio de crecimiento (DMEM) y se cuantificaron con el uso de una cámara de recuento Bürker. Se disolvió alginato regular (PRONOVA SLG 20, lote: 221.105) en DMEM, mientras que se disolvieron alginatos acoplados a péptidos (NOVATACH VAPG y NOVATACH RGD) en 250 mM de manitol. Las densidades de péptido acoplado a los alginatos se midió que eran 0,045 µmoles/mg de sólidos y 0,031 µmoles/mg de sólidos para (NOVATACH VAPG y NOVATACH RGD respectivamente (medido por procedimiento de aminoácido).

Tabla 15: Suspensiones para inmovilización de células

Material	Suspensión	Suspensión	Suspensión
	1	2	3
	[ml]	[ml]	[ml]
Células (1.056.667 células/ml)	0,43	0,43	0,43
Disolución de alginato (2%, p/v)	2,25	1,75	1,53
DMEM	1,82	1,33	1,10
NOVATACH VAPG (1%, p/v)	-	1,00	-
NOVATACH RGD (1%, p/v)	-	-	1,45
Total	4,50	4,50	4,50

20 Cada suspensión tiene una concentración total de alginato de 1,0%. 250 µl de las suspensiones presentadas en la tabla 15 se añadieron a cada uno de los discos de espuma, diferentes suspensiones a diferentes discos. El calcio en la espuma es suficiente para saturar los monómeros G en la cantidad total de alginato con 77%. La concentración de péptido en cada disco fue 0,025 µmoles y la cantidad de células fue 25.000 por disco. Se hizo gotear la suspensión en la espuma con el uso de una pipeta. La espuma absorbió toda la disolución añadida y el espesor después de hidratación fue aproximadamente 1,2 mm. Las espumas fueron transferidas después de la adición de suspensión celular a una incubadora y se mantuvieron a 37°C durante 20 minutos. Después de que se hubiera añadido la mitad

25

de los discos de espuma aproximadamente 2,5 ml de DMEM mientras que a la otra mitad se añadieron aproximadamente 2,5 ml de una disolución isotónica de CaCl₂ 50 mM y 250 mM de manitol. Después de aproximadamente cinco minutos las espumas con la disolución que contenía calcio añadida consiguieron esta disolución reemplaza con DMEM.

5 Después de dos días se aislaron las células como se describe en el Ejemplo 5, excepto que los discos de espuma se disolvieron en una disolución que contenía citrato de trisodio 50 mM y 250 mM de manitol. Se resuspendieron los gránulos de células después de centrifugación en 600 µl de manitol 250 mM. Se transfirieron después tres muestras de cada una de 100 µl y 80 µl de los gránulos resuspendidos a pozos en una placa de 96 pozos. Después se añadieron cero y 20 µl de manitol respectivamente (es decir, para llenar cada pozo a un total de 100 µl) y después unos 100 µl más de reactivo vivo/muerto. El reactivo vivo/muerto se fabricó a partir de 5 ml de disolución de manitol (250 mM), 20 µl de disolución de etidio (2 mM) y 5 µl de disolución de calceína (4 mM). Se prepararon curvas patrón de células viables y fijadas con etanol dentro del intervalo de 0-10⁵ células. Las curvas de ajuste proporcionaron coeficientes de correlación R² = 0,988 y R² = 0,984 para células viables y muertas, respectivamente.

15 La cuantificación de células viables aisladas de cada disco de espuma se realizó con el uso de lector de microplacas Cytofluor como se describe en el Ejemplo 5. Los resultados se presentan en la tabla 16. Las señales para células muertas fueron aproximadamente el valor del blanco para todas las muestras así que estos datos no se presentan.

Tabla 16: Viabilidad y proliferación celular como una función de tiempo para los diferentes materiales compuestos

(n = 3, ± SEM)

<i>Espuma</i>	<i>Lavado con calcio después de inmovilización celular</i>	<i>Células viables</i>
Suspensión 1	No	19.400 ± 1.300
Suspensión 1	Sí	20.200 ± 980
Suspensión 2	No	31.200 ± 1.900
Suspensión 2	Sí	20.100 ± 1.000
Suspensión 3	No	60.800 ± 1.000
Suspensión 3	Sí	46.300 ± 500

20 Los datos en la tabla 16 indican que NOVATACH RGD fomenta la proliferación celular más

Ejemplo 10

Este ejemplo presenta un procedimiento para producir espumas de quitosán y sus características relativas a densidad y absorción.

