

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 879**

51 Int. Cl.:

A61L 27/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2009 E 09785207 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 2373354**

54 Título: **Andamio de reparación tisular**

30 Prioridad:

12.12.2008 GB 0822745

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

28.06.2013

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF MANCHESTER (100.0%)
Oxford Road
Manchester M13 9PL, GB**

72 Inventor/es:

**DOWNES, SANDRA y
BOSWORTH, LUCY, ANN**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 409 879 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

Andamio de reparación tisular.

5 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a un andamio de reparación tisular y a un procedimiento de uso del andamio de reparación tisular, en particular en el tratamiento de tendones dañados.

10 ANTECEDENTES

[0002] Los procedimientos convencionales para reparar daño tisular y ayudar a la recuperación de dicho daño no son completos y tienen una serie de inconvenientes. Por lo tanto, el daño tisular, y en particular el daño en los tendones, representa un desafío importante.

[0003] Los tendones son una forma de tejido conjuntivo y tiene una gran flexibilidad y elasticidad, que permite que las fuerzas generadas por la contracción muscular sean transmitidas al hueso unido, permitiendo el movimiento. Como resultado de su capacidad para absorber fuerzas externas, los tendones son capaces de actuar como un amortiguador, ayudando a prevenir la lesión del músculo unido.

[0004] El tendón natural es un ejemplo de un tejido jerárquico muy organizado. Está compuesto principalmente de fibras de colágeno de tipo I alineadas, con tenocitos dispuestos en filas entre estas fibras. Las propiedades mecánicas de los tendones difieren dependiendo de su localización dentro del cuerpo. Los estudios in vivo de los tendones de Aquiles [Magnusson S P y col., 2003] y tibial anterior [Maganaris C N, 1999] humanos dieron módulos de 788 MPa y 1,2 GPa y resistencias a la tracción de 36,5 MPa y 25 MPa, respectivamente. Sin embargo, el ensayo no se hizo hasta la rotura y solo se puede usar como guía.

[0005] Todos los tendones pueden ser potencialmente afectados por daño directo causado por desgarros u otras lesiones accidentales. También son susceptibles a las enfermedades. Clínicamente, los trastornos de tendones se denominan "tendinopatía" ya que esto no hace ninguna suposición de los procesos patológicos dentro del tendón, aunque todavía se usa el término "tendinitis".

[0006] Son preocupantes en particular las tendinopatías en el tendón de Aquiles, que producen la degeneración del tejido. Estas a menudo son resultado de una sobrecarga excesiva y repetitiva del tendón de Aquiles tanto en pacientes deportistas como sedentarios.

[0007] Otros tendones propensos a la patología incluyen el manguito de los rotadores en el hombro, en el que la degeneración y el tamaño de los desgarros típicamente aumentan con la edad, y el tendón de la rótula en la rodilla, que experimenta degeneración debido a llevar una carga excesiva y a la tensión más que la tendinitis inflamatoria.

[0008] Se usa una variedad de tratamientos para la gestión de tendinopatías. En la fase temprana de la enfermedad, habitualmente se usan procedimientos conservadores (tales como el uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y corticoesteroides). Para aquellos pacientes que no responden bien a estos tratamientos después de 6 meses, es común la intervención quirúrgica.

[0009] Para los pacientes que presentan una rotura aguda del tendón de Aquiles, el tratamiento entra en 3 categorías principales - quirúrgico abierto, quirúrgico percutáneo y no quirúrgico.

[0010] La cirugía abierta implica la reparación de dos extremos rotos del tendón suturándolos entre sí. El tratamiento quirúrgico percutáneo es una combinación de técnicas quirúrgicas abiertas y no quirúrgicas e implica una serie de incisiones pequeñas usadas para suturar el tendón sin exponer el tejido completamente. Los tratamientos no quirúrgicos implican la inmovilización de la parte inferior de la pierna con escayola durante un periodo de 6-8 semanas.

[0011] Debido a la frecuente respuesta pobre al tratamiento y la resultante morbosidad de la enfermedad de tendones, hay un creciente interés en nuevas técnicas para la reparación de dichos tejidos. Después de la lesión, el tendón cura por producción de tejido cicatricial, que es organizativa, bioquímica y biomecánicamente inferior al tejido de la matriz del tendón normal. Dicho tejido cicatricial inferior conduce a la morbosidad en curso de los pacientes afectados.

[0012] Las estrategias previas usadas para mejorar la calidad de la reparación de tendones después de lesión incluyen los xenoinjertos de tendones reticulados con glutaraldehído [Smith y col., 1986]. Los procedimientos de ingeniería tisular han usado tenocitos autólogos en andamios de biomateriales [Cao y col., 2002]. Se han

investigado los andamios basados en colágeno en un intento de igualar las propiedades mecánicas con el tendón natural [Venugopal y col., 2005 y Curtis y col., 2005].

5 **[0013]** Se han investigado los andamios trenzados que comprenden haces de fibras biodegradables, tales como quitina, poli-epsilon-caprolactona (p-CL), poli(ácido láctico) (PLA) y compuesto de quitina/p-CL, para la reconstrucción de ligamentos extraarticulares o tendones [Sato M y col., 2000].

10 **[0014]** Polímeros biorreabsorbibles sintéticos tales como policaprolactona (PLC), poli(ácido láctico) (PLA) y quitina, se han formado en esterillas fibrosas de fibras orientadas aleatoriamente, pero con éxito limitado (Li y col., 2003).

RESUMEN DE LA INVENCION

15 **[0015]** La expresión "polímero biocompatible" como se usa en el presente documento será familiar para el lector experto en la materia, pero para una información más completa, se refiere a un polímero que es compatible con tejido natural, de modo que no se observa una respuesta inmunitaria significativa u otra respuesta de rechazo cuando el polímero se inserta (p. ej., se implanta quirúrgicamente) en el cuerpo humano o animal. El lector experto en la materia será consciente de ejemplos de polímeros biocompatibles, por ejemplo, la policaprolactona.

20 **[0016]** Las expresiones "polímero biodegradable" y "polímero biorreabsorbible" como se usan en el presente documento serán familiares para el lector experto en la materia, pero para una información más completa se refiere a un polímero que se rompe y dispersa in vivo.

25 **[0017]** La expresión "reparación tisular" como se usa en el presente documento será familiar para el lector experto en la materia, pero para una información más completa, se refiere a la reparación de tejido natural de un ser humano o animal, por ejemplo, por sustitución o crecimiento (incluyendo "recrecimiento") de ese tejido.

[0018] La presente invención trata de abordar los inconvenientes discutidos antes.

30 **[0019]** Los autores de la presente invención han encontrado que la reparación tisular y en particular la reparación de tendones se puede lograr proporcionando un andamio de reparación tisular que tenga una morfología y/o composición adaptada para promover la adhesión y el crecimiento de las células del tendón, facilitando así el crecimiento del tendón.

35 **[0020]** En su forma más general, la presente invención propone que un andamio que comprende fibras de un polímero biocompatible que forman haces, cuyos haces forman ellos mismos una estructura secundaria de haces de fibras, proporciona una imitación eficaz del tejido natural y en particular de tendones. Otra propuesta general de la presente invención, es que un andamio hecho de haces de fibras alineadas y/o haces de fibras retorcidos en los que las fibras comprenden policaprolactona, es adecuado para usar en la reparación de tejido natural y en particular de
40 tendones. Los autores de la presente invención, consideran que estos andamios proporcionan una matriz que de forma adecuada no solo presenta propiedades biomecánicas adecuadas (en particular para la reparación de tendones), sino que también facilita el crecimiento de células a lo largo y dentro de la matriz.

45 **[0021]** La presente invención proporciona en un primer aspecto un andamio de reparación tisular que comprende un haz de fibras secundario, comprendiendo el haz de fibras secundario una pluralidad de haces de fibras primarios, comprendiendo cada haz de fibras primario una pluralidad de fibras, en el que las fibras comprenden policaprolactona (PLC), y en el que el diámetro medio de las fibras es menor de 1 µm.

50 **[0022]** La discusión del presente documento de las ventajas asociadas con las realizaciones de la presente invención, se centra en la reparación de tendones, pero el andamio y los procedimientos de la presente invención se pueden aplicar de forma más amplia a la reparación tisular.

55 **[0023]** Los autores de la presente invención han encontrado que las realizaciones que comprenden esta disposición de fibras proporcionan propiedades biomecánicas excelentes y un entorno que promueve el crecimiento de tendones, en particular de células de los tendones tales como tenocitos y condrocitos.

60 **[0024]** Los autores de la presente invención han encontrado, mediante la experimentación, que un andamio que comprende una estructura de haces secundarios formada a partir de haces de fibras, puede estimular el crecimiento de células tisulares tales como tenocitos. Sin querer estar ligado por la teoría, los autores de la presente invención creen que los espacios (p. ej., canales) entre los haces de fibras primarios facilitan el crecimiento de células tisulares e imitan los espacios encontrados dentro de las unidades de tendones naturales. En particular, en el caso de la reparación de tendones, los autores de la presente invención han encontrado que la estructura facilita el crecimiento de células de tendones a lo largo y dentro del andamio.

[0025] Preferiblemente, la pluralidad de fibras están alineadas. En otras palabras, se prefiere que las fibras que componen el o los haces primarios estén alineadas, es decir, que no tengan una orientación aleatoria. Adecuadamente, al menos 50% de las fibras que componen el haz primario están alineadas. Más preferiblemente, al menos 75% de las fibras que componen el haz primario están alineadas, y lo más preferiblemente al menos 90% están alineadas.

[0026] Adecuadamente, la pluralidad de fibras (por ejemplo, al menos 50% de las fibras que componen el haz primario) están alineadas de modo que sus ejes longitudinales están dentro de 30°, preferiblemente dentro de 20°, más preferiblemente dentro de 10° y los más preferiblemente dentro de 5°, uno de otro.

[0027] Adecuadamente, la pluralidad de fibras (por ejemplo, al menos 50% de las fibras que componen el haz primario) son sustancialmente paralelas. Adecuadamente, al menos 50% de las fibras que componen el haz primario son sustancialmente paralelas. Más preferiblemente, al menos 75% de las fibras que componen el haz primario son sustancialmente paralelas y lo más preferiblemente al menos 90% son sustancialmente paralelas.

[0028] Adecuadamente, el haz de fibras primario, adecuadamente el haz de fibras secundario y adecuadamente el andamio consisten esencialmente y consisten preferiblemente en una pluralidad de fibras.

[0029] Adecuadamente, el tejido es matriz extracelular (ECM). Preferiblemente, el tejido es un tendón. Los ejemplos de tendones para los que el andamio de la presente invención es particularmente eficaz incluyen: tendón de Aquiles, bíceps braquial, tendones de los extensores de los dedos, extensor del índice, extensor largo del pulgar, tendón del supraespinoso, tendones tibiales posteriores, tendón de la rótula y tendones peroneos.

[0030] Adecuadamente, las fibras consisten esencialmente y consisten preferiblemente en un polímero biocompatible. Por lo tanto, adecuadamente, los haces de fibras primarios, adecuadamente el o los haces de fibras secundarios y adecuadamente el andamio consisten esencialmente, consisten preferiblemente en un polímero biocompatible. Por lo tanto, adecuadamente, los haces de fibras primarios, adecuadamente el o los haces de fibras secundarios y adecuadamente el andamio consisten esencialmente y consisten preferiblemente en fibras polímeras biocompatibles.

[0031] Se prefiere que el polímero biocompatible sea policaprolactona (PCL) (también conocida como poli-ε-caprolactona). El polímero biocompatible, por ejemplo la PCL, puede estar presente como un homopolímero o un copolímero. El polímero biocompatible, por ejemplo, la PCL, puede estar presente como parte de una mezcla.

[0032] Sin embargo, se prefiere que los polímeros biocompatibles consistan esencialmente y consistan preferiblemente en PCL. Preferiblemente, la PCL es un homopolímero. Por lo tanto, adecuadamente, los haces de fibras primarios, adecuadamente el o los haces de fibras secundarios y adecuadamente el andamio consisten esencialmente y consisten preferiblemente en PCL. Por lo tanto, adecuadamente, los haces de fibras primarios, adecuadamente el o los haces de fibras secundarios y adecuadamente el andamio consisten esencialmente y consisten preferiblemente en fibras de PCL.

[0033] Preferiblemente, el polímero, adecuadamente PCL, tiene un PM (Mn) de al menos 10.000, más preferiblemente al menos 30.000 y lo más preferiblemente al menos 60.000. Preferiblemente, el PM (Mn) no es mayor de 200.000, más preferiblemente no mayor de aproximadamente 100.000. Un intervalo de PM (Mn) particularmente preferido es de 60.000 a 100.000. Se prefiere en especial un PM (Mn) de aproximadamente 80.000.

[0034] Los autores de la presente invención han encontrado que, en particular para la reparación de tendones, es ventajoso que el haz o haces de fibras primarios estén retorcidos. En realizaciones, el proporcionar una torsión facilita el crecimiento de células de tendones, en especial de tenocitos, a lo largo del haz de fibras. La cantidad preferida de torsiones con referencia a un ángulo de hélice se discute en el presente documento con respecto al decimoprimer aspecto, que también se aplica a este y otros aspectos. Además o alternativamente, se prefiere que la cantidad o extensión del retorcimiento se seleccione para proporcionar al menos 100 vueltas por metro, más preferiblemente al menos 250 vueltas por metro, más preferiblemente al menos 400 vueltas por metro, más preferiblemente al menos 700 vueltas por metro, más preferiblemente al menos 900 vueltas por metro y lo más preferiblemente al menos 1000 vueltas por metro. Sorprendentemente, las realizaciones que tienen dicha extensión de torsiones proporcionan mejores propiedades mecánicas, por ejemplo con referencia a una o más del módulo, resistencia a la tracción y alargamiento. Las realizaciones demuestran un buen rendimiento de elongación mientras que se beneficia de propiedades mecánicas mejoradas (por ejemplo, pueden tener resistencia a la tracción mejorada, pero siguen siendo capaces de extensión significativa, imitando así el tejido del tendón natural).

[0035] Las torsiones pueden ser en las direcciones "S" o "Z".

[0036] Adecuadamente, cuando se usan, los haces de fibras están alineados con respecto al tejido que se está reparando. En particular, en el caso de la reparación de tendones, se prefiere que el eje longitudinal del haz esté alineado con el eje longitudinal del tendón que se desea reparar.

5 **[0037]** Típicamente, los haces de fibras, y/o adecuadamente el andamio, tienen una longitud de hasta 40 cm. En la práctica, la longitud se selecciona basándose en el tendón que se va a reparar.

[0038] Los haces de fibras, y/o adecuadamente el andamio, pueden tener una anchura de 50 μm a 10 cm o más. De nuevo, en la práctica, la anchura adecuada se selecciona basándose en el tendón que se va a reparar.

10 **[0039]** Adecuadamente, la pluralidad de haces de fibras primarios están dispuestos en una estructura que se repite. Preferiblemente, la pluralidad de haces de fibras primarios están en forma de una red o matriz regular u ordenada. Los autores de la presente invención, han encontrado que una estructura regular que se repite puede ayudar a promover el crecimiento celular a lo largo y dentro del andamio. Dicha estructura también puede proporcionar propiedades biomecánicas deseables. Realmente, de forma adecuada los haces de fibras primarios están dispuestos de cualquier forma que sea adecuada para imitar la estructura de los tendones naturales. En relación con esto, los tendones naturales tienen muchas formas y tamaños, que reflejan los numerosos sitios en el cuerpo en los que se encuentran y los tipos y función de los músculos a los que están conectados. Por ejemplo, los tendones naturales pueden tener una morfología seleccionada de un cordón o cuerda (p. ej., con un corte transversal sustancialmente redondo), cinta (p. ej., aplanada), banda (p. ej., tipo correa) y abanico. El andamio de la presente invención puede tener una cualquiera de estas morfologías. Por lo tanto, adecuadamente, el andamio de reparación tisular tiene una morfología seleccionada de: cordón o cuerda, citan, banda y abanico.

25 **[0040]** Además, los haces de fibras primarios del andamio se pueden procesar de la misma forma que cualquier hebra o hilo sintético, y se pueden tejer, tricotar, etc., para formar una estructura que se repite deseada. Realmente, en realizaciones, el andamio puede comprender una hebra.

30 **[0041]** Por lo tanto, adecuadamente la pluralidad de haces de fibras primarios se entrelazan. Preferiblemente, los haces de fibras primarios están trabados, adecuadamente para impartir resistencia y/o cohesión al haz o haces de fibras secundarios.

35 **[0042]** Preferiblemente, la pluralidad de haces de fibras primarios se trenzan o retuercen. El trenzado o retorcimiento son modos preferidos de lograr el entrelazado de los haces de fibras primarios. Se prefiere en particular el trenzado porque los canales o espacios se forman en virtud de los espacios entre los haces de fibras primarios trenzados. Esta estructura "porosa" puede ayudar a la penetración de células tisulares en el andamio.

[0043] Preferiblemente, los haces de fibras secundarios tienen una morfología de tipo cuerda (por ejemplo, lograda por trenzado de los haces de fibras primarios).

40 **[0044]** En realizaciones, los haces de fibras secundarios se pueden procesar de la misma forma que las fibras naturales o sintéticas (p. ej., tejer, tricotar, etc.), para controlar la morfología general del andamio.

45 **[0045]** Los autores de la presente invención han encontrado que el diámetro medio de las fibras de los haces de fibras primarios se puede usar para controlar no solo las propiedades bioquímicas del andamio, sino preferiblemente también la eficacia del andamio como entorno para estimular el crecimiento celular. Preferiblemente, el diámetro medio de las fibras es menor de 1,2 μm , más preferiblemente menor de 1 μm y lo más preferiblemente menor de 0,7 μm . Los autores de la presente invención han encontrado que los diámetros de las fibras de escala nanométrica (es decir $< 1 \mu\text{m}$) son particulares eficaces.

50 **[0046]** Una ventaja de la presente invención, es que las propiedades del andamio, incluyendo las propiedades biomecánicas y de forma adecuada la eficacia del andamio para estimular el crecimiento celular, se pueden controlar ajustando el diámetro medio de los haces de fibras primarios. Preferiblemente, el diámetro medio de los haces de fibras primarios está en el intervalo de 10-200 μm , más preferiblemente en el intervalo de 30-100 μm . Adecuadamente, el diámetro medio de los haces secundarios está en el intervalo de 100-500 μm y lo más preferiblemente en el intervalo de 150-400 μm .

55 **[0047]** Adecuadamente, el andamio de reparación tisular comprende una pluralidad de haces de fibras secundarios (por ejemplo, para formar una estructura terciaria de haces de fibras). Alternativamente, el andamio puede comprender solo un haz de fibras secundario, por ejemplo para adaptarse al tendón que se va a reparar.

60 **[0048]** Los autores de la presente invención han encontrado que el electrohilado proporciona una forma particularmente eficaz de producir el andamio de reparación tisular del primer aspecto. Por consiguiente, se prefiere que las fibras estén hechas por electrohilado.

- [0049]** Adecuadamente, el haz secundario comprende al menos 3 haces de fibras primarios, preferiblemente al menos 5 haces de fibras primarios.
- 5 **[0050]** En realizaciones preferidas, el haz de fibras primario comprende al menos 50 fibras, más preferiblemente al menos 100 fibras. Los autores de la presente invención han encontrado que dichos haces de fibras primarios pueden proporcionar una imitación particularmente eficaz de la estructura de los tendones.
- 10 **[0051]** Adecuadamente, el andamio de reparación tisular comprenden gel de colágeno. El gel de colágeno mejora de forma adecuada el crecimiento de las células de tendones (en especial los tenocitos) a lo largo y/o dentro del andamio comparado con el andamio sin el gel de colágeno.
- 15 **[0052]** En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un andamio de reparación tisular de acuerdo con el primer aspecto, para usar en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal. Adecuadamente, el procedimiento es un procedimiento de tratamiento quirúrgico.
- [0053]** Adecuadamente, el procedimiento comprende tratar un tendón dañado.
- 20 **[0054]** Preferiblemente el procedimiento comprende la etapa de unir el andamio de reparación tisular a un tendón dañado. Típicamente, esto se puede lograr mediante sutura del andamio de reparación tisular a un tendón dañado.
- 25 **[0055]** En el caso del tratamiento de animales, el animal preferiblemente es un caballo (p. ej., un caballo de carreras). Las mascotas domésticas tales como uno o más de perros, gatos y caballos son los sujetos preferidos para el tratamiento. Los animales en cautividad, por ejemplo, los animales de zoológico, también son sujetos preferidos para el tratamiento.
- 30 **[0056]** En un tercer aspecto, la presente invención proporciona policaprolactona (PCL) para usar en un procedimiento para tratar un tendón dañado, en el que la PCR está en forma de un andamio de reparación tisular de acuerdo con el primer aspecto.
- 35 **[0057]** En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un uso de PCL en un procedimiento para fabricar un andamio de reparación tisular de acuerdo con el primer aspecto, para el tratamiento de un tendón dañado.
- 40 **[0058]** En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para hacer un andamio de reparación tisular de acuerdo con el primer aspecto, comprendiendo el procedimiento las etapas de
 (A) electrohilar una pluralidad de fibras, comprendiendo las fibras PCL,
 (B) formar un haz de fibras primario a partir de la pluralidad de fibras; y
 (C) formar un haz de fibras secundario a partir de una pluralidad de haces de fibras primarios.
- 45 **[0059]** En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un andamio de reparación tisular que comprende un haz de fibras, comprendiendo el haz de fibras una pluralidad de fibras alineadas, en el que las fibras comprenden policaprolactona (PCL), y en el que el diámetro medio de las fibras es menor que 1 μm .
- 50 **[0060]** Preferiblemente, el tejido es un tendón. Adecuadamente, las fibras son como se definen en el primer aspecto. Adecuadamente, el haz de fibras tiene las características del haz de fibras primario como se define en el primer aspecto. Opcionalmente, las características del andamio del primer aspecto también se aplican a este aspecto.
- 55 **[0061]** En particular, adecuadamente el andamio comprende una pluralidad de haces de fibras dispuestos en una estructura que se repite. Preferiblemente, la pluralidad de haces de fibras están en forma de una red o matriz regular u ordenada. Adecuadamente, la pluralidad de haces de fibras forman haces secundarios. Además, los haces de fibras del andamio se pueden procesar de la misma forma que cualquier hebra o hilo sintético y se pueden tejer, tricotar, etc., para formar una estructura que se repite deseada. Realmente, en realizaciones, el andamio puede comprender una hebra.
- 60 **[0062]** En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un andamio de reparación tisular de acuerdo con el quinto aspecto, para usar en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal. Adecuadamente, el procedimiento es un procedimiento de tratamiento quirúrgico.
- [0063]** Preferiblemente, el procedimiento comprende tratar un tendón dañado.

- [0064]** Preferiblemente, el procedimiento comprende la etapa de unir, preferiblemente injertar, el andamio de reparación tisular a un tendón dañado. Típicamente, esto se puede lograr suturando el andamio de reparación tisular a un tendón dañado.
- 5 **[0065]** En el caso del tratamiento de animales, el animal preferiblemente es un caballo (p. ej., un caballo de carreras), gato o perro. Preferiblemente, el animal es un animal en cautividad, tal como un animal de zoológico.
- [0066]** En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona policaprolactona (PCL) para usar en un procedimiento para tratar un tendón dañado, en el que la PCL está presente en un andamio de reparación tisular de acuerdo con el quinto aspecto.
- 10 **[0067]** En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un uso de PCL en un procedimiento para fabricar un andamio de reparación tisular de acuerdo con el sexto aspecto, para el tratamiento de un tendón dañado.
- 15 **[0068]** En un octavo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para hacer un andamio de reparación tisular de acuerdo con el quinto aspecto, comprendiendo el procedimiento las etapas de
- 20 (A) electrohilar una pluralidad de fibras alineadas, comprendiendo las fibras policaprolactona; y
(B) formar un haz de fibras a partir de la pluralidad de fibras alineadas.
- [0069]** En un noveno aspecto, la presente invención proporciona un andamio de reparación tisular que comprende un haz de fibras retorcido, en el que el haz de fibras retorcido comprende una pluralidad de fibras, comprendiendo las fibras policaprolactona, y en el que el diámetro medio de las fibras es menor de 1 μm .
- 25 **[0070]** Adecuadamente, el haz de fibras retorcido es tal que las fibras forman una hélice. Preferiblemente, el ángulo de la hélice (el ángulo formado entre la dirección de las fibras y el eje longitudinal del haz de fibras) está en el intervalo de 10° a 80°, más preferiblemente de 20° a 80°, y lo más preferiblemente de 20° a 60°. Como se ha discutido antes, la hélice y el ángulo de la hélice preferido, también se aplica a los haces de fibras de los otros aspectos.
- 30 **[0071]** Preferiblemente, el tejido es un tendón.
- [0072]** Adecuadamente, las fibras son como se definen en el primer aspecto. Preferiblemente, el haz de fibras retorcido tiene las características del haz de fibras primario como se define en el primer aspecto. Opcionalmente, las características del andamio del primer aspecto también se aplican a este aspecto.
- 35 **[0073]** En particular, adecuadamente el andamio comprende una pluralidad de haces de fibras dispuestos en una estructura que se repite. Preferiblemente, la pluralidad de haces de fibras forman una red o matriz regular u ordenada. Adecuadamente, la pluralidad de haces de fibras forman haces secundarios. Además los haces de fibras del andamio se pueden procesar de la misma forma que cualquier hebra o hilo sintético y se pueden tejer, tricotar, etc. para formar una estructura que se repite deseada. Realmente, en realizaciones, el andamio puede comprender una hebra.
- 40 **[0074]** En un décimo aspecto, la presente invención proporciona un andamio de reparación tisular de acuerdo con el noveno aspecto, para usar en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal. Adecuadamente, el tratamiento es quirúrgico.
- 45 **[0075]** Preferiblemente, el procedimiento comprende tratar un tendón dañado.
- 50 **[0076]** En el caso del tratamiento de animales, el animal preferiblemente es un caballo (p. ej., un caballo de carreras), gato o perro. Preferiblemente, el animal es un animal en cautividad, tal como un animal de zoológico.
- [0077]** En un decimoprimer aspecto, la presente invención proporciona policaprolactona (PCL) para usar en un procedimiento para tratar un tendón dañado, en el que la PCL está presente en un andamio de reparación tisular de acuerdo con el noveno aspecto.
- 55 **[0078]** En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un uso de PCL en un procedimiento para fabricar un andamio de reparación tisular de acuerdo con el noveno aspecto, para el tratamiento de un tendón dañado.
- 60 **[0079]** En un decimosegundo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para hacer un andamio de reparación tisular de acuerdo con el noveno aspecto, comprendiendo el procedimiento las etapas de

- (A) electrohilar una pluralidad de fibras, comprendiendo las fibras policaprolactona;
- (B) formar un haz de fibras a partir de la pluralidad de fibras; y
- (C) retorcer el haz de fibras.

5 **[0080]** En un decimotercer aspecto, la presente invención proporciona un tendón sintético, en el que el tendón sintético es como se define en uno cualquiera del primer, quinto y noveno aspectos.

10 **[0081]** En realizaciones, el andamio de reparación tisular de cualquiera de los aspectos, se proporciona en un envase cerrado, por ejemplo, un paquete estéril. Adecuadamente, el envase está herméticamente sellado.

[0082] Por lo tanto, en un decimocuarto aspecto, la presente invención proporciona un andamio de reparación tisular de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos del presente documento, en el que el andamio de reparación tisular se proporciona en un envase estéril.

15 **[0083]** Se considera que el andamio de reparación tisular se puede proporcionar en una variedad de tamaños y morfologías diferentes, por ejemplo, en una serie de configuraciones "listas para la venta", de modo que permitan a un cirujano seleccionar el andamio más adecuado para el tejido que se va a reparar. Por lo tanto, en un decimoctavo aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende una pluralidad de andamios de reparación tisular, siendo cada andamio un andamio de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos del presente documento, en el que cada andamio se proporciona en un envase estéril. Adecuadamente, al menos algunos de los andamios son diferentes, p. ej., tienen diferentes dimensiones y/o morfologías.

20 **[0084]** En un decimoquinto aspecto, la presente invención proporciona un andamio de reparación tisular hecho de acuerdo con un procedimiento como se describe en uno cualquiera de los otros aspectos. Adecuadamente, el procedimiento es un procedimiento de uno cualquiera del cuarto, octavo o decimosegundo aspectos.

25 **[0085]** Uno cualquiera de los aspectos de la presente invención se puede combinar con uno cualquiera o más de los otros aspectos. Además, cualquiera de las características opcionales o preferidas de uno cualquiera de los aspectos, se puede aplicar a cualquiera de los otros aspectos. En particular, se pueden aplicar características asociadas con un procedimiento o uso a un andamio y viceversa.

35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0086] Se describen a continuación realizaciones de la invención y experimentos que ilustran las ventajas y/o la implementación de la invención, solo a modo de ejemplo, con respecto a los dibujos que acompañan, en los que:

40 La figura 1 muestra un esquema de un aparato de electrohilado usado para hacer fibras para incluir en andamios de la presente invención;

La figura 2 muestra un esquema del depósito de líquido del aparato de electrohilado usado en una realización de la presente invención;

45 La figura 3 muestra un esquema del aparato de electrohilado de punto fijo usado en una realización de la presente invención;

La figura 4 muestra un esquema del aparato de electrohilado de mandril fino usado en una realización de la presente invención;

50 La figura 5 muestra un esquema del aparato de electrohilado de mandril delgado usado en una realización de la presente invención;

55 La figura 6 muestra una micrografía de SEM de un haz de fibras formado usando el procedimiento del depósito de líquido;

La figura 7 muestra una micrografía de SEM de un haz de fibras formado usando el procedimiento del punto fijo;

60 La figura 8 muestra una micrografía de SEM de un haz de fibras formado usando el procedimiento del mandril fino;

La figura 9 muestra una micrografía de SEM de un haz de fibras formado usando el procedimiento del mandril delgado;

- La figura 10 muestra una micrografía de SEM de un haz de fibras secundario formado por trenzado de una pluralidad de haces de fibras primarios;
- 5 La figura 11 muestra una micrografía de SEM de un haz de fibras secundario formado por retorcimiento de una pluralidad de haces de fibras primarios;
- La figura 12 muestra los resultados de las mediciones del módulo de Young;
- 10 La figura 13 muestra los resultados de las mediciones de la resistencia a la tracción;
- La figura 14 muestra los resultados de las mediciones del alargamiento máximo;
- La figura 15 muestra una micrografía de SEM de un haz de fibras sembrado con tenocitos y después cultivo;
- 15 La figura 16 muestra una micrografía de SEM de un haz de fibras sembrado con tenocitos, con visible alineamiento de los tenocitos después de cultivo;
- La figura 17 muestra una micrografía de SEM de un haz de fibras cargado con gel de colágeno y sembrado con tenocitos, con visible alineamiento de los tenocitos después de cultivo;
- 20 La figura 18 muestra una micrografía de SEM de un haz de fibras cargado con gel de colágeno y sembrado con tenocitos, con crecimiento sustancial de los tenocitos visible después de cultivo;
- La figura 19 muestra una micrografía de SEM de un haz de fibras secundario trenzado sembrado con tenocitos, con alineamiento visible de los tenocitos después de cultivo;
- 25 La figura 20 muestra una micrografía de SEM de una zona aumentada del haz de fibras secundario de la figura 19;
- La figura 21 muestra una micrografía de SEM de una zona aumentada del haz de fibras secundario de la figura 20;
- 30 La figura 22 muestra una micrografía de SEM de una zona aumentada del haz de fibras secundario de la figura 21;
- La figura 23 muestra los resultados de los datos biomecánicos del módulo de Young determinados para un haz de fibras cultivado con y sin tenocitos durante un periodo de 5 días;
- 35 La figura 24 muestra los resultados de los datos biomecánicos del módulo de Young determinados para una muestra de fibras 2D cultivada con y sin tenocitos durante un periodo de 5 días;
- La figura 25 muestra los resultados de los datos biomecánicos de resistencia a la tracción determinados para un haz de fibras cultivado con y sin tenocitos durante un periodo de 5 días;
- 40 La figura 26 muestra los resultados de los datos biomecánicos de resistencia a la tracción determinados para una muestra de fibras 2D cultivada con y sin tenocitos durante un periodo de 5 días;
- 45 La figura 27 muestra los resultados de los datos biomecánicos de alargamiento máximo determinados para un haz de fibras cultivado con y sin tenocitos durante un periodo de 5 días;
- La figura 28 muestra los resultados de los datos biomecánicos de alargamiento máximo determinados para una muestra de fibras 2D cultivada con y sin tenocitos durante un periodo de 5 días;
- 50 La figura 29 muestra un tendón de Aquiles de ratón expuesto a través de una incisión en la línea media posterior;
- La figura 30 muestra el tendón de ratón de la figura 20 con la sección extirpada del tendón de Aquiles retirada;
- 55 La figura 31 muestra el tendón de ratón de la figura 30 con un andamio de haces de fibras de la presente invención dispuesto junto al tendón de Aquiles;
- La figura 32 muestra el tendón de ratón de la figura 31 con el andamio de haces de fibras injertado en el tendón de Aquiles y suturado en cualquiera de los extremos;
- 60 La figura 33 muestra una micrografía de SEM de un tendón de ratón y andamio de haces de fibras de PCL suturado;
- La figura 34 muestra una micrografía de SEM de un tendón de ratón y andamio de haces de fibras de PCL suturado después de 3 semanas in vivo;

La figura 35 muestra una micrografía de SEM de un tejido nuevo que ha crecido sobre el andamio de haces de fibras de PCL después de 3 semanas in vivo;

5 La figura 36 muestra una micrografía de SEM de un haz de fibras terciario que comprende haces secundarios entrelazados;

La figura 37 muestra una micrografía de SEM de una zona aumentada del haz de fibras terciario de la figura 36;

10 La figura 38 muestra los resultados de las mediciones del módulo hechas en haces retorcidos de fibras alineadas, en los que se altera la extensión de la torsión;

La figura 39 muestra los resultados de las mediciones de la resistencia a la tracción hechas en haces retorcidos de fibras alineadas, en los que se altera la extensión de la torsión;

15 La figura 40 muestra los resultados de las mediciones del alargamiento hechas en haces retorcidos de fibras alineadas, en los que se altera la extensión de la torsión;

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES Y EXPERIMENTOS

[0087] Se describen en el presente documento una serie de ejemplos de haces electrohilados tridimensionales de fibras alineadas hechas de PCL. Estas construcciones fibrosas están dirigidas a imitar tanto la anatomía morfológica como las propiedades biomecánicas del tendón humano natural. Se sabe que este tejido está compuesto de una organización jerárquica de fibras de colágeno alineadas, y estos haces son representativos de determinadas partes del tendón general. En realizaciones, aunque que las fibras contenidas en de los haces de PCL no son del mismo tamaño que las fibras de colágeno, la morfología macroscópica de los haces 3D fabricados se parece mucho a las que están en el tejido del tendón natural.

30 [0088] Los haces de fibras descritos en el presente documento son biodegradables y/o biorreabsorbibles. Esto elimina adecuadamente la necesidad de cirugía secundaria. Además, en realizaciones, la velocidad de degradación se corresponde con la velocidad de formación del tejido nuevo. Los estudios preliminares sugieren que las velocidades de degradación son adecuadas para acomodar los tiempos de curación naturales para los tendones de aproximadamente 3 meses.

35 [0089] El ensayo de las realizaciones ha mostrado que los haces de fibras (andamios) pueden aguantar cargas de tracción altas y demuestran flexibilidad. Esta última característica es particularmente prometedora dado que es necesario que algunos tendones se doblen alrededor de prominencias óseas.

40 [0090] Se describen en el presente documento estudios que demuestran cómo se puede usar el electrohilado de fibras para producir los andamios de la presente invención. Además, los resultados de los estudios de los autores de la presente invención muestran cómo se puede usar la variación de los parámetros asociados con el electrohilado para controlar las características de las fibras.

45 [0091] Además, se compararon las propiedades mecánicas de haces obtenidos de 4 procedimientos de electrohilado. Los haces de fibras se extrajeron de la superficie de un depósito de líquido o las fibras se retorcieron en construcciones tridimensionales (3D) después de hilado entre placas fijas o sobre mandriles giratorios de canto fino o canto delgado.

50 (1) Formación de la fibra

(a) Electrohilado y selección de parámetros

55 [0092] El electrohilado proporciona una forma de generar fibras de diámetro controlado. En particular, el electrohilado permite la fabricación de fibras continuas, largas, de diámetro controlado. En su forma más simple, la aplicación de un alto voltaje a una disolución de polímero dentro de una jeringa produce la expulsión de un chorro de polímero hacia un colector conectado a tierra.

60 [0093] Se puede electrohilar una amplia variedad de polímeros, incluyendo polímero biocompatibles.