25 Se preparó una disolución acuosa que contenía al de quitosán al 4% usando PROTASAN CL 210 (214). Se añadieron 77,0 g de agua-MQ y 14 g de sorbitol a una cubeta de mezcla y se disolvió el sorbitol por distribución cuidadosa en la cubeta. Se añadieron 100 g de la disolución de quitosán, 6,0 g glicerina y 3,0 g de HPMC a la misma cubeta de mezcla. Se mezcló a dispersión con un mezclador auxiliar de cocina Hobart equipado con un batidor de alambre a velocidad media durante un minuto para asegurar homogeneidad. Continuó el mezclamiento a alta para velocidad durante 2,5 minutos. La densidad húmeda cuando se midió que era 0,23 g/ml (determinada del peso de espuma húmeda requerido para llenar un envase de 100 ml). La espuma húmeda se moldeó en moldes de 2 mm y 4 mm de alto Teflón y después se pusieron en una estufa de secado a 80°C durante 30 minutos y 60 minutos, respectivamente.

Otra espuma se fabricó por el procedimiento como anteriormente, pero la espuma húmeda se moldeó en un molde de 8 mm de profundidad. Se secó la espuma a 80°C dur ante 1 hora y después 3 horas a 40°C.

35 Las espumas secas resultantes fueron flexibles y blandas con una red de poros abiertos. La espuma hidratada retuvo su forma, pero era relativamente débil porque la espuma húmeda no se podía transferir en una pieza adaptándola desde una esquina. Comprimir la espuma seca antes de hidratación no afectó de manera apreciable a la velocidad de absorción de la espuma o capacidad de absorción.

40 Para medir la capacidad de absorción de trozos de espuma se cortaron a 3,5 cm por 3,5 cm con el uso de un bisturí. Se pesó un trozo de espuma y se puso en una malla (diámetro 0,71 mm) y se añadió Disolución de Sal de Equilibrio de Hank, como una disolución fisiológica modelo, usando una pipeta, se añadió líquido en exceso y las espumas se

volvieron transparentes. Cuando no se observó goteo del trozo de espuma, se midió el peso de la espuma húmeda. Se midió la densidad seca y la capacidad de absorción para las tres espumas diferentes y los resultados se presentan en la tabla 17.

Tabla 17 Densidad seca y capacidad de absorción de una disolución fisiológica modelo de espumas de quitosán de diferente espesor (n=3, ± SD).

5

Espesor espuma antes de secar, [mm]	Espesor espuma seca, [mm]	Peso de espuma seca, 3,5 cm por 3,5 cm, [g]	Densidad seca, [g/cm ³]	Peso espuma húmeda, [g]	Absorción, [g Hank absorbido/g espuma]
2	1,95	0,101±0,002	0,042± 0,001	2,02± 0,04	19,0 ± 0,1
4	3,20	0,164± 0,003	0,042± 0,001	3,20± 0,12	18,5± 0,8
8	5,50	0,390± 0,013	0,058± 0,002	6,76± 0,12	16,4± 0,3

Ejemplo 11

Este ejemplo presenta un material de espuma de dos capas que comprende espuma de alginato como la primera capa y espuma de quitosán como segunda capa unida a la espuma de alginato Este tipo de material compuesto se puede usar para modificar la integridad, la resistencia, biodegradación y capacidad de absorción de la espuma de quitosán.

Una espuma de alginato se fabricó preparando primero una disolución acuosa que contenía alginato al 4% (PRONOVA UP MVG). Se transfirieron 111,2 g de la disolución de alginato a una cubeta de mezcla. A la misma cubeta se añadieron 6,0 g de glicerina, 18,0 g de sorbitol especial, 3,0 g de HPMC, 0,85 g de CaCO₃ (suficiente para saturar los restos gulurónicos en el alginato con 125%) y 33,3 g de agua-MQ. La dispersión se mezcló con un mezclador auxiliar de cocina Hobart equipado con un batidor de alambre a velocidad media durante 1 minuto y 30 segundos para asegurar homogeneidad. Se continuó el mezclamiento a alta velocidad durante 7 minutos antes de una disolución GDL recién mezclada de 2,69 g de GDL y se añadieron 25,0 g de agua-MQ. Se continuó el mezclamiento a alta velocidad durante 1 minuto, que dio como resultado una espuma con una densidad húmeda de 0,23 g/ml. La espuma húmeda se moldeó en moldes de 4 mm y 2 mm de alto recubiertos con un protector exterior Versi-Dry con el lado del polietileno hacia la espuma (Nalgene Nunc International, NY, USA) y se mantuvo sin cubrir durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Después se añadió espuma de quitosán húmeda en la parte de arriba de las espumas de alginato húmedas gelificadas como capas de 2 mm y 4 mm (aumentando la altura del molde) a la parte superior de las espumas de alginato gelificadas espesas de 2 mm y 4 mm, respectivamente. La espuma de quitosán se fabricó como se describe en el Ejemplo 10 excepto que se usaron 18,0 g de sorbitol especial en vez de sorbitol seco y se añadieron 73,0 g de agua-MQ para esta espuma. El tiempo de mezcla a velocidad media fue 2 minutos y después 3 minutos de mezclamiento a alta velocidad, que dio como resultado una espuma con una densidad húmeda de 0,22 g/ml. Los moldes con las espumas de dos capas después se pusieron en una estufa de secado a 80°C durante 1,5 horas antes de que se transfirieran a una estufa a 37°C y se continuó el secado durante la noche.

Las espumas secas resultantes fueron blandas y flexibles con una red de poro abierto. Los poros en la parte de espuma de alginato fueron más pequeños que en la espuma hecha a partir de quitosán. No fue posible separar los dos tipos de espuma después de secado. Cada una de las capas de espuma absorbió instantáneamente agua (el tiempo de absorción de la primera gota añadida fue menor que 1 segundo para la espuma de quitosán y aproximadamente 3 segundos para la espuma de alginato) y permanecieron unidas después de la hidratación. La parte de alginato hidratada de la espuma hidratada tenía una resistencia a la tracción alta mientras que la parte de quitosán hidratada fue muy débil. Se rompieron trozos de espuma de quitosán hidratada cuando se empujó con un dedo el lado de espuma de quitosán o cuando la espuma de quitosán se estiró empujando contra el lado reverso (espuma de alginato). El fallo no fue la deslaminación.

40 Ejemplo 12

Este ejemplo describe un procedimiento para la reticulación de una espuma de quitosán para hacerla más estable en relación con la biodegradación y proporcionando una integridad en húmedo mayor.

Se fabricó una espuma de quitosán como se describe en el Ejemplo 11 excepto que los tiempos de mezcla fueron 1,5 minutos y 4,5 minutos a velocidad media y alta, respectivamente. La densidad de la espuma húmeda resultante

fue 0,20 g/ml. La espuma húmeda se moldeó en moldes de 2 mm y 4 mm de profundidad. Después se cargó una disolución 100 mM de trifosfato de Na en un frasco pulverizador con la boquilla ajustada para dar gotas finas. Se pulverizó la disolución de trifosfato de sodio sobre las espumas húmedas aproximadamente 50 ml y 100 ml para los de 2 mm y los de 4 mm, respectivamente. Las espumas húmedas absorbieron algo de la disolución pulverizada, de manera que la adición se realizó varias veces con menos de un minuto entre cada adición. Las espumas húmedas se secaron después en una estufa de secado a 80°C durante 1 hora y 2 horas para el moldeado de las espumas en los moldes de 2 mm y 4 mm, respectivamente.

Las espumas secas fueron blandas, flexibles y tenían una red de poros abiertos. Las espumas absorbieron agua instantáneamente y se deformaron menos tras hidratación y fueron más fuertes que las espumas de quitosán no reticuladas en el Ejemplo 10.

Ejemplo 13

Este ejemplo muestra que una espuma de quitosán que contenía iones de gelificación tendrán la capacidad de inducir la gelificación de una disolución de quitosán añadida externamente in situ.

Se retiraron discos de espuma (diámetro = 2,1 cm) con el uso de un sacabocados de la espuma moldeada en el molde de 4 mm de alto presentados en el Ejemplo 12. Después se puso un disco de espuma en la placa serrada en el mismo reómetro como se usó en el ejemplo previo. Se añadió después al disco disolución en exceso de agua-MQ o una disolución al 1,0% de quitosán (PROTASAN UP CL 213). Se redujo la placa superior (PP25) a un hueco de 500 μm y se realizó un barrido de tensión con una tensión de cizallamiento aplicada de 0,5 Pa a 50 Pa. Las medidas de oscilación se iniciaron aproximadamente tres minutos después de la adición de disolución. La frecuencia se fijó a 1 Hz. Se realizó dos veces el barrido para cada placa de espuma. El módulo elástico, G', leído en la región viscoelástica lineal (G'_{lin}) y el ángulo de la fase se indican en la Tabla 18.