[0094] Se puede usar una serie de parámetros para controlar las propiedades de las fibras formadas usando electrohilado. Se mencionan los siguientes parámetros como particularmente útiles para controlar las fibras recogidas:

1. Disolvente
2. Peso molecular del polímero
3. Concentración de la disolución de polímero-disolvente
4. Voltaje aplicado
- 5 5. Distancia de la punta al colector
6. Caudal de la disolución de polímero-disolvente

[0095] Estos y otros parámetros se discuten a continuación con más detalle.

10 *Disolvente*

[0096] Los disolventes adecuados incluyen acetona, cloroformo, diclorometano (DCM) y tetrahidrofurano (THF). También se puede usar hexafluoroisopropanol (HFIP). Se llevaron a cabo experimentos con el fin de demostrar el efecto de la selección del disolvente en la formación de la fibra. Se disolvió PCL (Mn 80.000) (Sigma Aldrich) en 4 disolventes separados para dar concentraciones de 10% en p/v. Los 4 disolventes eran: acetona, cloroformo, diclorometano (DCM) y tetrahidrofurano (THF). Cada disolución de polímero-disolvente se electrohiló con un caudal de 0,1 ml/min, voltaje de 15 kV y distancia de la punta de la aguja al colector de 5 cm.

[0097] Conclusión: Las investigaciones para determinar el disolvente ideal para electrohilar la PCL dieron como resultado que el disolvente con la mayor constante dieléctrica daba el mayor número de fibras debido a las interacciones de repulsión entre cargas que se producen cuando el chorro de polímero viaja hacia el colector. El disolvente preferido de este estudio era la acetona y se usó este para todos los electrohilados de PCL posteriores.

25 *Peso molecular del polímero*

[0098] Un peso molecular (Mn) adecuado está en el intervalo de 10.000 a 100.000, pero se pueden usar otros pesos moleculares, como se describe en el presente documento.

[0099] Se llevaron a cabo experimentos con el fin de demostrar el efecto del peso molecular del polímero en la formación de fibra. Se disolvieron por separado dos lotes de PCL con pesos moleculares medios numéricos (Mn) de 40.000 y 80.000, en acetona en concentraciones de 10% en p/v. Estos dos lotes se electrohilaban por separado en las mismas condiciones: caudal 0,05 ml/min; voltaje 25 kV y distancia de la punta de la aguja al colector 10 cm.

[0100] Conclusión: el análisis por SEM mostró que el peso molecular tenía un efecto significativo en la morfología de la fibra. Se encontró que la PCL de mayor peso molecular (Mn 80.000) minimizaba la aparición de "perlas" a lo largo de las fibras.

40 *Concentración de la disolución de polímero-disolvente*

[0101] Las concentraciones adecuadas están en el intervalo de 3% en p/v a 15% en p/v, preferiblemente de 5% en p/v a 10% en p/v.

[0102] Se llevaron a cabo experimentos con el fin de demostrar el efecto de la concentración de la disolución de polímero-disolvente en la formación de fibra. Las concentraciones de las disoluciones investigadas eran 5% en p/v, 7,5% en p/v y 10% en p/v. Las disoluciones poliméricas se prepararon pesando una cantidad conocida de PCL (Mn 80.000) en una jarra de vidrio junto con un volumen conocido de acetona. Se usó el mismo disolvente durante todo el estudio. La jarra de vidrio se cerró herméticamente y se puso en un agitador (Stuart SB162) hasta que se disolvió el polímero.

[0103] Conclusión: El diámetro de las fibras se puede diseñar alterando la concentración de la disolución. En general, se encontró que las concentraciones más altas daban como resultado fibras de diámetro mayor.

55 *Voltaje*

[0104] El voltaje aplicado a la disolución polimérica tiene un efecto directo en la morfología de la fibra. El voltaje alto hace que el chorro de polímero sea emitido con aceleración rápida, limitando el tiempo de vuelo de los chorros y posteriormente disminuye la cantidad de estiramiento y evaporación de disolvente antes del impacto en el colector [Ramakrishna y col., 2005]. Las fibras resultantes pueden ser más gruesas y contener niveles altos de disolvente residual. Sin embargo, el tiempo de vuelo del chorro de polímero depende de la distancia de la punta al colector.

[0105] Se llevaron a cabo experimentos con el fin de demostrar el efecto del voltaje en la formación de fibra. El procedimiento de electrohilado se llevó a cabo usando dos voltajes separados: 25 kV y 15 kV. El voltaje se ajustó al valor deseado antes de empezar el electrohilado, asegurando así que todas las fibras recogidas eran sometidas al

mismo voltaje. El voltaje se suministró mediante un suministro eléctrico DC de alto voltaje regulado de 120 W FC Series de Glassman High Voltage, Inc.

5 **[0106]** Conclusión: Se encontró que mantener el voltaje aplicado comparativamente bajo (p. ej. 15 kV) era eficaz para producir fibras electrohiladas de diámetro fino submicrométrico. No obstante, se encontró que era deseable evitar voltajes mucho menores para asegurar la suficiente carga electrostática de la disolución de polímero y eyección de un chorro de polímero.

10 *Distancia de la punta de la aguja al colector*

15 **[0107]** La variación de la distancia entre la punta de la aguja y el colector tiene una función importante para determinar las características de la fibra. Una distancia de deposición corta reduce el tiempo de vuelo del chorro de polímero, limitando la tasa de evaporación de disolvente y el estiramiento del polímero; lo que a menudo da como resultado la fabricación de fibras gruesas fusionadas. En general, es necesaria una distancia mínima que permita el secado y estiramiento significativos del chorro, para la producción de fibras finas largas [Reneker y col., 2000].

20 **[0108]** Se llevaron a cabo experimentos con el fin de demostrar el efecto de la distancia de la punta de la aguja al colector en la formación de fibra. Se ensayaron las distancias de la punta de la aguja al colector de 5 cm y 10 cm. Esto se logró ajustando la altura de la placa colectora a la distancia requerida antes de empezar el procedimiento de electrohilado.

25 **[0109]** Conclusión: La distancia de deposición entre la punta de la aguja y el colector debe ser suficientemente larga para asegurar el tiempo adecuado para que el chorro de polímero experimente el estiramiento y evaporación de disolvente suficientes antes de su impacto.

Caudal de la disolución de polímero-disolvente

30 **[0110]** El caudal aplicado determina la cantidad de disolución polimérica disponible para el procedimiento de electrohilado. En general, los caudales altos dan fibras de diámetro mayor. Esto se debe a que el volumen mayor de disolución bombeado puede no tener tiempo suficiente para la evaporación del disolvente y estiramiento adecuados del chorro antes del contacto con el colector.

35 **[0111]** Se llevaron a cabo experimentos con el fin de demostrar el efecto del caudal en la formación de fibra. Se vertió una disolución de polímero-disolvente en una jeringa de 50 ml (BD Plastipak) y se puso en una bomba de jeringa (SP230IW2 - World Precision Instruments). Los caudales aplicados durante el electrohilado eran 0,1 ml/min y 0,05 ml/min.

40 **[0112]** Conclusión: se encontró que era deseable usar un caudal bajo y que caudales altos pueden dar como resultado fibras de diámetro más ancho (p. ej., mayor que 1 μm).

Viscosidad de la disolución

45 **[0113]** A la viscosidad de la disolución la afecta directamente la concentración del polímero presente. Si la concentración de polímero es alta, están presentes mayores cantidades de cadenas de polímero, aumentando el número de enmarañados de cadenas con moléculas de disolvente y finalmente elevando la viscosidad de la disolución. El peso molecular del polímero también afecta a la viscosidad de la disolución. Un polímero de bajo peso molecular reduce el número de enmarañados de disolvente/polímero debido a las cadenas de longitud más corta, y por lo tanto disminuye la viscosidad de la disolución. La producción de fibra depende de la concentración de la disolución que se va a electrohilar.

50 **[0114]** En general, si la concentración es demasiado baja se observa la formación de perlas en contraposición a la producción de fibras; y si es demasiado alta, el bombeo de la disolución será difícil y las fibras fabricadas son de diámetro mayoritariamente micrométrico.

55 *Conductividad de la disolución*

60 **[0115]** El disolvente elegido para disolver el polímero tiene una función importante en el nivel de conductividad presente en la disolución, y esto afecta directamente a la morfología de la fibra generada por el procedimiento de electrohilado. Los disolventes con constantes dieléctricas altas hacen que el chorro de polímero expulsado experimente mayor fuerza longitudinal producida por la mayor acumulación de carga presente en la disolución polimérica [Wannatong y col., 2004]. Por consiguiente, el chorro de polímero experimenta un mayor grado de repulsión de cargas, conduciendo a un mayor nivel de estiramiento y elongación, dando como resultado fibras de diámetro más fino [Fong y col., 1999].

Tensión superficial

5 **[0116]** La tensión superficial de la disolución polimérica debe ser superada con el fin de que se inicie el procedimiento de electrohilado. La viscosidad de las disoluciones poliméricas afecta directamente a su tensión superficial; la viscosidad alta reduce la tensión superficial debido a un enmarañado significativo entre moléculas de disolvente y cadenas de polímero que evitan el agrupamiento de moléculas [Shawon y Sung, 2004].

Humedad

10 **[0117]** La humedad que rodea el procedimiento de electrohilado puede tener un efecto significativo en la morfología de la fibra, en términos de porosidad superficial: niveles crecientes de humedad conducen a un aumento del tamaño, número y distribución de poros a lo largo de la superficie de la fibra [Casper y col., 2004].

15 *Temperatura*

[0118] El aumento de temperatura de la disolución polimérica puede dar como resultado una velocidad de deposición de la fibra más rápida y por lo tanto las fibras pueden tener un diámetro menor. Estos efectos se pueden atribuir a la menor viscosidad de la disolución polimérica producida por menos enmarañados entre el polímero y las moléculas de disolvente, como resultado de la expansión de la cadena de polímero [Mit-uppatham y col., 2004].

(b) Orientación de las fibras

Alineamiento de las fibras y procedimiento colector

25 **[0119]** La orientación de las fibras depositadas del procedimiento de electrohilado depende de su procedimiento de recolección. El alineamiento de las fibras está determinado por el ángulo entre la fibra y la dirección de alineamiento, cuanto menor es el ángulo mayor es el alineamiento.

30 **[0120]** Se crean disposiciones aleatorias no tejidas de las fibras cuando el colector está en una placa estacionaria conectada a tierra.

35 **[0121]** Las fibras intencionadamente orientadas se pueden fabricar mediante electrohilado entre el hueco de dos placas metálicas fijas o sobre un mandril giratorio a una velocidad optimizada. Realmente, la recolección de fibras entre dos placas conectadas a tierra paralelas, conocido también como el "procedimiento de alineamiento en hueco" se puede usar para producir fibras alineadas (Dzenis, 2004).

40 **[0122]** Las hebras fibrosas que contienen fibras individuales alineadas que son agrupadas entre sí también se pueden fabricar por hilado de la disolución polimérica directamente a un depósito de líquido conectado a tierra (Smit y col., 2005). La red de fibras recogida sobre la superficie del líquido se extrae fuera y al aire. Las fibras se alinean y coalescen debido a los efectos de tensión superficial entre las fibras y el líquido durante el procedimiento de extracción. Los haces fibrosos tridimensionales son el producto final después de elevar las fibras fuera de la superficie del líquido.

45 **[0123]** Otro procedimiento para alinear la formación de fibras requiere el uso de un mandril giratorio. En general, el mandril debe rotar a una velocidad suficiente de forma que se asegure que la velocidad de rotación no es demasiado lenta comparado con la velocidad de expulsión de fibras, en cuyo caso se puede inhibir el alineamiento. De forma similar, si la rotación es demasiado rápida se puede producir la rotura de las fibras [Huang y col., 2003].

50 **[0124]** Los diferentes procedimientos de recolección de las fibras dan como resultado diferente orientación de las fibras. Como se podría esperar, la placa estacionaria producía fibras con menor alineamiento. La recolección en el mandril giratorio daba como resultado fibras con mayor alineamiento.

55 **[0125]** Experimentos adicionales examinaban la selección de la velocidad del mandril giratorio en función de las dimensiones del mandril.

Optimización de la velocidad de rotación para crear fibras alineadas en un mandril

60 **[0126]** Los experimentos mostraron que la orientación de las fibras cuando se recogían en un mandril dependía de la velocidad de rotación del mandril. Para un mandril estrecho (anchura = 3 mm; diámetro = 120 mm), velocidades bajas de 300 rpm daban como resultado la deposición de fibras similar a las redes fibrosas recogidas en placas estacionarias. Si la velocidad de rotación era demasiado rápida, las fibras aparecían con aspecto predominantemente aleatorio. A una velocidad óptima, las fibras se recogían paralelas a la dirección de rotación. 500-600 rpm (p. ej. 500 rpm) produjeron el mayor alineamiento.

[0127] Se ensayó un segundo mandril, que era más ancho (anchura = 90 mm; diámetro = 65 mm) que el primer mandril, y se encontró que la velocidad de rotación óptima para el alineamiento de las fibras era diferente que para el mandril estrecho. Para el mandril ancho, se usaron velocidades de 1200 rpm y mayores para generar fibras suficientemente alineadas.

[0128] Las mediciones del ángulo de estas fibras con respecto al eje longitudinal, mostraron que cuando rotaban a una velocidad de 1800 rpm se lograba el menor ángulo de alineamiento y por lo tanto el mayor grado de paralelismo al eje longitudinal. Los resultados sugerían que el alineamiento se podía aumentar más a velocidades de rotación superiores a 1800 rpm.

(c) Características de la superficie

[0129] La humectabilidad de la superficie del andamio es una característica del andamio que se puede ajustar para adecuar la función del andamio. Adecuadamente, para estimular la unión de células, el exterior del material es hidrófilo o humectable, ya que esto permitirá que las células entren en contacto con la superficie a su largo de un área mayor para permitir la unión y propagación, y para proporcionar células con un entorno similar a su entorno natural. Sin embargo, para promover la unión de células o adhesión de proteínas, se pueden crear superficies hidrófobas o no humectantes. El lector experto está familiarizado con los tratamientos de superficie adecuados.

(2) Formación del andamio

[0130] Salvo que se exponga otra cosa, los parámetros de electrohilado usados para la fabricación de todas las matrices de fibras electrohiladas eran los siguientes: voltaje 20 kV (suministro eléctrico DC alto voltaje regulado Series 120 Watt, Glassman High Voltage, Inc), caudal 0,05 ml/min (SP230IW2, World Precision Instruments), distancia de la punta de la aguja (\varnothing 0,8 mm, BD Microlance) al colector 15 cm y concentración de la disolución de policaprolatona (PCL) al 10% en p/v (Mn 80.000) (Sigma Aldrich) en acetona. Para las esterillas fibrosas 2D, el electrohilado se llevó a cabo durante un periodo de 30 min; para haces fibrosos 3D el tiempo de hilado se redujo a 15 min.

[0131] Las muestras se ensayaron en el espacio de 48 h del hilado, para minimizar el riesgo de efectos atmosféricos y reasociación de las fibras de PCL. Las muestras se almacenaron a 4°C en un desecador hasta que se requerían.

Formación de haces de fibras

[0132] Antes de usar se retiró la punta de todas las agujas y se alisaron los bordes. Esto era para permitir una gota formada uniformemente en el extremo de la punta de la aguja.

[0133] Se produjeron 4 tipos diferentes de haces de fibras. Los haces de depósito de líquido (LR) se crearon por hilado directamente sobre la superficie de agua destilada contenida en un papel de aluminio conectado a tierra. Una vez que se había depositado una película fina de fibras sobre la superficie del agua, se interrumpió el procedimiento de electrohilado. Usando la punta de una aguja, las fibras se extrajeron de la superficie del líquido en forma de haces tridimensionales y se dejaron secar.

[0134] Esto se muestra de forma esquemática en la figura 2. Cuando las fibras se retiran de la superficie, el efecto de la tensión superficial del líquido hace que las fibras se alineen y colaezcan, creando haces fibrosos 3D.

[0135] Los haces de punto fijo (FP) se hicieron a partir de fibras hiladas entre dos placas de acero inoxidable conectadas a tierra, colocadas con 3 cm de separación. Esto se muestra esquemáticamente en la figura 3. Para cada muestra creada, el procedimiento de electrohilado se llevó a cabo durante 90 s. Después de este tiempo, las fibras conectadas se sumergieron con cuidado en agua destilada haciendo que las fibras separadas se agruparan entre sí. Después las placas se rotaron, retorciendo las fibras agrupadas para producir haces tridimensionales fibrosos robustos. Estos se sacaron de las placas y se dejaron secar.

[0136] Los mandriles hechos para este fin de aluminio con diámetro de 120 mm y grosor del canto de 3 mm (mandril fino - FM) y de 5 mm (mandril delgado - TM) respectivamente se montaron en una varilla Tufnol con conductora. Las fibras se hilaron sobre el canto de cada mandril girando a una velocidad de 600 rpm durante 2 min, ya que esto era tiempo suficiente para completar el cubrimiento del canto del mandril. La esterilla de fibras depositada sobre el canto del mandril se retiró en forma de una sola tira larga y se cortó cada 3 cm a lo largo de su longitud en láminas más pequeñas. Cada lámina de fibras después se sumergió en agua destilada y se retorció para formar un haz tridimensional, que después se dejó secar.

[0137] Las fibras se hilaron sobre el canto de los mandriles giratorios fino (3 mm) o delgado (5 mm), de acero inoxidable, hechos a medida, como se muestran esquemáticamente en las figuras 4 y 5. Los procedimientos que usan los diferentes mandriles se indican como FM y TM para el mandril fino y el mandril delgado, respectivamente. Las fibras se hilaron sobre el canto de cada uno de los mandriles que giraban a una velocidad de 600 rpm durante 2 min, ya que este tiempo era suficiente para completar el cubrimiento del canto del mandril. La esterilla de fibras depositada sobre el canto del mandril se retiró en forma de una sola tira larga y se cortó cada 3 cm a lo largo de su longitud en láminas más pequeñas. Cada lámina de fibras después se sumergió en agua destilada y se retorció para formar un haz tridimensional, que después se dejó secar.

10 *Formación del haz de fibras secundario*

[0138] Se usó una serie de haces creados mediante el procedimiento del canto del mandril giratorio, para producir 2 configuraciones diferentes de tipo cuerda: trenza y torsión. En el primer ejemplo, se usaron dos juegos de pinzas para trenzar 3 haces entre sí. En el segundo ejemplo, se dispusieron 3 haces paralelos uno con otro y se retorcieron entre sí manualmente.