Tabla 18: G'_{lin} y ángulo de fase medido para espumas de quitosán reticuladas con agua y disolución de quitosán añadidas.

Disolución añadida	G' _{lin} ± SD, [Pa]	Ángulo de fase, [°]
Agua-MQ	502 ± 65	24,6 ± 0,3
Disolución de quitosán al 1,0%	777 ± 29	17,6 ± 4,1

Basándose tanto en el módulo elástico como en el ángulo de fase los resultados en la tabla indican propiedades más similares a gel de la espuma después de la adición de disolución de quitosán.

Ejemplo 14

Este ejemplo muestra cómo el tiempo de mezcla y la cantidad de aire incorporados en las espumas de quitosán afectan a diferentes propiedades de la espuma.

Se prepararon espumas de quitosán como se describe en el Ejemplo 10 excepto que se usaron diferentes tiempos de mezcla para obtener diferentes densidades de la espuma. Todos los ingredientes de la espuma para crear una espuma húmeda se mezclaron a velocidad media durante 1,5 minutos. Después se continuó le mezclamiento a alta velocidad durante 1 minuto con una densidad húmeda resultante de 0,45 g/ml. Aproximadamente la mitad de la espuma se moldeó en moldes de 4 mm y 2 mm de alto. Después se mezcló la espuma restante a alta velocidad durante un minuto adicional. La densidad húmeda resultante fue 0,29 g/ml y el resto de la espuma se moldeó como anteriormente. Se repitió un procedimiento similar como anteriormente excepto que los tiempos de mezcla a alta velocidad fueron primero 45 segundos y lo segundo 4 minutos y 45 segundos. Las densidades húmedas fueron 0,52 g/ml y 0,18 g/ml, respectivamente. Las dos espumas con las más altas densidades húmedas obtuvieron una película fina en la superficie contra el molde. Esto se debe a coalescencia de los poros ya que la espuma se seca más lentamente cerca del fondo. La densidad de la espuma se determinó retirando discos, a partir de la espuma moldeada en el molde de 4 mm de alto, con un diámetro de 1 cm con el uso de un sacabocados y pesándolos. Las densidades y el espesor medido por un calibre de las diferentes espumas se presentan en la tabla 18. Las espumas se caracterizaron también por su módulo elástico, G'_{lin}, con los mismos ajustes del reómetro como se describe en el Ejemplo 10 excepto que el intervalo de tensión aplicada fue 0,5 Pa a 18 Pa, y que se realizaron tres barridos para cada trozo de espuma. Los resultados se incluyen en la tabla 19, que presenta los valores medios de los dos últimos barridos para tres espumas diferentes con un diámetro de 1 cm. Los trozos de espuma se mantuvieron en 2 ml de disolución de Hank aproximadamente cinco minutos antes de que se transfirieran al reómetro. La resistencia a la tracción de las espumas secas se midió con el uso de un Analizador de Textura SMS Textura Analizar y agarres de deformación A/TG. La fuera requería estirar la espuma a 0,5 mm/s hasta que se leyó rotura y fuerza y distancia máxima estirada cuando se rompió se indican en la tabla 19. Los trozos de espuma se cortaron con forma de hueso con el uso de un bisturí con las dimensiones; 3,15 cm de largo, 1,75 cm de ancho en los extremos y 1,25 cm de ancho en el centro, lo que se estrecha empieza 1 cm desde los extremos. Se cortó la espuma con esta forma para

asegurar la rotura en el medio de la espuma y no donde estaba unida a los agarres. Aproximadamente se usaron 3 cm de cada extremo del trozo de espuma para asegurarlo a los agarres.

Tabla 19: Espumas de quitosán de diferente densidad y sus propiedades. (n = 3, ± SEM) (La espuma con densidad húmeda de 0,23 g/ml es la espuma del Ejemplo 10)

Densidad húmeda de la espuma, [g/ml]	Densidad seca de la espuma, [mg/cm ²]	Espesor, [mm]	Resistencia a la tracción, [g]	Distancia antes de ruptura, [mm]	G' _{lin} , [Pa]
0,52	24,8± 0,2	2,4	138 ± 10	20 ± 2	133 ± 23
0,45	22,4± 0,7	2,5	148 ± 8	14 ± 2	115 ± 6
0,29	17,4± 0,4	3,2	79 ± 1	5,1 ± 0,2	55 ± 3
0,23	15,4± 0, 2	3,4	60± 1	6,6± 0,3	51± 1
0,18	12,5± 0,3	3,7	49± 1	6,7± 0,5	9± 1