(3) Caracterización del andamio

SEM - fibras y haces primarios

[0139] Las morfologías estructurales de diferentes haces fibrosos se evaluaron por análisis de SEM (Topcon SM-300) y voltaje de aceleración de 5 keV con una distancia de trabajo de 8 mm. Las muestras se montaron sobre soportes recubiertos de carbón separados (Agar Scientific) y se recubrieron por pulverización catódica de oro durante un total de 2 min (Edwards Sputter Coater - S150B). Durante el primer minuto, las muestras se colocaron planas apuntando hacia arriba; después las muestras se pusieron sobre su costado (colocadas aproximadamente 45° respecto a la vertical) y se recubrieron durante 30 s; rotando 180° sobre este costado, las muestras se recubrieron durante los 30 s finales. Esto asegura el recubrimiento adecuado y previene las cargas dentro de la cámara de SEM.

[0140] Se usó la herramienta Image para Windows versión 3.00 para medir el diámetro de los haces de las imágenes de microscopía. Se midieron diámetros de 50 fibras seleccionadas aleatorias por concentración.

[0141] Para determinar el alineamiento de las fibras, las fibras recogidas se observaron por SEM y se midieron entre 70 y 80 fibras de acuerdo con su alineamiento con el eje longitudinal (línea recta desde la parte superior a la inferior del micrógrafo) usando la herramienta Image para Windows versión 3.00. El ángulo de las fibras se determinó seleccionando el icono "ángulo" y midiendo el ángulo entre las fibras respecto al eje longitudinal. Los resultados se transfirieron a Microsoft Excel para el posterior análisis.

[0142] El diámetro de los haces variaba dependiendo de la técnica de fabricación usada: la figura 6 muestra un haz formado usando la técnica del depósito de líquido; la figura 7 muestra un haz formado usando la técnica del punto fijo; la figura 8 muestra un haz formado usando la técnica del mandril fino; y la figura 9 muestra un haz formado usando la técnica del mandril delgado. Los haces más anchos se formaron en el mandril de canto delgado y los más finos en el procedimiento del depósito de líquido.

[0143] El diámetro de las fibras contenidas en cada haz estaba en el intervalo de submicrómetros a micrómetros (véase la tabla 1) y con una media de 1 μm de diámetro para 3 de los 4 procedimientos - FP, FM y TM. Las fibras en los haces de LR tenían diámetros de submicrómetros. Realmente, se produjeron fibras que tenían diámetros tan pequeños como 200 nm usando las técnicas descritas en el presente documento.

Tabla 1

Procedimiento de formación del haz	Diámetro medio de las fibras en cada haz (μm) (\pm desv. típica)	Diámetro medio de haces (μm) (\pm desv. típica)
Depósito de líquido	0,64 ($\pm 0,19$)	46,84 ($\pm 16,89$)
Punto fijo	1,06 ($\pm 0,31$)	144,22 ($\pm 49,26$)
Mandril fino	1,03 ($\pm 0,28$)	189,83 ($\pm 15,84$)
Mandril delgado	0,98 ($\pm 0,28$)	375,47 ($\pm 71,91$)

[0144] El diámetro del haz creado dependía del procedimiento elegido, que seguían la tendencia de grande a pequeño: TM>FM>FP>LR. Los haces formados por la técnica de TM eran aproximadamente 8 veces más anchos de diámetro comparados con los haces de LR, y se debe al área ancha del canto del mandril para el recubrimiento con fibra comparado con una punta de aguja fina para extraer las fibras.

[0145] La presencia de perlas en las fibras podría ser resultado de las cadenas de polímero enrolladas que no se han estirado suficientemente durante el procedimiento de electrohilado antes de su impacto en el colector.

[0146] Aplicando los mismos parámetros de electrohilado a cada procedimiento de recolección, se podría esperar que las fibras individuales contenidas en los haces tuvieran diámetro similar. Sin embargo, las fibras en los haces de LR eran más finas, comparadas con los otros tres procedimientos cuyas fibras eran muy similares. La diferencia de las fibras en los haces de LR puede deberse a la extracción de las fibras de la superficie del depósito de líquido, que hace que se estiren y adelgacen ya que debe superarse la tensión superficial del líquido con el fin de poder sacar las fibras.

SEM - haces secundarios

[0147] Las imágenes de SEM de los haces secundarios, formados a partir de haces primarios hilados en el mandril fino, mostraban las configuraciones deseadas de trenzado y retorcimiento. La figura 10 muestra la configuración trenzada. Se han trenzado 3 haces de fibras primarios para formar un haz secundario. Se pueden usar otros números de haces de fibras primarios, por ejemplo 5 o más.

[0148] La figura 11 muestra la configuración retorcida. Se han retorcido 3 haces de fibras primarios para formar un haz secundario. Se pueden usar otros números de haces de fibras primarios, por ejemplo 5 o más.

SEM - haces terciarios

[0149] En las figuras 36 y 37 se muestran imágenes de SEM de haces terciarios, formados por trenzado de haces secundarios del tipo discutido antes. La figura 37 muestra las fibras de PCL individuales en una zona aumentada del andamio de la figura 36. En este ejemplo, se combinan 3 haces secundarios, sin embargo si se desea se pueden combinar más de 3 haces secundarios. El diámetro total de la estructura terciaria mostrado en la figura 36 es 2,37 (+/- 0,09) cm.

(4) Ensayos de degradación

[0150] Los haces de fibras obtenidos usando los procedimientos expuestos antes se sometieron a un estudio de degradación in vivo de 3 meses, para determinar la velocidad de degradación e identificar los productos de degradación.

[0151] Se llevó a cabo un estudio de degradación de 3 meses en esterillas de fibras alineadas 2D electrohiladas, haces fibrosos 3D y láminas moldeadas en disolvente, de PCL. Todas las muestras se fabricaron a partir de una disolución de PCL disuelta en acetona en una concentración de 10% en p/v. Los dos tipos de muestras electrohiladas se recogieron de un mandril giratorio (diámetro de 120 mm, grosor del canto 3 mm) (500 rpm); el tiempo de hilado era 15 min.

[0152] Los haces 3D se crearon como se ha descrito antes con respecto a los procedimientos de FM y TM. Para reproducir la longitud de la muestra, las esterillas se cortaron cada 3 cm a lo largo de la longitud de la tira fibrosa recogida individual.

[0153] Todas las muestras se fabricaron el mismo día y se suspendieron individualmente en tubos Eppendorf (Fisherbrand) que contenían 1,5 ml de disolución tamponada de fosfato estéril (PBS) (Invitrogen). Todos los tubos Eppendorf se cubrieron con película de laboratorio y se guardaron en un horno a 37°C, se separó la PBS y las muestras se dejaron secar antes del ensayo.

[0154] Las propiedades mecánicas (módulo de Young, resistencia a la tracción y alargamiento máximo) de los haces de fibras se midieron durante el periodo de 3 meses. Igualmente, se usaron la GPC, HPLC y MS-electropulverización para identificar los productos de degradación. Las mediciones por DSC se usaron para el seguimiento de la degradación de los haces de fibras.

[0155] Las muestras de GPC se disolvieron por separado en tetrahidrofurano (Fisher Scientific) (concentración 0,2% en p/v). Se inyectaron 100 µl de disolución en el GPC, que se había calibrado con patrones de poliestireno (PS) (Pressure chemical standards) en THF con pesos moleculares conocidos en el intervalo de 600 - 7,7 x 10⁵ (Fig. 3.9). Se usó como fase móvil THF destilado con un caudal de 1 ml/min. La fase móvil y la bomba suministran la muestra a la columna y aseguran un flujo de disolvente constante. La columna (Phenomenex) estaba compuesta de Phenogel 5 µm, con tamaños de poros de 500 Å, 5 x 10⁴ Å y 5 x 10⁶ Å.

[0156] La obtención y el análisis de los datos se lograron con el software PSS Win GPC, que permite determinar la masa molecular media y el índice de polidispersidad. El ensayo se llevó a cabo por triplicado y se analizaron las distribuciones de masa molecular media para cada tipo de muestra.

[0157] Para el análisis por HPLC, la columna usada era una columna de fase inversa, con un material de empaquetamiento nucleósilo con un tamaño de poros de 100 Å, tamaño de partículas de 5 µm, longitud de la columna de 250 mm y diámetro de 4,6 mm (Macherey Nagel). La columna se ajustó con 1 ml/min, con un gradiente desde 20% de tampón B (acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,1%) a 80% de tampón B a lo largo de un periodo de 31 min. El tampón A era agua de calidad para HPLC con ácido trifluoroacético al 0,1%. Todas las concentraciones para las curvas de calibración se completaron con 20% de tampón B y 80% de tampón A.

[0158] Los resultados del ensayo de degradación confirmaron que los haces de fibras de PCL continuaban proporcionando una función mecánica (como sería deseable en el caso de la reparación de determinados tendones) y que los productos de degradación son oligómeros y lactonas, que no serían tóxicos para el paciente.

Análisis térmico

[0159] Se usó un calorímetro diferencial de barrido de flujo de calor (DSC Q100 TA) con un autoinyector y sistema de enfriamiento refrigerado, para analizar los haces hilados. Los datos recogidos se analizaron usando el software Universal Analysis 2000 v.4.2E de TA Instruments. El primer calentamiento se usó para determinar si la técnica de procesamiento aplicada a las fibras electrohiladas tenía algún efecto en el punto de fusión y la cristalinidad de los materiales.

[0160] El porcentaje de cristalinidad se calculó a partir del calor de fusión y se usó como referencia una PCL 100% cristalina con una entalpía de fusión de 135,44 J/g [Crescenze V. y col., 1972].

[0161] Los resultados de la DSC se muestran en la tabla 2. Muestran una variación de la entalpía de fusión entre los tipos de haces, que posteriormente afecta a la cristalinidad del haz. El punto de fusión de la PCL depende del procedimiento de haz usado. Los haces de LR tenían el punto de fusión más bajo. Se observó la cristalinidad más alta en los haces de FM y era similar a la cristalinidad de la PCL (sin procesar) obtenida en el comercio, que se analizó como se había suministrado.

Tabla 2

Tipo de haz	Punto de fusión P.f. (°C)	Entalpía de fusión ΔHm (J/g)	Cristalinidad X (%)
Depósito de líquido	54,94 (±0,09)	34,04 (±15,14)	25,13
Punto fijo	55,16 (±0,30)	40,94 (±8,27)	30,23
Mandril fino	57,07 (±0,04)	73,24 (±8,39)	54,08
Mandril delgado	55,40 (±0,16)	53,49 (±12,48)	39,49
PCL (sin procesar)	63,47 (±0,51)	75,68 (±1,62)	55,88

[0162] Parece que la cristalinidad del polímero depende del procedimiento de fabricación del haz y sigue la tendencia FM>TM>FP>LR, siendo el haz de FM el más cristalino y el de LR el menos. Los haces de FM demostraron una cristalinidad de 54,08% cuando se compararon con la PCL completamente cristalina. Sin embargo, en su forma estándar la PCL es semicristalina y cuando se analizó demostró tener una cristalinidad de 55,88%.

[0163] La diferencia de cristalinidad puede deberse a la orientación molecular final de las cadenas de polímero contenidas en las fibras de los haces. Los resultados sugieren que los haces fabricados en el canto de mandril tienen el orden mayor, indicando una mayor orientación en las fibras y los haces de depósito de líquido los de menor orden, ya que las fibras se hilaron inicialmente en una disposición aleatoria antes de ser alineadas a propósito. La orientación molecular alterada está apoyada además por un cambio similar en la temperatura de fusión del haz, ya que una estructura más ordenada requiere mayor energía para fundir.

[0164] A la cristalinidad le afecta la orientación molecular en las fibras de los haces y esto influye en las propiedades mecánicas de los materiales. Los datos mecánicos reiteran esta variación en la cristalinidad de los haces. Las estructuras más cristalinas tienden a ser más frágiles, teniendo menor resistencia a la tracción y módulo, a pesar de sufrir deformación significativa.

[0165] Durante el estudio de degradación de 3 meses, las muestras de PCL demostraron aumento de la cristalinidad, sugiriendo que se había producido el ataque hidrolítico en las regiones amorfas del polímero, y había causado el reordenamiento de las cadenas para crear una estructura más ordenada. El análisis del primer ciclo térmico para todas las muestras durante el estudio de degradación demostró tendencias similares en la temperatura de fusión y la entalpía de fusión: la temperatura de fusión aumentó a lo largo del tiempo y la entalpía de fusión dio como resultado un aumento total después de 3 meses.

[0166] También se observó un aumento en el módulo y la resistencia a la tracción durante el estudio de 3 meses, observándose los valores más altos para el módulo y la resistencia a la tracción en el punto de los 3 meses. Por lo tanto, el cambio en la cristalinidad da lugar a un cambio favorable de las propiedades mecánicas del andamio.

[0167] En un estudio más largo, el nivel observado de formación de cristal parecía estar limitado, en cuanto que una vez que se había alcanzado un máximo, se podía esperar la degradación de los oligómeros y rotura de los cristales.

5 **[0168]** La variación observada en la cristalinidad y por lo tanto en las propiedades mecánicas del andamio de haces de fibras de PCL puede proporcionar una ventaja adicional en la reparación de tendones: un aumento de las propiedades mecánicas en los primeros meses después de la inserción, seguido en los meses posteriores de una reducción de las propiedades mecánicas para coincidir con el crecimiento/reparación del tendón. De esta forma, el andamio de haces de fibras proporciona adecuadamente la sustitución dependiente del tiempo de la función del tejido natural.

(5) Ensayo mecánico del andamio

Módulo de Young, resistencia a la tracción y alargamiento máximo

15 **[0169]** Los haces se fijaron a tiras de cartón, permitiendo una sujeción adecuada en las pinzas del aparato del ensayo de la tracción. Las fibras se aclimataron para ensayar en las condiciones ambiente (23°C, 50% de HR) durante 24 h antes de su ensayo en un aparato Instron, con celda de carga de 5 N y velocidad de cruceta de 5 mm/min.

20 **[0170]** Se calculó el módulo de Young para cada haz de fibras usando los mismos dos puntos de alargamiento para permitir la comparación directa entre los haces. Se registró la resistencia a la rotura por tracción como la mayor tensión (MPa) que soporta el haz antes de romperse. Se midió el alargamiento máximo, que es la elongación o cambio de longitud del haz, en el punto de rotura total del haz.

25 **[0171]** Los datos mecánicos se representan en las figuras 12 a 14 como gráficas de cajas y bigotes. Cada grupo de haces se representa mediante la mediana y el rango intercuartil (caja), y los valores máximo y mínimo registrados (bigotes). Se usó la prueba U de Mann-Whitney para comparar el módulo de Young, resistencia a la tracción y alargamientos entre diferentes tipos de haces.

30 **[0172]** Los resultados de las mediciones del módulo de Young se muestran en la figura 12. A la rigidez de la PCL le afectaba el procedimiento de fabricación del haz. El módulo de Young más alto era para los haces de LR (16,64 MPa). Sin embargo, el análisis estadístico mostró que los haces de LR no eran significativamente diferentes de los haces de FP. Los haces formados con cualquiera de las técnicas de mandril dieron como resultado valores de módulo significativamente inferiores comparados con los haces de FP y LR.

35 **[0173]** Los resultados de las mediciones de la resistencia a la tracción se muestran en la figura 13. La resistencia a la rotura por tracción (UTS) de los haces era más alta para los creados por el procedimiento de FP (5,32 MPa). Sin embargo, los haces de FP no eran significativamente diferentes de los haces de LR. La variabilidad entre muestras era pequeña para ambas técnicas de mandril. Los haces de TM alcanzaron la UTS más baja.

40 **[0174]** Los resultados de las mediciones del alargamiento máximo se muestran en la figura 14. Los haces más extensibles eran los creados por el procedimiento de FM, duplicándose la longitud de los haces cargados antes de la rotura. El menor alargamiento se observó con los haces de LR (0,44 mm/mm). Tanto los haces de LR como de FP eran significativamente diferentes comparados con los datos de FM.

45 **[0175]** En términos de resistencia a la tracción y módulo, los resultados de cada procedimiento de fabricación dependen del haz del diámetro. Los haces de diámetro menor dieron como resultado mayor resistencia a la tracción y módulo comparado con los de diámetro mayor. En general, los haces alcanzaron la mayor resistencia a la tracción y módulo en el siguiente orden: FP>FM>TM.

50 **[0176]** La mayor extensibilidad la alcanzaron los haces creados usando el mandril, alcanzando prácticamente todos los haces de FM alargamientos de más de 100%. Los haces de FP presentaron una buena extensibilidad, logrando alargamientos >50%. El alargamiento era menor para los haces de LR. Esto puede deberse a la falta de perlas presentes en su estructura, que proporciona un desenrollamiento limitado de las cadenas de polímero que de otra forma podría ayudar a resistir mayores alargamientos. La falta de torsión en la estructura del haz y su fragilidad también pueden contribuir a las propiedades de alargamiento pobres asociadas con el procedimiento del depósito de líquido. Los resultados sugieren que los haces con un número mínimo de fibras ayudarían a su capacidad de soportar las fuerzas aplicadas; los otros haces contenían un número mayor de fibras de submicrómetros a micrómetros, proporcionando un área mayor para la disipación de la carga, aumentando seguidamente la extensión del haz antes de la ruptura eventual.

55
60

Efecto de la torsión

5 **[0177]** Las esterillas de fibras de PCL alineadas electrohiladas 2D se mantuvieron estáticas en un extremo y se retorcieron por el otro extremo un número de torsiones en la dirección "S". Se usó un contador para registrar el número de torsiones aplicadas.

10 **[0178]** Después se ensayaron los haces primarios retorcidos usando los procedimientos discutidos antes para obtener valores para el módulo, resistencia a la tracción y alargamiento. Los datos medidos se analizaron por ANOVA de una vía y ensayos posteriores de Bonferroni.

[0179] Los resultados de las mediciones se exponen en las figuras 38 a 40. Como puede verse en las gráficas, los datos sugieren que el módulo y la resistencia a la tracción aumentan con el aumento del número de torsiones. Se observa un nivel significativo de alargamiento en todos los casos.

15 **[0180]** Obsérvese que el número de torsiones indicado en las figuras 38 a 40 son torsiones por 3 cm de haz de fibras de PCL. Esto se puede convertir en vueltas por metro como sigue:

- 20 15 torsiones/3 cm = 500 vueltas por metro
 20 torsiones /3 cm = 667 vueltas por metro
 25 torsiones /3 cm = 833 vueltas por metro
 30 torsiones /3 cm = 1000 vueltas por metro
 35 torsiones /3 cm = 1167 vueltas por metro

25 **[0181]** Estos resultados demuestran que se logran propiedades mecánicas mejoradas, mientras que se mantiene un buen rendimiento de elongación.

(6) Ensayos in vitro

30 **[0182]** Se hicieron haces de fibras de acuerdo con los procedimientos descritos antes y se usaron en los siguientes estudios para determinar la eficacia de los andamios de la presente invención para la reparación de tendones.

Tenocitos

35 **[0183]** Las figuras 15 y 16 muestran tenocitos sembrados en haces de fibras primarios que tienen una configuración retorcida. Se observa el crecimiento de tenocitos a lo largo del eje longitudinal del andamio, presentando los tenocitos la misma orientación que es complementaria a la configuración retorcida. En particular, se pueden ver filopodios de las células, lo cual demuestra la unión y propagación de las células. Las células crecen en la dirección del alineamiento de la fibra.

40 **[0184]** Las figuras 17 y 18 también muestran tenocitos sembrados en haces de fibras, pero esta vez los andamios se han cargado con gel de colágeno. De nuevo, se observa un crecimiento sustancial considerable de tenocitos, produciéndose el crecimiento a lo largo del eje longitudinal del andamio. En particular, la figura 17 es una simulación de un entorno in vivo, porque el gel de colágeno proporciona un entorno 3D a la célula que estimula a las células a "incorporarse" desde la superficie. Las células se mueven activamente hacia el haz y se alinean a lo largo de la dirección principal del haz. La figura 17 muestra una morfología celular similar a la que se esperaría ver in vivo.

50 **[0185]** La figura 19 muestra un haz secundario trenzado sobre el que se han sembrado y cultivado tenocitos durante 14 días. Las figuras 20 a 22 muestran vistas de primer plano de una parte del andamio, estando aumentada la región dentro de la caja de trazos de la figura 20 en las figuras 21 y 22. Como puede verse en las micrografías, se observa crecimiento sustancial de tenocitos para esta configuración trenzada. Es de destacar el crecimiento de tenocitos en los canales entre los haces de fibras primarios. Igualmente, se puede observar un patrón de crecimiento helicoidal a lo largo de la superficie de los haces de fibras primarios (cuyos haces están retorcidos). Esto sugiere que el crecimiento de tenocitos puede ser estimulado por la estructura secundaria del andamio, en la que el crecimiento de los tenocitos sigue no solo la topografía de las fibras en los haces primarios sino también la topografía de los haces secundarios (por ejemplo, los tenocitos crecen a lo largo de los canales formados entre los haces primarios).

Proliferación celular

60 **[0186]** Se llevaron a cabo ensayos de proliferación celular, demostrando los resultados que se produce una unión, crecimiento y proliferación considerables en los andamios y haces de fibras alineadas de la presente invención.

[0187] También se llevaron a cabo ensayos de expresión génica usando genes asociados con el desarrollo tisular de tendones. Los resultados de estos ensayos confirmaron que se estaba produciendo desarrollo tisular del tendón en y a lo largo del andamio.

5 **[0188]** Se llevaron a cabo estudios de activación de macrófagos para evaluar la biocompatibilidad e idoneidad para el uso in vivo de las estructuras específicas de la presente invención. Los resultados de los estudios demostraron que los macrófagos no eran activados.

Efecto del cultivo celular en la biomecánica del material

10 **[0189]** Se cultivaron láminas fibrosas 2D y haces 3D, preparados como se describe en el presente documento, durante 5 días, con y sin tenocitos, para determinar si la presencia de células afectaba a las propiedades mecánicas. Se eligió un periodo de tiempo de 5 días ya que las imágenes de SEM demostraron alineamiento celular significativo a lo largo de los ejes de nanofibras y producción de matriz extracelular (ECM).

15 **[0190]** Para las muestras sembradas con células, se sembraron 50.000 células por cm² sobre cada una de las construcciones electrohiladas.

20 **[0191]** Todas las muestras se ensayaron en un Instron (2211) con una velocidad de cruceta de 5 mm/min. Los datos se presentan en las figuras 23 a 28 por gráficas de cajas y bigotes, que corresponden a la mediana, rango intercuartiles inferior y superior (cajas) y los valores máximos y mínimos registrados (bigotes).

25 **[0192]** Los resultados muestran que después de cultivo con células durante 5 días, las propiedades mecánicas tanto para los haces 3D como para las láminas fibrosas 2D habían mejorado sorprendentemente. Este aumento de las propiedades mecánicas puede deberse a la penetración de las células y la ECM entre las nanofibras de las muestras, generando un material de tipo compuesto.

30 **[0193]** Los resultados también demuestran una ventaja significativa lograda en términos de propiedades mecánicas por los haces de fibras 3D (figuras 23, 25 y 27) comparado con las fibras 2D (figuras 24, 26 y 28). En relación con esto, mientras que las dimensiones de los haces 3D no representan el tendón en su conjunto, el fin es que las propiedades mecánicas del andamio se ajusten dependiendo del nivel de daño que soporta el tejido, en términos del número de haces requerido para llenar el hueco y la técnica de tejido usada elegida. Se pretende que el andamio promueva la formación de tejido nuevo del tendón y proporcione propiedades mecánicas adecuadas, reduciendo finalmente el tiempo de recuperación del paciente.

35 *(7) Ensayos in vivo*

Modelo de ratón

40 **[0194]** Se llevó a cabo un estudio piloto preliminar usando 6 ratones macho C57BU6 de entre 8-12 semanas de edad. Los ratones fueron suministrados por la instalación de animales en la Universidad de Manchester. Se recogieron dos ratones por tiempo de medición (0,3 días y 3 semanas).

45 **[0195]** La sala de trabajo se preparó de forma adecuada y se anestesiaron los ratones. Se afeitaron sus patas y se eliminó el pelo. Se aplicó un torniquete alrededor del muslo y se hizo una incisión longitudinal en la línea media posterior desde la unión musculotendinosa hacia abajo a la articulación del tobillo. Se identificó el tendón de Aquiles (véase 100, figura 29) y se extirpó 50% de la anchura de los tendones y 4 mm longitudinalmente (véase 102, figura 30).

50 **[0196]** El andamio, preparado como se ha descrito en el presente documento, se injertó en el defecto y se suturó con suturas de poliamida (Braun Medica, Reino Unido) de forma proximal y distal (véase 104, figuras 31 y 32). A lo largo de la operación, el tendón se mantuvo bien hidratado mediante irrigación regular con disolución salina. El tejido se devolvió a su posición original y la piel se cerró con suturas. El tiempo total del procedimiento para cada ratón era 90 min. Los ratones se pesaron y se mantuvieron en jaulas individuales.

55 **[0197]** Todos los ratones sobrevivieron a la cirugía y continuaron comiendo y bebiendo bien. Se hizo el seguimiento diario de los ratones durante los 3 primeros días después de la cirugía y después semanalmente hasta que se recogieron. Se registró el peso, locomoción y heridas (véase la tabla 3). La locomoción normal volvió después de 24-48 h, que estaba dentro del periodo de recuperación esperado.

Tabla 3

Ratón	Edad de los ratones	Peso (g)	Tiempo de recogida	Peso (g)	Periodo posoperatorio
1	8-10 semanas	26,8	Día 0	el mismo	Ninguno
2		25	Día 3	el mismo	Ninguno
3		25		22,5	Sin incidentes
4		28		26,5	Día 2 - hinchamiento de la pierna izquierda, desprendimiento de la herida superficial
5		26,5	Día 21	28,2	Sin incidentes
6		28		27	Día 1 - ambas piernas ligeramente hinchadas Día 2 - desprendimiento de la herida superficial en la zona del tobillo, asentada al final de la primera semana

[0198] Los andamios eran fáciles de manejar durante la cirugía, no eran resbaladizos y eran fáciles de suturar en el sitio. Se encontró que la colocación del andamio dentro del tejido del tendón era fácil, lo cual es una ventaja importante para un andamio que se va a usar en este tipo de cirugía. Todos los procedimientos eran sencillos y solo se necesitó un andamio para cada procedimiento (es decir, el cirujano no rechazó ningún andamio por, por ejemplo, no ser adecuado, dificultad de manejo, daño durante el manejo).

[0199] La figura 33 muestra un andamio de PCL 200 in situ a lo largo del tendón natural de ratón 202 poco después de sutura. La figura 34 muestra un andamio de PCL 204 después de 3 semanas in vivo. La orientación del andamio se indica por una flecha de trazos 206. La localización de la sutura se muestra en 208. La figura 35 muestra tejido de tendón nuevo que ha crecido sobre el andamio de haces de fibras de PCL después de 3 semanas in vivo.

[0200] Está claro a partir de estas micrografías de SEM, que el andamio de haces de fibras de PCL tiene una morfología similar a la del tendón natural y que se produce un crecimiento sustancial de células del tendón in vivo.

[0201] Este estudio piloto preliminar positivo indica que los andamios que comprenden fibras de PCL representan un procedimiento satisfactorio para la reparación de tendones dañados.

[0202] Los ejemplos descritos en el presente documento demuestran que se pueden fabricar haces 3D que contienen fibras de PCL electrohiladas para así controlar el diámetro de la fibra, diámetro del haz y la morfología. Por ejemplo, el diámetro total del haz se puede ajustar mediante la selección adecuada del procedimiento de procesado: siendo el efecto en el diámetro el siguiente: TM>FM>FP>LR (de mayor a menor).

[0203] Los haces de LR y FP dieron como resultado el mayor módulo de Young. La resistencia a la tracción era mayor para los haces de FP. El alargamiento máximo se logró con haces hechos por el procedimiento de FM.

[0204] Aunque que las propiedades mecánicas de los tendones son considerablemente más altas comparadas con los haces ensayados en este estudio, un solo haz es representativo de solo una pequeña parte de la estructura total del tendón. Se propone que la extensión del daño tisular producido determinará el tamaño de andamio que se requiere. El desarrollo de una construcción más grande implicaría el intertejido de varios haces entre sí, lo cual podría mejorar las propiedades mecánicas y además reproducir la estructura jerárquica natural de los tendones.

[0205] La técnica de procesamiento aplicada a las fibras electrohiladas parece que afecta a la cristalinidad del material y al punto de fusión, estando la cristalinidad observada en el siguiente orden: FM>TM>FP>LR. La temperatura de inicio de la fusión sigue la misma tendencia.

[0206] La arquitectura del andamio y las características de superficie son características importantes para la reparación tisular satisfactoria. Ambos elementos se pueden controlar por la técnica de fabricación descrita en el presente documento.

[0207] Se pretende que los andamios 3D electrohilados descritos en el presente documento imiten la estructura de tendones naturales y proporcionen así un entorno para la siembra de tenocitos para segregar ECM y restaurar la función tisular del tendón.

[0208] Los autores de la presente invención han encontrado que el uso de PCL para hacer las fibras de los andamios de la presente invención, proporciona la ventaja de una velocidad de degradación que es más adecuada para la velocidad de crecimiento de los tendones naturales. Además, los estudios de degradación in vitro discutidos antes muestra que los productos de degradación del andamio son los oligómeros y lactonas esperados característicos de la degradación de la PCL.

[0209] Las realizaciones de los andamios de reparación tisular descritas en el presente documento tienen una o más de las siguientes ventajas:

- 5 (1) la superficie del andamio promueve la adhesión y/o proliferación de células y también previene la desdiferenciación celular;
- (2) el material usado en la fabricación del andamio es biodegradable y/o biorreabsorbible, lo cual elimina la necesidad de cirugía invasiva adicional ya que el andamio se degrada con el tiempo y adecuadamente los productos de rotura son metabolizados de forma natural;
- 10 (3) el andamio se fabrica fácilmente en la forma y tamaño deseados para satisfacer los requisitos del paciente individual; y
- (4) el andamio es capaz de realizar temporalmente la función física de los tejidos originales demostrando propiedades mecánicas similares.

REFERENCIAS

[0210]

Se han citado antes una serie de patentes y publicaciones con el fin de describir y revelar de forma más completa la invención y el estado de la técnica a la que pertenece la invención. A continuación se dan las citas completas de estas referencias.

20 Sato M, Maeda M, Kurosawa H, Inoue Y, Yamauchi Y, Iwase H (2000), "Reconstruction of rabbit Achilles tendon with three bioabsorbable materials: histological and biomechanical studies", *Journal of Orthopaedic Science*, 5, 256-267.

25 Cao Y L, Liu Y T, Liu W, Shan Q X, Buonocore S D, Cui L, (2002), 'Bridging tendon defects using autologous tenocyte engineered tendon in a hen model', *Plastic and Reconstructive Surgery*, 110(5), 1280-1289.

30 Casper C L, Stephens J S, Tassi N G, Chase D B, Rabolt J F (2004), "Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibres: effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process", *Macromolecules*, 37, 573-578. Crescenze V., Manzini G., Calzolari G., Borri C., "Thermodynamics of fusion of poly b-propiolactone and poly e-caprolactone. Comparative analysis of the melting of aliphatic polylactone and polyester chains". *Eur. Polym. J.* 1972;8:449-83.

35 Curtis A, Wilkinson C, Crossan J, Broadley C, Darmani H, K.K. J, H. J, y col., (2005), "An in vivo microfabricated scaffold for tendon repair", *Eur. Cell Mater.*, 9:50-57.

Dzenis Y (2004), "Spinning continuous fibres for nanotechnology", *Science*, 304, 1917-1919.

Fong H, Chun I, Reneker D (1999), "Beaded nanofibres formed during electrospinning", *Polymer*, 40, 4585-4592.

40 Huang Z M, Zhang Y Z, Kotaki M, Ramakrishna S (2003), "A review on polymer nanofibres by electrospinning and their applications in nanocomposites", *Composites Science and Technology*, 63, 2223-2253.

45 Maganaris C N, Paul J P, (1999), "In vivo human tendon mechanical properties", *Journal of Physiology*, 521.1, 307-313.

Magnusson S P, Hansen P, Aagaard P, Brønd J, Dyhre-Poulsen P, Bojsen-Moller J, Kjaer M, (2003), "Differential strain patterns of the human gastrocnemius aponeurosis and free tendon, in vivo", *Acta Physiologica Scandinavica*, 177 (2), 185-195.

50 Mit-uppatham C, Nithitanakul M, Supaphol P (2004), "Ultrafine electrospun polyamide-6 fibres: effect of solution conditions on morphology and average fibre diameter", *Macromolecular Chemistry and Physics*, 205, 2327-2338.

Ramakrishna S, Fujihara K, Teo W-E, Lim T-C, Ma Z (2005), "An Introduction to Electrospinning and Nanofibers", World Scientific Publishing Co. Ltd.

55 Reneker D H, Yarin A L, Fong H, Koombhongse S (2000), "Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning", *Journal of Applied Physics*, 87 (9), 4531-4547.

60 Shawon J, Sung C (2004), "Electrospinning of polycarbonate nanofibres with solvent mixtures THF and DMF", *Journal of Materials Science*, 39, 4605-4613.

Smit E, Buttner U, Sanderson R D (2005), "Continuous yarns from electrospun fibres", *Polymer*, 46, 2419-2423.

Smith D J (Jr), Jones C S, Hull M, Kleinert H E, (1986), "Evaluation of glutaraldehyde-treated tendon xenograft", *J. Hand Surg. [Am]*, 11(1), 97-106.

5 Venugopal J, Ma L L, Yong T, Ramakrishna S (2005), "In vitro study of smooth muscle cells on polycaprolactone and collagen nanofibrous matrices", *Cell Biology International*, 29, 861-867.

Wannatong L, Sirivat A, Supahol P (2004), "Effects of solvents on electrospun polymeric fibres: preliminary study on polystyrene", *Polymer International*, 53, 1851-1859.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un andamio de reparación tisular que comprende un haz de fibras secundario, comprendiendo el haz de fibras secundario una pluralidad de haces de fibras primarios, comprendiendo cada haz de fibras primario una pluralidad de fibras, en el que las fibras comprenden policaprolactona (PCL), y en el que el diámetro medio de las fibras es menor de 1 μm .
- 10 2. Un andamio de reparación tisular de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la pluralidad de fibras están alineadas.
3. Un andamio de reparación tisular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que cada haz de fibras primario se retuerce de forma que tenga al menos 400 vueltas por metro.
- 15 4. Un andamio de reparación tisular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el andamio consiste esencialmente en PCL.
5. Un andamio de reparación tisular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la pluralidad de haces de fibras primarios se entrelazan, se trenzan adecuadamente o se retuercen juntos.
- 20 6. Un andamio de reparación tisular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el haz de fibras secundario tiene una morfología de tipo cuerda.
7. Un andamio de reparación tisular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el diámetro medio de los haces de fibras primarios está en el intervalo de 30-100 μm .
- 25 8. Un andamio de reparación tisular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el diámetro de los haces de fibras secundarios está en el intervalo de 150-400 μm .
9. Un andamio de reparación tisular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el andamio de reparación tisular comprende una pluralidad de haces de fibras secundarios.
- 30 10. Un andamio de reparación tisular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las fibras están hechas por electrohilado.
- 35 11. Un andamio de reparación tisular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el haz secundario comprende al menos 3 haces de fibras primarios.
12. Un andamio de reparación tisular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el haz de fibras primario comprende al menos 50 fibras.
- 40 13. Un andamio de reparación tisular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para usar en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal, en el que el procedimiento comprende tratar un tendón dañado.
- 45 14. Uso de PCL en un procedimiento para fabricar un andamio de reparación tisular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para el tratamiento de un tendón dañado.
- 50 15. Un procedimiento para hacer un andamio de reparación tisular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, comprendiendo el procedimiento las etapas de
 - (A) electrohilar una pluralidad de fibras, comprendiendo las fibras PCL;
 - (B) formar un haz de fibras primario a partir de la pluralidad de fibras; y
 - (C) formar un haz de fibras secundario a partir de una pluralidad de haces de fibras primarios.