5 La tabla muestra que las espumas con las densidades húmedas más altas se hundían debido sobre todo a coalescencia. También se observó que las espumas tenían tamaño de poro creciente por aumento de la densidad húmeda. La resistencia a la tracción y el módulo elástico disminuyeron por cantidades incrementadas de aire. También la elasticidad de los materiales presentada como la longitud que el material se podía estirar antes de que se rompiera disminuía por disminución de la densidad húmeda. Los tres materiales menos densos tuvieron aproximadamente la misma elasticidad.

Ejemplo 15

Este ejemplo describe la preparación de una espuma de ácido hialurónico (AH) con iones calcio incorporados. También se muestra la capacidad de las espumas para donar estos iones para inducir la gelificación de una disolución de alginato añadida de manera externa.

Una disolución acuosa que contiene 2,5% de AH se preparó y se apartó. Se añadieron 49,65 g de agua-MQ, 2,35 g de CaCl₂·2H₂O y 10,5 g de sorbitol (seco) a una cubeta de mezcla y se disolvieron los ingredientes secos por distribución cuidadosa de la cubeta. Se añadieron 130 g de la disolución de AH, 4,5 g de glicerina y 3,0 g de HPMC a la misma cubeta de mezcla. Después se mezcló la dispersión con un mezclador auxiliar de cocina Hobart equipado con un batidor de alambre a velocidad media durante dos minutos para asegurar homogeneidad. Continuó la mezcla a alta velocidad durante 3 minutos y 50 segundos. La densidad húmeda se midió que era 0,21 g/ml (determinado a partir del peso de espuma húmeda requerido para llenar un envase de 100 ml). La espuma húmeda se moldeó en moldes de 2 mm y 4 mm de alto recubiertos con Teflón y después se pusieron en una estufa de secado a 80°C durante 50 minutos.

Con el uso de un sacabocados se retiraron discos de espuma (diámetro = 2,1 cm) de la espuma moldeada en un molde de 4 mm de alto. Se preparó una disolución de alginato al 1,0% y 0,5% se preparó de PRONOVA SLG 20 (lote: 221105) por adición de agua-MQ. Se puso un disco de espuma seca en un Reómetro de Alta Resolución Bohlin CVO 120 entre placas serradas (PP25). Después se añadieron 350 µl de la disolución de alginato usando una pipeta. El contenido en calcio en el disco de espuma es suficiente para saturar restos de la gelificación del alginato añadido por 124% y 248% para la disolución al 1,0% y 0,5%, respectivamente. Después de un minuto se absorbió la disolución de alginato y se cerró la espuma para que estuviera completamente hidratada. La placa superior se redujo a un hueco de 500 µm y se iniciaron las medidas del módulo elástico, G'. Se fijaron la frecuencia, la deformación y la temperatura a 1 Hz, 0,001 y 20°C, respectivamente. Los resultados se presentan en la tabla 20.

Tabla 20: Módulo elástico, G', como una función de tiempo después de la adición de agua y disoluciones de alginato a la espuma de AH con iones calcio incorporados.

Tiempo, [min]	Agua-MQ	Módulo elástico, G', [Pa] alginato al 0,5%	alginato al 0,1%
2	26	743	1.665
4	31	660	2.153

(continúa)

6	27	698	2.544
8	25	750	3.003
Tiempo, [min]	Agua-MQ	Módulo elástico, G', [Pa] alginate al 0,5%	alginate al 0,1%
10	25	816	3.322
15	-	1.003	4.167
20	-	1.193	4.732
25	-	1.355	5.608
30	-	1.591	6.292
35	-	1.867	6.602

El aumento de G' durante los minutos justo después de la adición de la disolución de alginato, confirma la donación de iones de gelificación y que se ha iniciado una reacción de gelificación. La diferencia en el valor de G' entre las tres disoluciones confirma que se está creando un gel y que el gel más fuerte se crea a partir de la disolución de alginato más concentrada.

Ejemplo 16

Este ejemplo describe la preparación de una espuma de AH con iones fosfato incorporados. También se muestra la capacidad de las espumas para donar estos iones para inducir la gelificación de una disolución de quitosán añadido de manera externa.