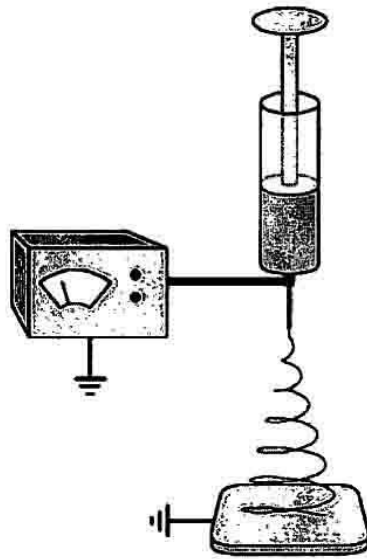


Figura 1

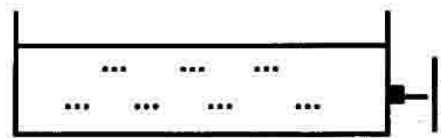


Figura 2

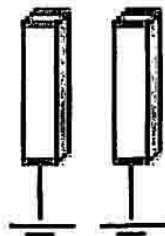


Figura 3

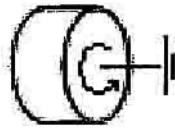


Figura 4



Figura 5

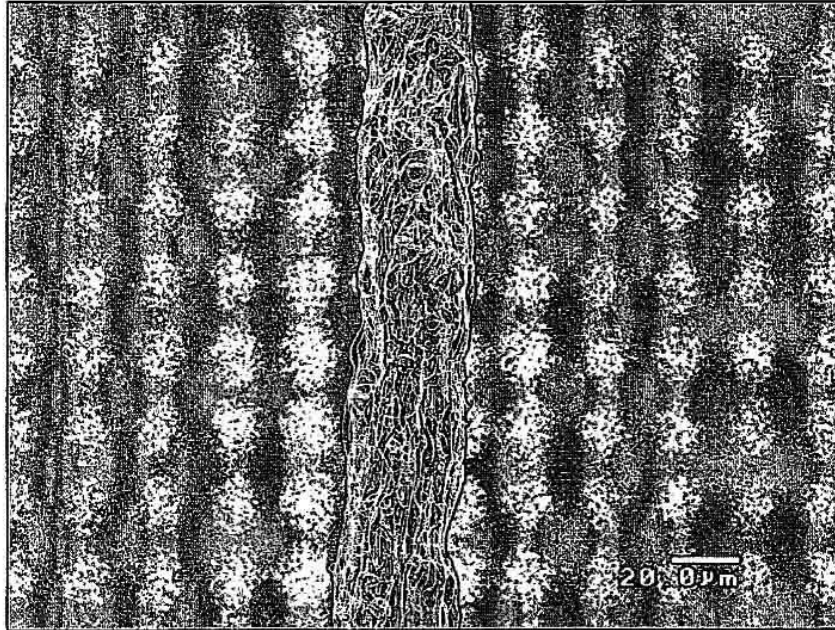


Figura 6

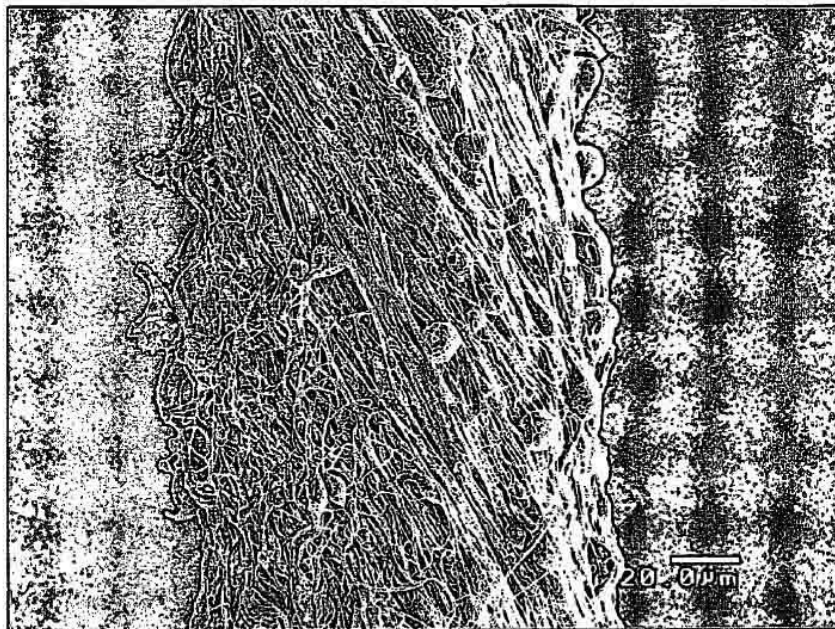


Figura 7

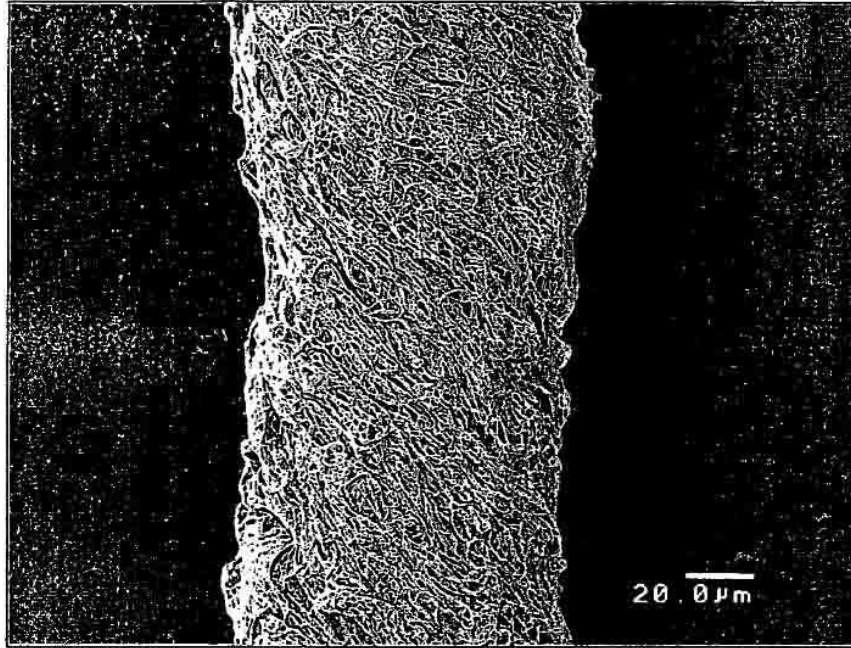


Figura 8

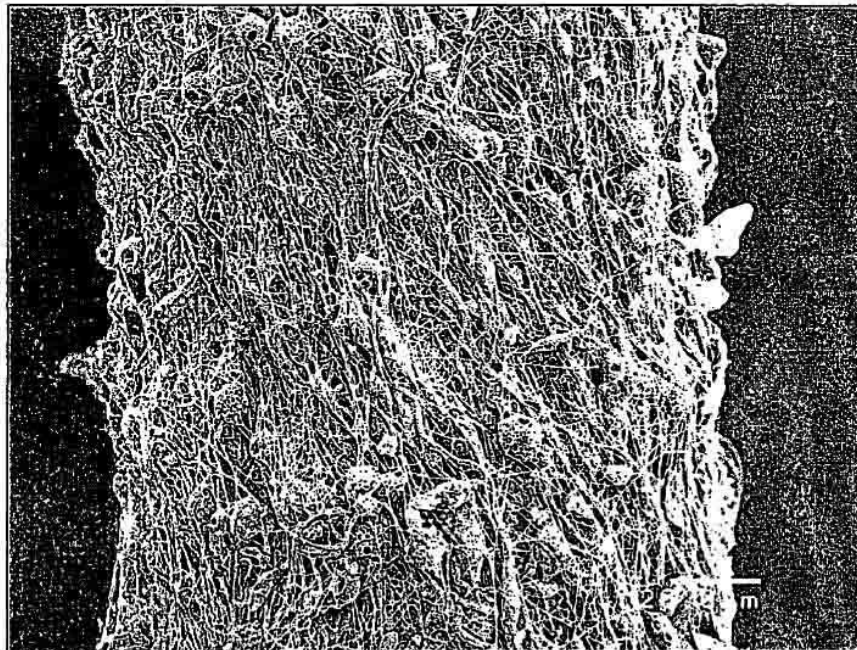


Figura 9

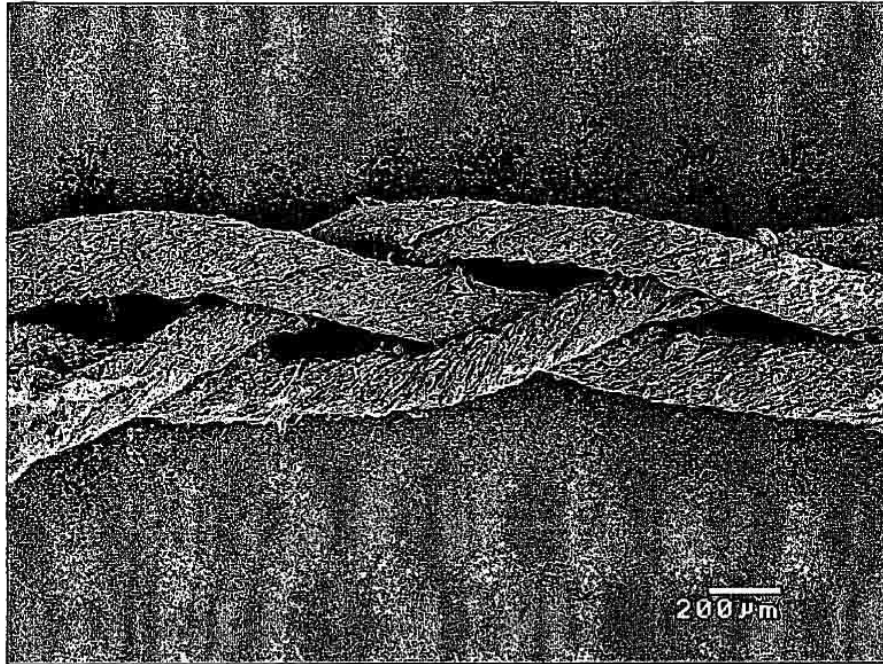


Figura 10

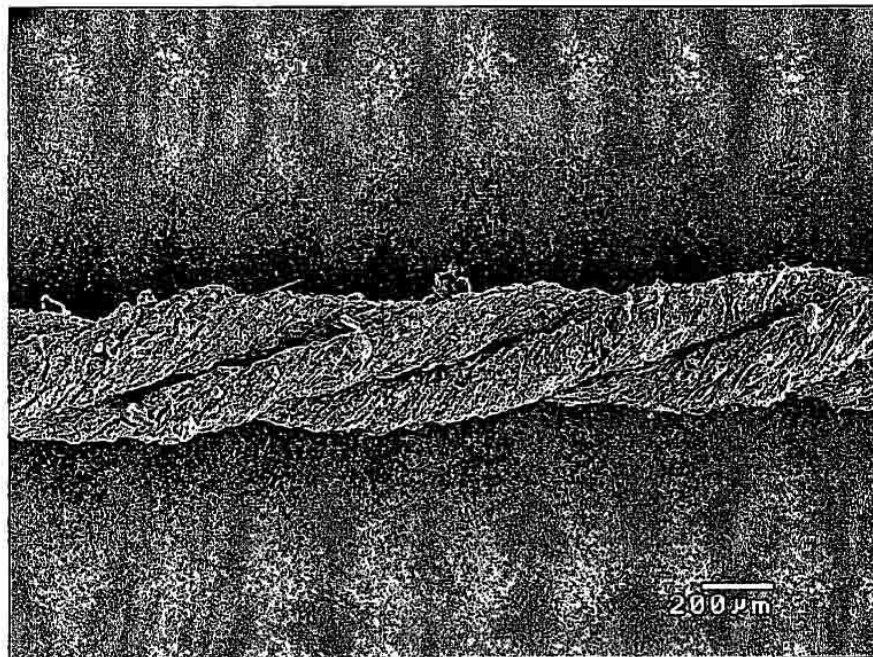


Figura 11

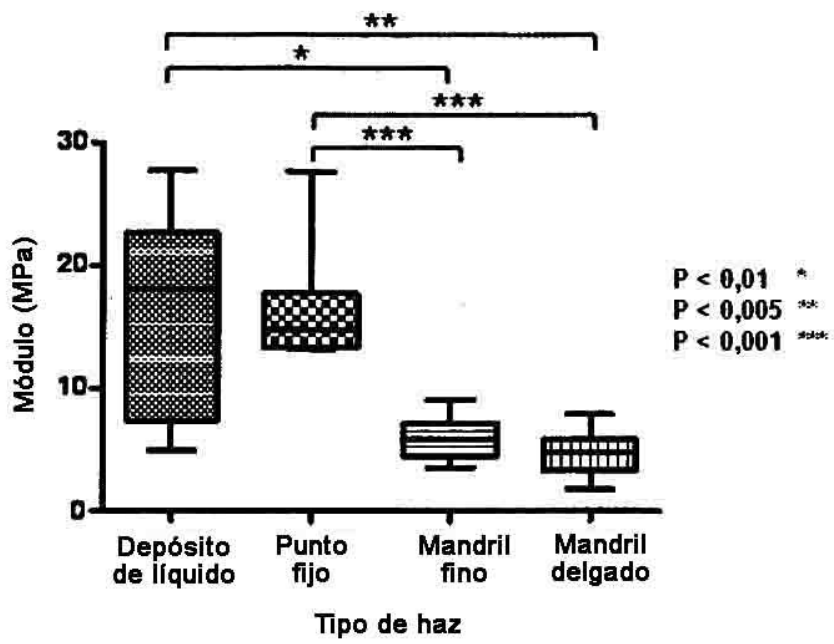


Figura 12

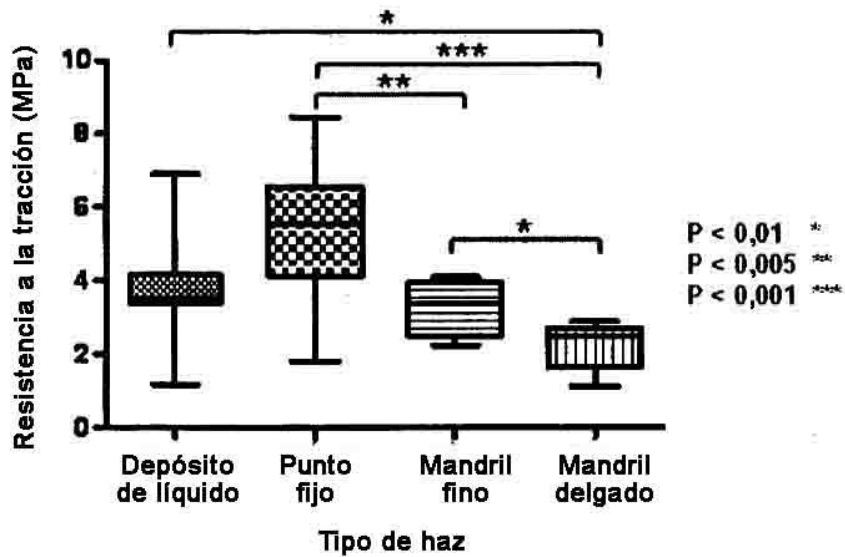


Figura 13

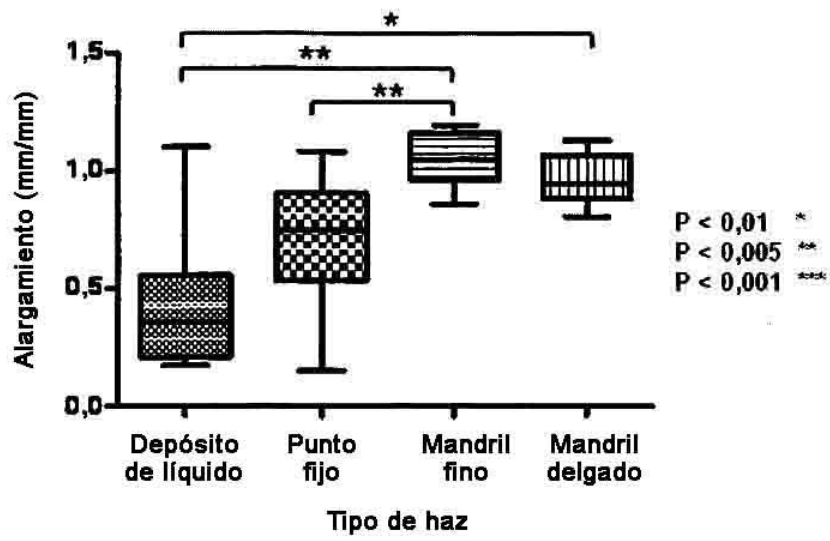


Figura 14