La espuma se fabricó como se describe en el Ejemplo 15, excepto que la fuente de calcio fue reemplazada con 2,27 g de Na_2HPO_4 y la cantidad de agua usada fue 49,7 g. El tiempo de mezcla a alta velocidad fue 3 minutos que proporcionó una densidad húmeda de 0,17 g/ml. Las espumas moldeadas en moldes de 2 mm y 4 mm se mantuvieron en la estufa de secado a 80°C durante 45 min y 75 min, respectivamente.

Se usaron los mismos parámetros para medidas reológicas que como se describe en el Ejemplo A. Se añadieron en cantidad en exceso agua y disolución de quitosán al 1,0%. Los valores que describen el módulo elástico, G', y el ángulo de fase se estabilizó en los valores presentados en la tabla 21.

Tabla 21: Módulo elástico, G', y ángulo de fase de espumas de AH rehidratadas con iones fosfato incorporados.

Disolución añadida	Módulo elástico, G', [Pa]	Ángulo de fase, [°]
disolución de quitosán al 1%	76	22
Agua-MQ	18	46

Los resultados indican que la espuma añadida a la disolución de quitosán consigue un comportamiento más similar al de un gel y es más rígida que la espuma a la que se ha añadido agua-MQ.

Ejemplo 17

Este ejemplo describe la preparación de una espuma de quitosán que contiene iones calcio. El calcio inmovilizado en la espuma de quitosán indujo in situ la gelificación de una disolución de alginato cuando se absorbió por la espuma de quitosán seca. Tales estructuras pueden ser útiles en aplicaciones biomédicas para inmovilización celular o para proporcionar la liberación controlada de fármacos, enzimas, hormonas, etc., inmovilizadas.

Una espuma de quitosán se fabricó comprendiendo las mismas cantidades e ingredientes que como en el ejemplo 11 excepto que se reemplazaron 2,35 g de agua-MQ con 2,35 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (80 mM). Una espuma húmeda con una densidad húmeda de 0,20 g/ml se fabricaron por mezcla a velocidad media y alta durante 1,5 minutos y 6 minutos, respectivamente. La espuma húmeda se moldeó en moldes de 2 mm y 4 mm de alto como se describe más adelante. Después se pusieron en una estufa de secado a 80°C durante 1,5 horas. Las espumas secas fueron blandas y flexibles con una red de poros abierta y una densidad seca de $0,039 \pm 0,001 \text{ g/cm}^3$. La espuma absorbió agua instantáneamente y tuvo una integridad húmeda similar a la de las espumas del Ejemplo 10. Esta espuma se expandió disolución de Hank comparada esta espuma con las espumas del Ejemplo 10. La capacidad de absorción

de la disolución de Hank para esta espuma se midió que era $16,8 \pm 1,9$ g/g de espuma (valor promedio de tres muestras \pm SD). Los poros de esta espuma fueron algo mayores que los de la espuma de 4 mm de espesor del Ejemplo 10, esto se puede describir por más coalescencia debido a la viscosidad disminuida del quitosán debido a la resistencia iónica de la disolución.

- 5 Se retiraron los discos de espuma de la espuma moldeada en bandejas de 4 mm de alto, usando un sacabocados con un diámetro de 2,1 cm. Se puso después un disco de espuma seca en un Reómetro de Alta Resolución Bohlin CVO 120 entre placas serradas (PP25). Después se añadieron 500 μ l de una disolución de alginato al 1% (PRONOVA UP LVG) usando una pipeta. El contenido en calcio en el disco de espuma es suficiente para saturar los restos de la gelificación del alginato añadido por 96%. Después de un minuto se absorbió la disolución de alginato y se cerró la espuma para que estuviera completamente hidratada. La placa superior se redujo a un hueco de 1.000 mm y se iniciaron las medidas del módulo elástico, G'. La frecuencia, deformación y temperatura se fijaron fueron a 1 Hz, 0,001 y 20°C, respectivamente. Los resultados se presentan en la tabla 22.

Tabla 22: El módulo elástico, G', como función de tiempo para espumas de quitosán a las que se añadieron disolución de alginato y agua (n=3).