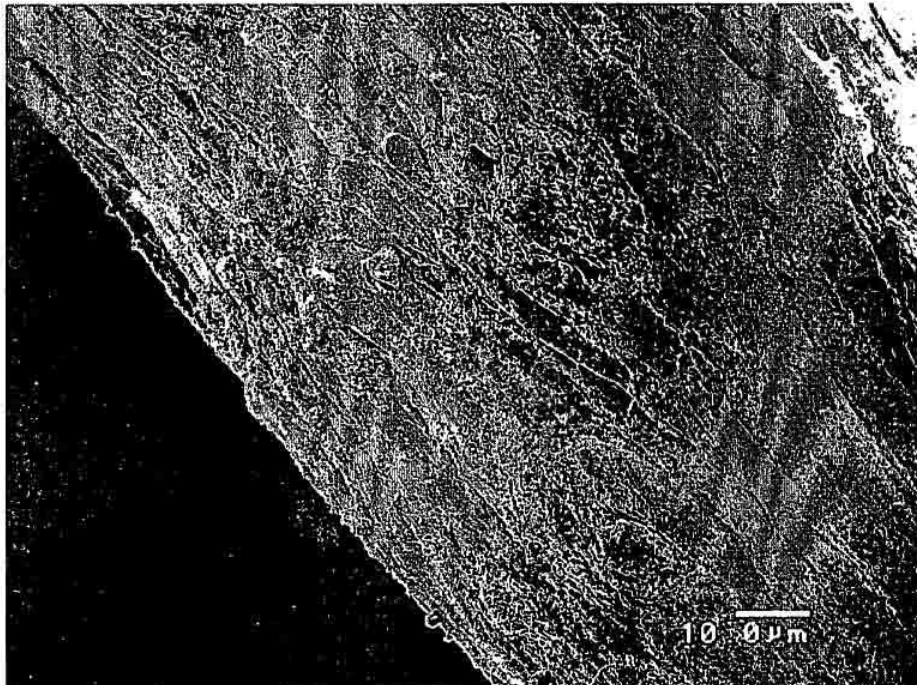


Figura 15

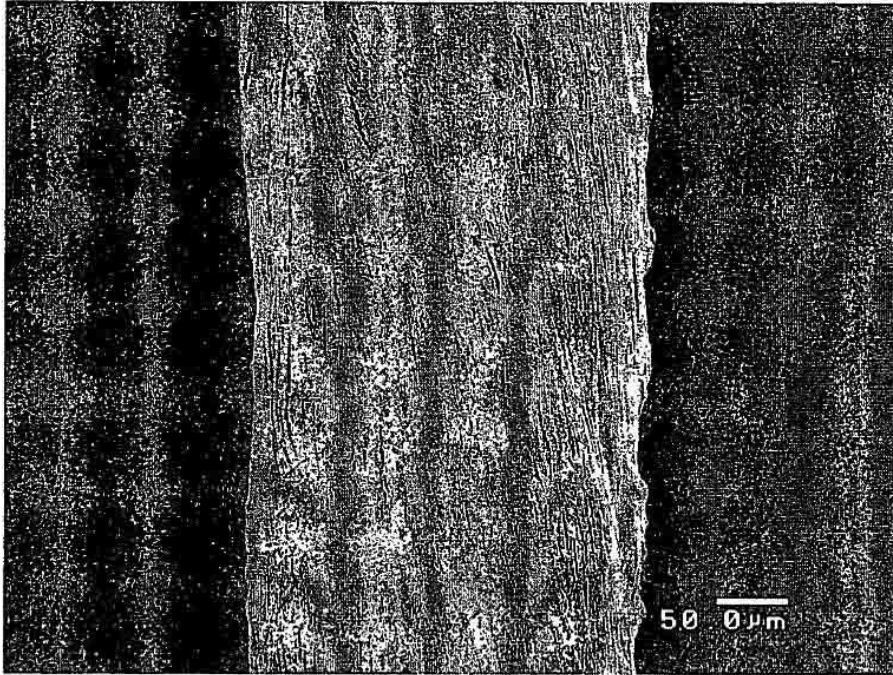


Figura 16

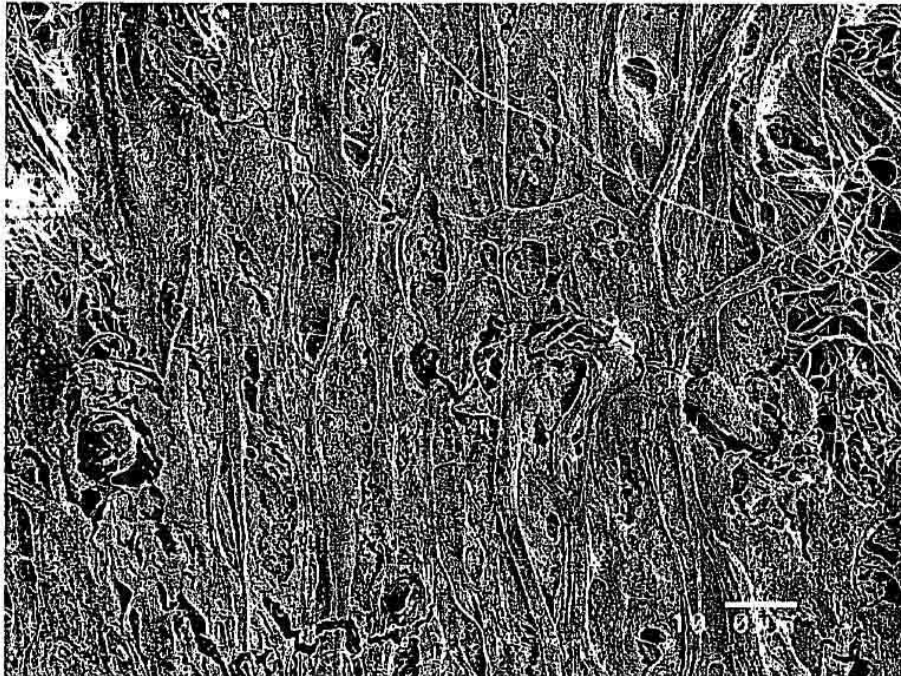


Figura 17

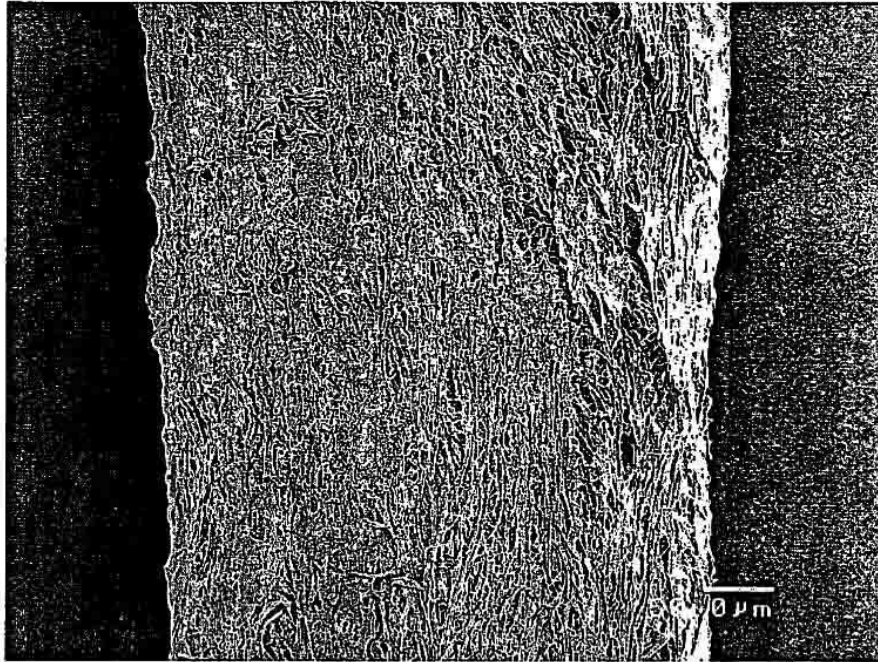


Figura 18

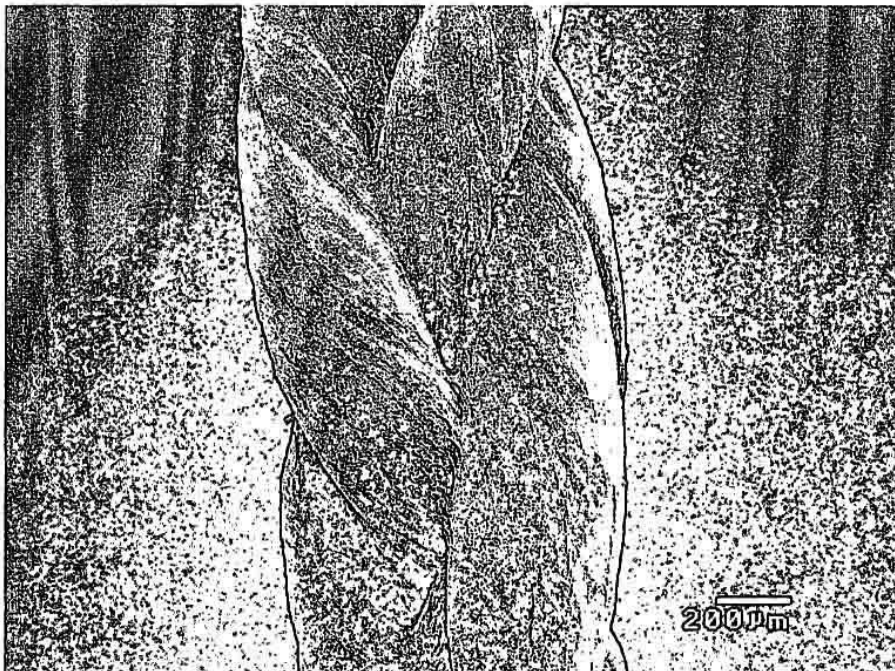


Figura 19

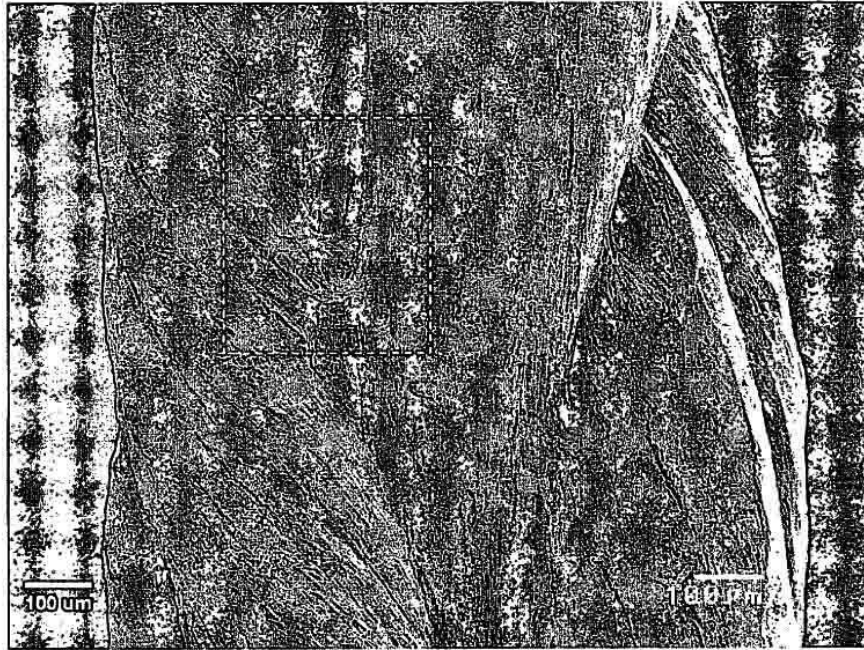


Figura 20

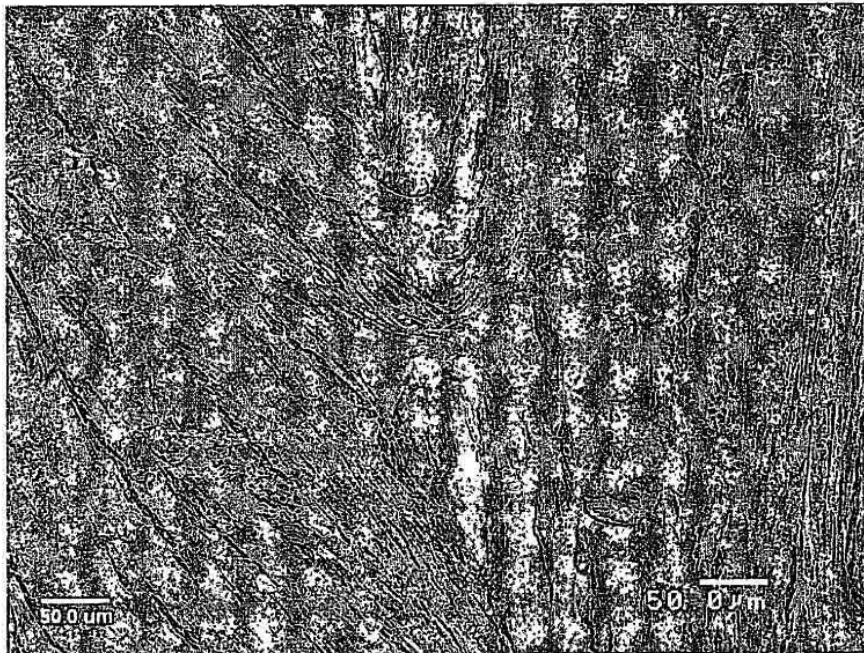


Figura 21

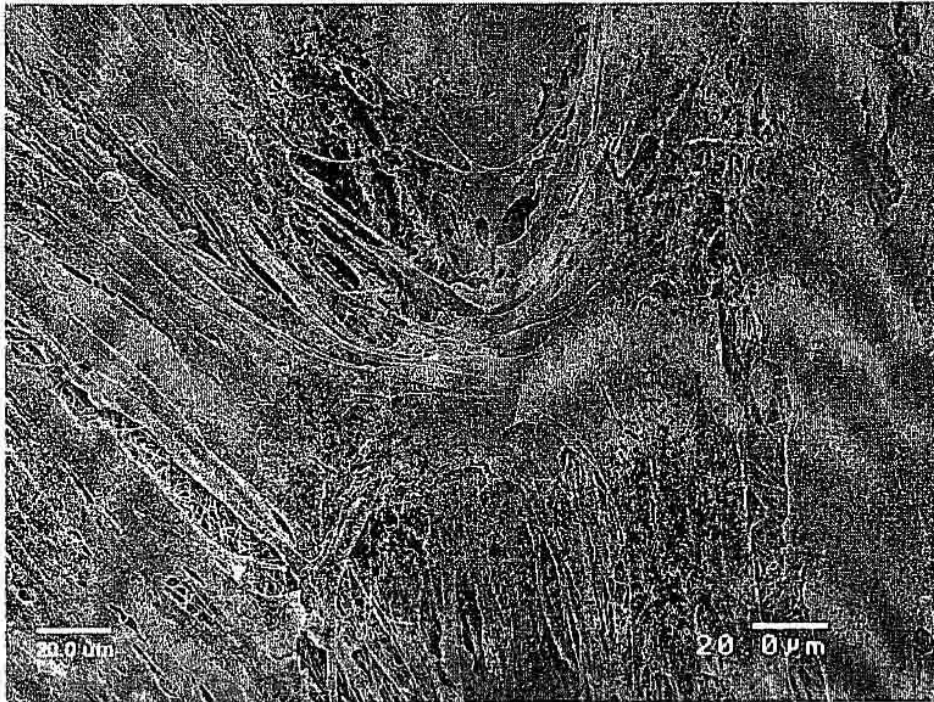


Figura 22

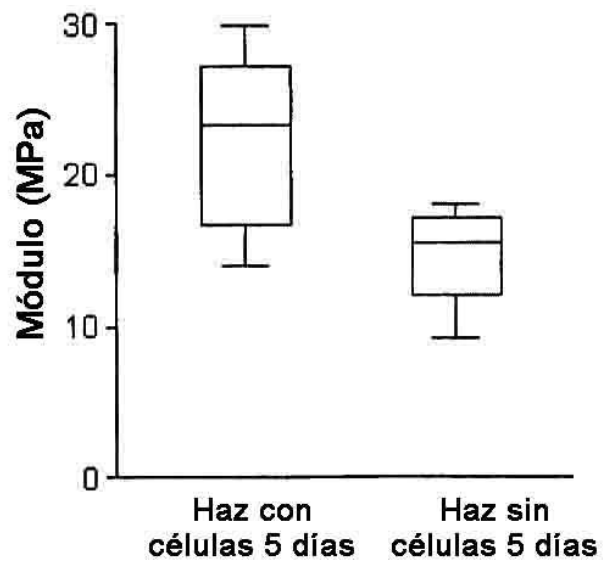


Figura 23

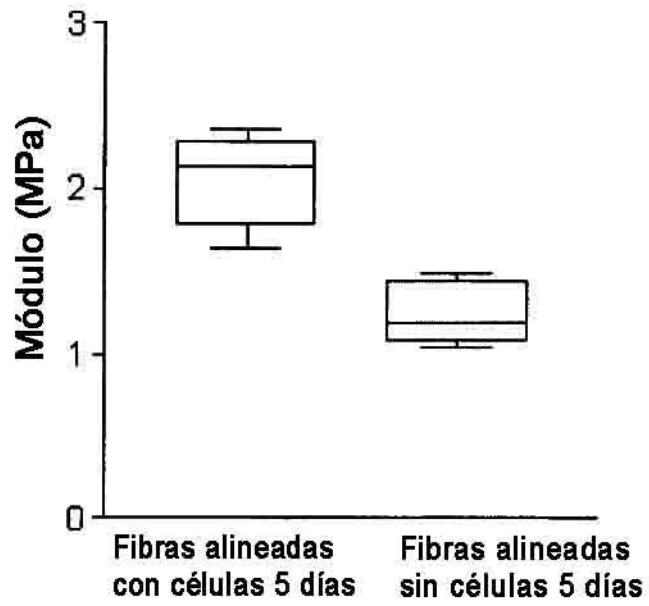


Figura 24

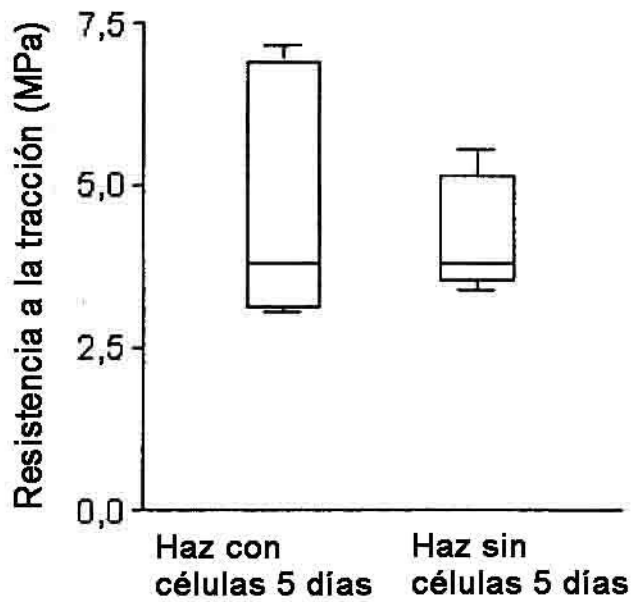


Figura 25

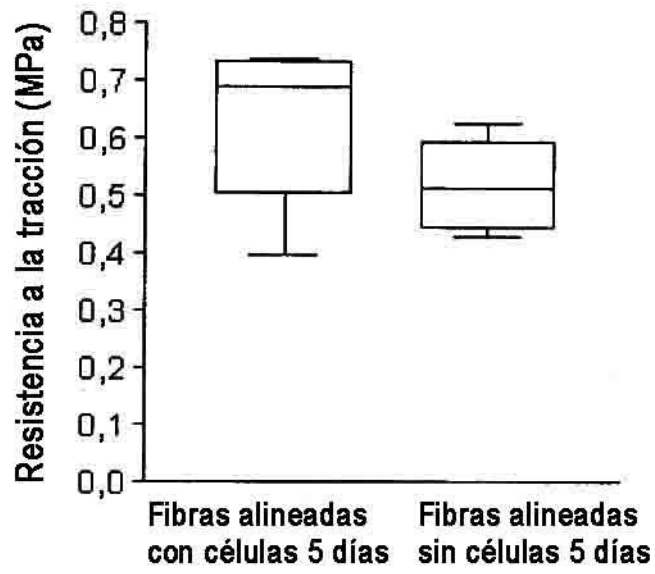


Figura 26

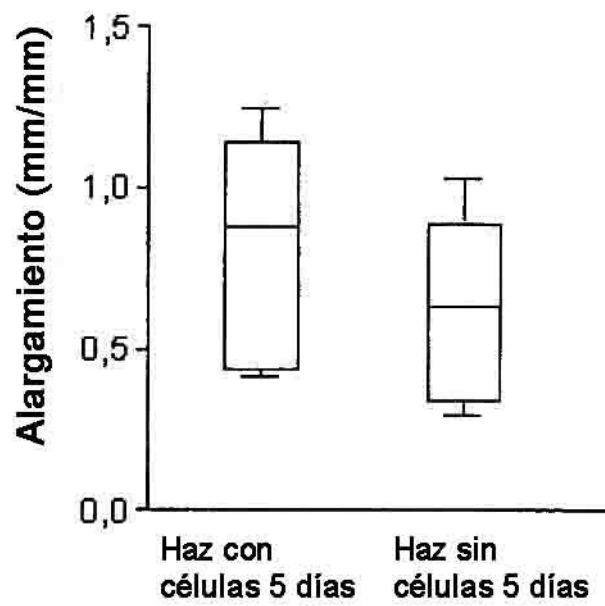


Figura 27