Tiempo, [min]	Módulo elástico, G' \pm SD [Pa] alginato	Módulo elástico, G', \pm SD [Pa] (agua)
1	4.987 \pm 5	470 \pm 16
2	5.867 \pm 40	501 \pm 13
3	6.346 \pm 15	516 \pm 15
4	6.653 \pm 72	515 \pm 9
5	6.850 \pm 64	529 \pm 17
7	7.078 \pm 65	531 \pm 23
9	7.191 \pm 76	532 \pm 23
11	7.216 \pm 122	536 \pm 21
12	7.260 \pm 120	534 \pm 21

15

El alto valor de G' para los discos de espuma a los que se añadió disolución de alginato y el aumento de G' durante los minutos justo después de la adición, confirma la donación de iones formadores de gel a la disolución de alginato a partir de la espuma de quitosán.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para formar un material compuesto que comprende proporcionar una espuma que comprende un polisacárido seleccionado de alginato, pectina, carragenina, hialuronato, quitosán y mezclas de los mismos e iones formadores de gel para formar un gel y con poros, poniendo en contacto un componente líquido con dicha espuma, comprendiendo dicho componente líquido un polisacárido soluble seleccionado de alginato, pectina, carragenina, hialuronato, quitosán y mezclas de los mismos, teniendo dicho polisacárido soluble en dicho componente líquido sitios de gelificación capaces de formar un gel tras su contacto con dichos iones, por lo cual tras el contacto con dichos iones, un gel que comprende el polisacárido soluble del componente líquido se forma dentro de los poros de dicha espuma.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que se esteriliza la espuma.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que al menos una porción de los iones formadores de gel se incorpora en la espuma por lavado o sumergiendo la espuma en una disolución que contiene iones formadores de gel y retirando después la disolución en exceso.
4. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que los iones formadores de gel no pueden formar un gel con la espuma que comprende el polisacárido.
5. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la espuma comprende un alginato modificado.
6. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la espuma comprende un alginato modificado con al menos una secuencia peptídica de adhesión celular.
7. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polímero en la espuma comprende un alginato y el peso molecular promedio de dicho alginato es de 10 kDa a 500 kDa.
8. Un procedimiento según la reivindicación 7, en el que el peso molecular promedio del alginato en la espuma es de 50 kDa a 300 kDa.
9. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polímero en la espuma comprende un alginato y el alginato tiene un contenido en G mayor que 20%.
10. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los iones formadores de gel están presentes en una cantidad molar equivalente a al menos el 10% de los sitios de gelificación del polisacárido soluble.
11. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los iones formadores de gel están presentes en una cantidad molar equivalente a 5% a 250% de los sitios de gelificación del polisacárido soluble.
12. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los iones formadores de gel comprenden iones calcio y los iones de gelificación están presentes en una cantidad molar equivalente del 5% al 200% de los sitios de gelificación del polisacárido soluble.
13. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los iones formadores de gel comprenden iones estroncio y los iones de gelificación están presentes en una cantidad molar equivalente a al menos del 5% al 200% de los sitios de gelificación del polisacárido soluble.
14. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los iones formadores de gel comprenden iones bario y los iones de gelificación están presentes en una cantidad molar equivalente a al menos del 5% al 200% de los sitios de gelificación del polisacárido soluble.
15. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polisacárido soluble tiene una concentración en peso de 0,2% a 10% en dicho líquido que comprende el polisacárido soluble.
16. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polisacárido soluble tiene una concentración en peso de 0,5% a 5% en dicho líquido que comprende el polisacárido soluble.
17. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polisacárido soluble comprende un alginato.
18. Un procedimiento según la reivindicación 17, en el que el alginato tiene un contenido en endotoxina menor que 100 EU/g si es usado para materiales compuestos de espuma/gel que se vayan a implantar dentro del cuerpo humano.
19. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que el polisacárido soluble comprende alginato con un peso molecular promedio de 4.000 Daltons a 500.000 Daltons.

20. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polímero en el componente líquido comprende un alginato y el alginato tiene un contenido en G de 20% a 80%.
21. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polímero en el componente líquido comprende un alginato y el alginato tiene un contenido en M de al menos el 20%.
- 5 22. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho componente líquido comprende además un componente funcional seleccionado del grupo que comprende un aroma, un perfume, un material en forma de partículas, células, agregados multicelulares, un agente terapéutico, un agente regenerador de tejidos, un factor de crecimiento y un producto nutricional.
- 10 23. Un procedimiento según la reivindicación 22, en el que dicho componente líquido es inerte a, o estabiliza el, componente funcional.
24. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho polisacárido soluble comprende alginato y contiene una secuencia peptídica de adhesión celular.
- 15 25. Un material compuesto que comprende una espuma con un gel dentro de los poros de dicha espuma, obteniéndose dicho material compuesto por un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
26. Un material compuesto que comprende:
- a. una espuma que comprende un polisacárido seleccionado de alginato, pectina, carragenina, hialuronato, quitosán y mezclas de los mismos, en el que la espuma tiene poros y comprende iones formadores de gel distribuidos por al menos una parte de la espuma y
- 20 b. un gel que comprende un polisacárido seleccionado de alginato, pectina, carragenina, hialuronato, quitosán y mezclas de los mismos, en el que el gel está situado dentro de los poros de la espuma y interactúa con la espuma.
- 25 27. Un material compuesto que comprende una espuma que comprende un polisacárido seleccionado de alginato, pectina, carragenina, hialuronato, quitosán y mezclas de los mismos, con poros, teniendo la espuma iones formadores de gel en la que un gel de polisacárido seleccionado de alginato, pectina, carragenina, hialuronato, quitosán y mezclas de los mismos está presente en al menos algunos de los poros.
28. Un material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, en el que la espuma puede absorber de 1 a 30 veces su peso de agua.
- 30 29. Un material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, en el que el módulo elástico del material compuesto es de 0,1 kPa a 1.000 kPa.
30. Un material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29, en el que la espuma y/o el polisacárido comprende un polisacárido ultrapuro que posee un contenido en endotoxina de al menos el 350 EU.
- 35 31. Un material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 30, en el que el gel del polisacárido comprende además un componente funcional seleccionado del grupo que comprende un aroma, un perfume, un material en forma de partículas, células, agregados multicelulares, un agente terapéutico, un agente regenerador de tejidos, un factor de crecimiento y un producto nutricional.
32. Un material compuesto según la reivindicación 31, en el que el componente funcional comprende células.
33. Un material compuesto para inhibición de la proliferación celular que comprende el material compuesto según la reivindicación 32, en el que el ión formador de gel comprende ión bario, ión estroncio o mezclas de los mismos.
- 40 34. Un material compuesto para fomentar la proliferación celular que comprende el material compuesto según la reivindicación 31, en el que el ión formador de gel comprende ión calcio.
35. Un material compuesto según la reivindicación 25, en el que la espuma comprende un alginato, comprendiendo además el material compuesto un principio activo farmacéutico.
- 45 36. Un material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 35, para su uso como matriz para inmovilización y/o proliferación celular para una aplicación de cultivo de tejidos in vitro o una aplicación de ingeniería de tejidos in vivo.
37. Un material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 35, en el que el material compuesto comprende además un agente terapéutico para su uso en proporcionar liberación controlada in vivo del agente activo en un ser humano o en el cuerpo animal.
- 50 38. Un material compuesto según la reivindicación 25 en el que la espuma comprende alginato para su uso en un

procedimiento para fomentar el crecimiento celular, en el que el material compuesto es implantado en un ser humano o en el cuerpo de un animal con el fin de establecer crecimiento celular.

5 39. Un procedimiento según la reivindicación 1 para inducir la gelificación in situ dentro de los poros de dicha espuma, en el que la espuma comprende un alginato y el componente líquido comprende un alginato soluble y agua, comprendiendo dicho procedimiento añadir el componente líquido a una espuma de alginato de poros abiertos gelificada con iones formadores de gel incorporados en la misma; y haciendo reaccionar el alginato soluble con dichos iones formadores de gel a medida que la espuma absorbe el componente líquido, formando de ese modo un gel dentro de los poros.

10 40. Un material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 35, para su uso en un procedimiento para evitar la adhesión de tejido a tejido adyacente en que se aplica el material compuesto al tejido, de manera que proporciona una barrera entre el tejido y el tejido adyacente.

41. Un procedimiento para formar una espuma absorbente seca con una red de poros abiertos y poros y que comprende iones formadores de gel para gelificar una disolución de polisacárido añadida con posterioridad, procedimiento que comprende:

15 i. formar una espuma húmeda a partir de una dispersión acuosa que comprende un polisacárido seleccionado de alginato, pectina, carragenina, quitosán y mezclas de los mismos y un agente espumante y opcionalmente uno o más de un plastificante, un agente de reticulación y un modificador de pH;

ii. mezclar una espuma de la dispersión acuosa, opcionalmente por agitación mecánica;

iii. opcionalmente realizar una o más etapas de:

20 1. moldear o conformar la espuma y

2. ii) formar una espuma reticulada de la espuma;

iv. secar la espuma para formar una espuma seca que contiene poros abiertos y b. añadir iones formadores de gel en una o más de las etapas a) a d) o después de la etapa d).

25