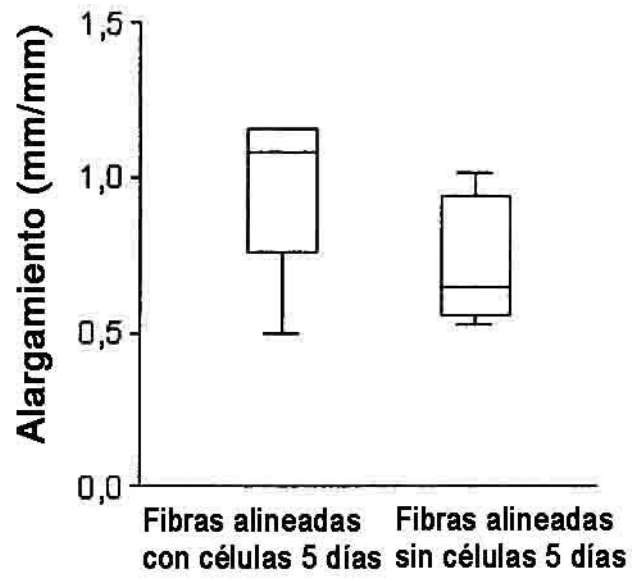


Figura 28

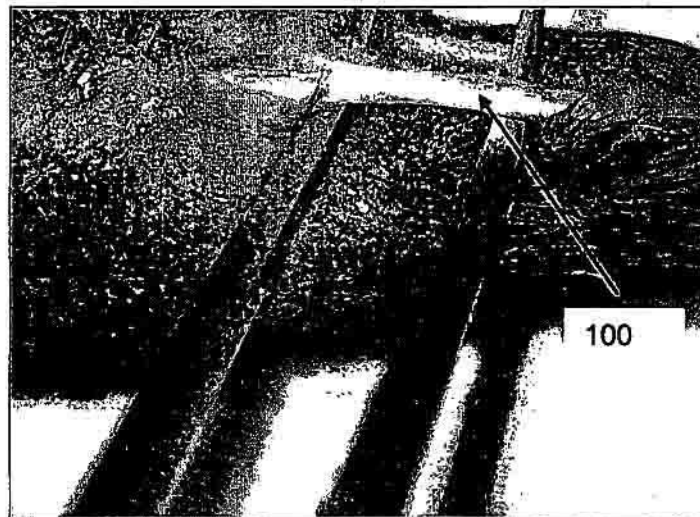


Figura 29

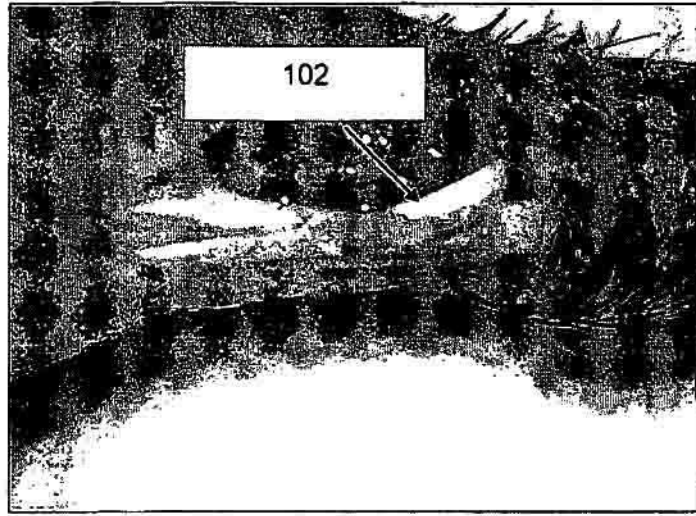


Figura 30

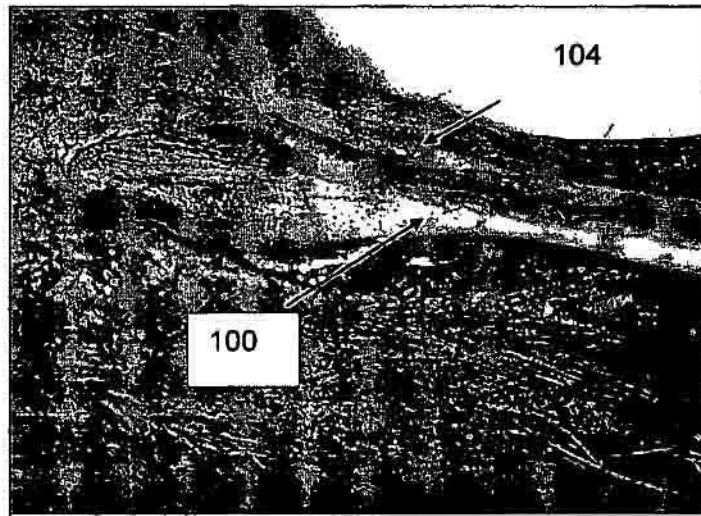


Figura 31

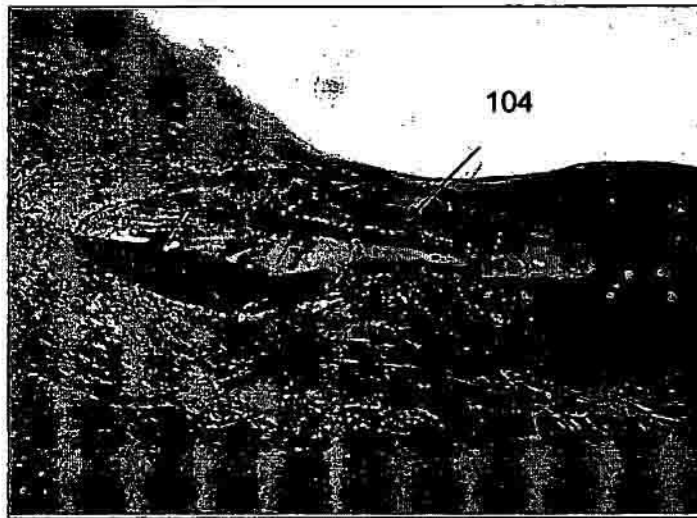


Figura 32

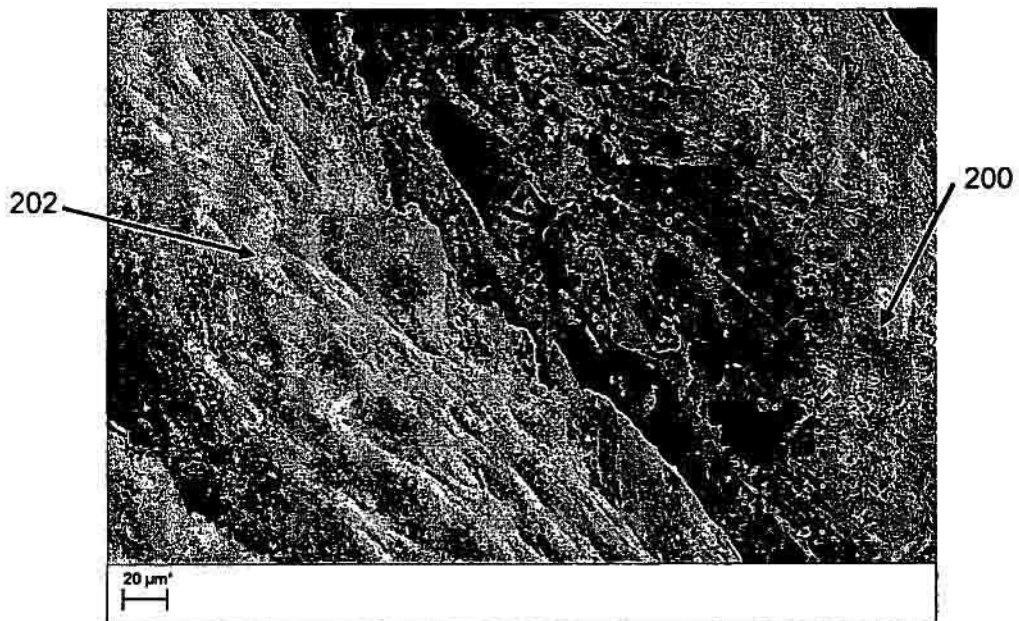


Figura 33

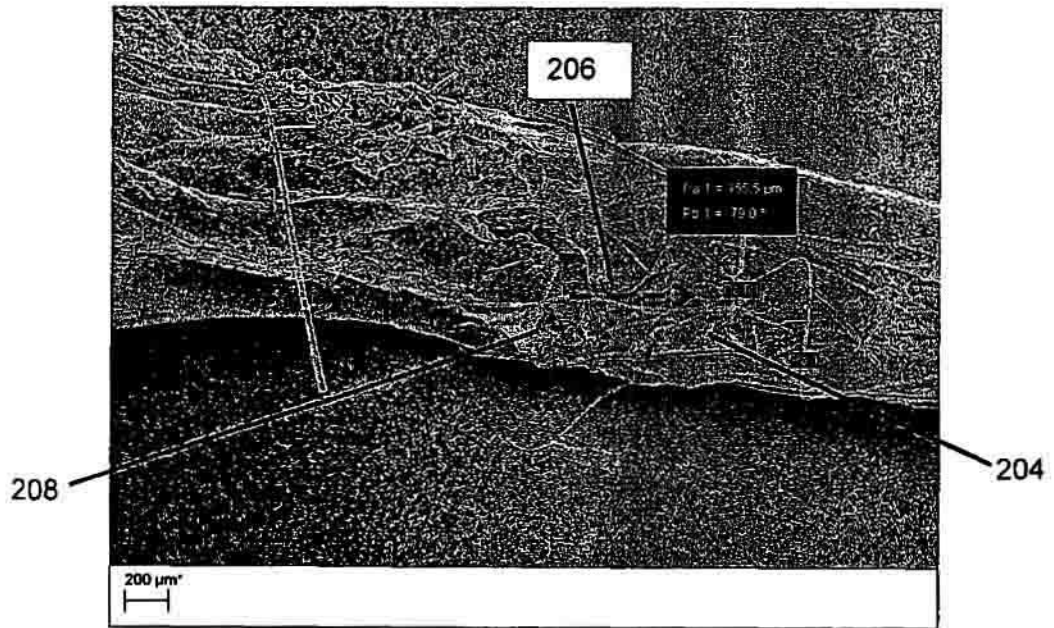


Figura 34

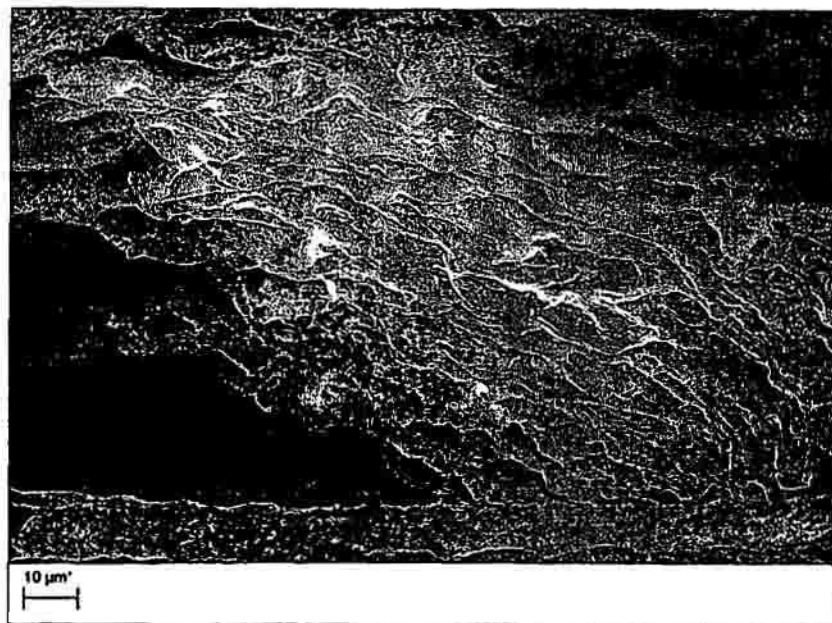


Figura 35

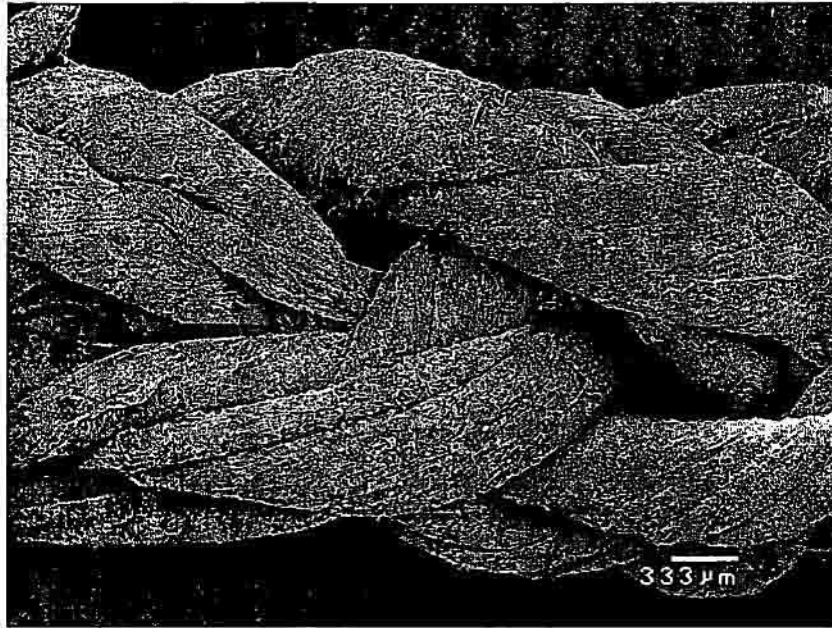


Figura 36

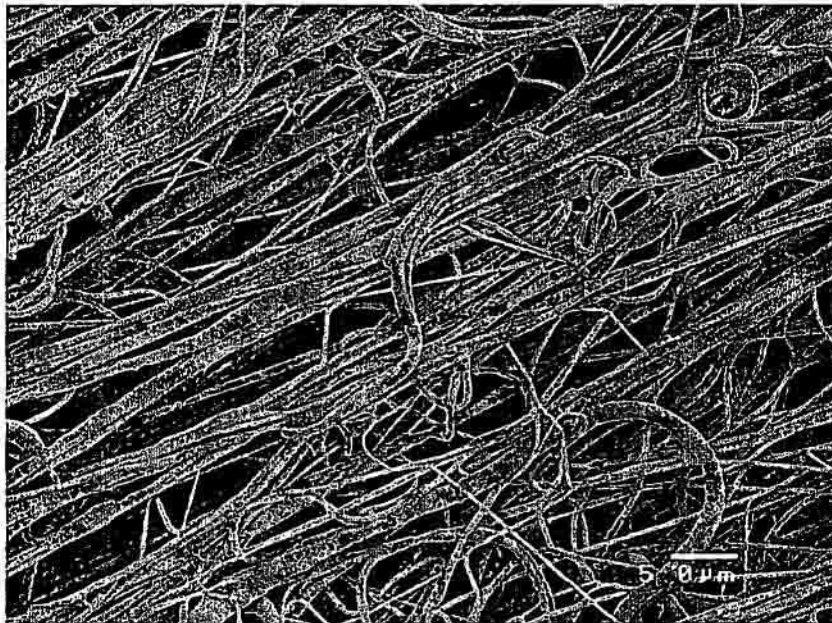


Figura 37

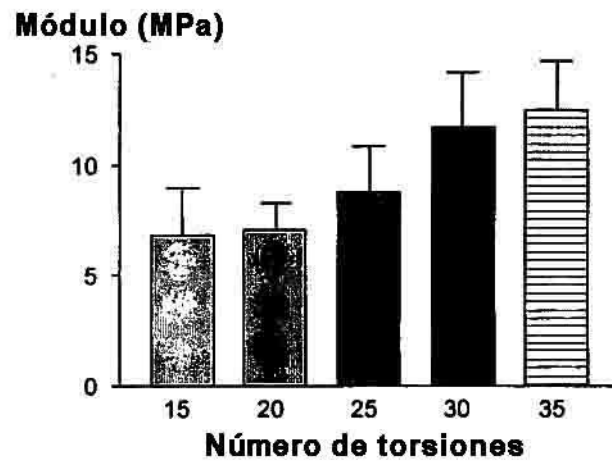


Figura 38

Resistencia a la tracción (MPa)

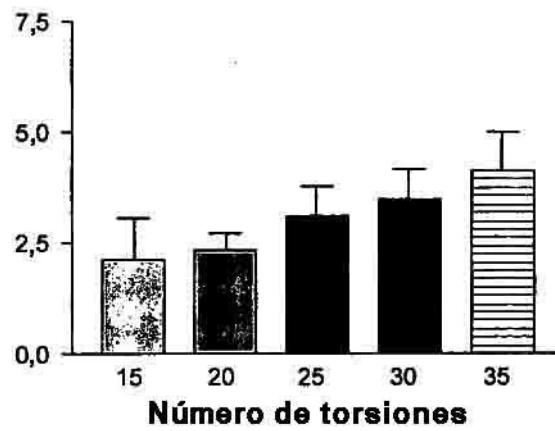


Figura 39

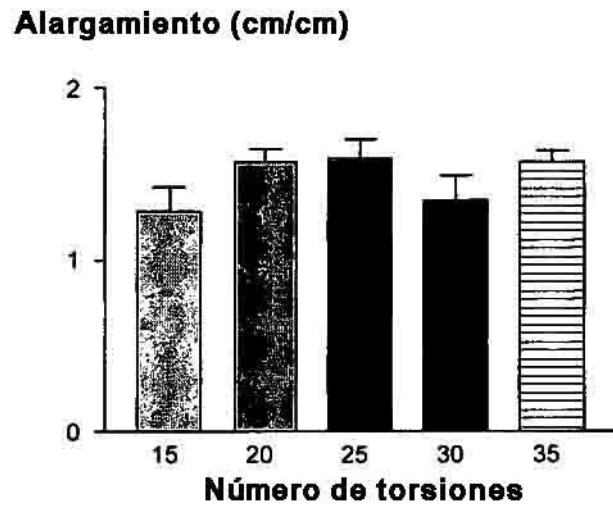


Figura 40