

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 101**

51 Int. Cl.:

D04B 1/14	(2006.01)
D06L 1/12	(2006.01)
D01F 4/02	(2006.01)
D03D 15/00	(2006.01)
D02G 3/44	(2006.01)
A61L 27/22	(2006.01)
A61L 27/58	(2006.01)
D04B 21/16	(2006.01)
D04H 1/42	(2012.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2004 E 11190845 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 2426241**

54 Título: **Dispositivos médicos basados en fibra de seda inmunoneutra**

30 Prioridad:

11.03.2003 US 453584

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

11.10.2013

73 Titular/es:

**ALLERGAN, INC. (50.0%)
2525 Dupont Drive
Irvine, CA 92612, US y
TUFTS UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHEN, JINGSONG;
ALTMAN, GREGORY H.;
HORAN, REBECCA y
HORAN, DAVID**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 425 101 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

Dispositivos médicos basados en fibra de seda inmunoneutra

Antecedentes

5 Las dolencias, el envejecimiento, el desgaste traumatológico o crónico a menudo llevan a fallos en tejidos u órganos. Al tratar tales fallos, el objetivo de muchos procedimientos clínicos es la restauración de la función. Un paciente a menudo requiere mayor apoyo, más allá de los propios medios de curación del cuerpo, tales como cirugía o la implantación de un dispositivo médico. Tales procedimientos solamente se necesitan para combatir la discapacidad permanente e incluso la muerte. Los campos de ingeniería de biomateriales y tejidos están proporcionando nuevas opciones para restaurar gradualmente tejidos nativos y funciones de órganos a través de la búsqueda y el desarrollo de armazones, matrices y construcciones (es decir, dispositivos) temporales que inicialmente apoyen un tejido u órgano discapacitado, pero que finalmente permitan el desarrollo y la reforma del propio tejido biológicamente y mecánicamente funcional del cuerpo.

15 Las responsabilidades o los requisitos de diseño de tal armazón incluyen: (i) la habilidad para proporcionar estabilización mecánica inmediata al tejido dañado o enfermo, (ii) apoyar el crecimiento interno de células y tejidos en el dispositivo, (iii) comunicar el medio mecánico del cuerpo al tejido que se está desarrollando, (iv) degradar a tal nivel que las células y el tejido que están creciendo hacia dentro tengan suficiente tiempo para reformarse, creando de este modo un nuevo tejido funcional autólogo que pueda sobrevivir la vida del paciente. En ciertos casos, el dispositivo debería imitar la correcta estructura tridimensional (por ejemplo, un armazón óseo) del tejido que está intentando sujetar. En otros casos, el dispositivo puede servir como una ligadura temporal (por ejemplo, una malla plana para reparación de hernia o un hemóstato para hemorragia) a un tejido tridimensional (músculo de la pared abdominal en el caso de la hernia). A pesar de la aplicación, la presente dirección del campo del dispositivo médico es la completa restauración de la función corporal a través del apoyo del desarrollo de tejidos autólogos.

25 Desafortunadamente, la mayoría de los biomateriales hoy disponibles no poseen la integridad mecánica de la aplicaciones de alta demanda de carga (por ejemplo, hueso, ligamentos, tendones, músculo) o la apropiada funcionalidad biológica; la mayoría de los biomateriales no se degradan demasiado rápido (por ejemplo, colágeno, ácido poliláctico, ácido poliglicólico o copolímeros relacionados) o no son degradables (por ejemplo, poliésteres, metal), donde en cualquier caso, el tejido funcional autólogo falla al desarrollarse y el paciente sufre invalidez. En ciertos casos, un biomaterial puede emplear mal la diferenciación y el desarrollo de tejidos (por ejemplo, la formación ósea espontánea, tumores) porque carece de biocompatibilidad con las células y el tejido circundante. Así mismo, un biomaterial que falla al degradarse normalmente está asociado con inflamación crónica, donde tal respuesta es realmente perjudicial para (es decir, debilita) el tejido circundante.

35 Si se diseña adecuadamente, la seda puede ofrecer nuevas opciones clínicas para el diseño de una nueva clase de dispositivos médicos, armazones y matrices. La seda ha demostrado tener la mayor fuerza de cualquier fibra natural, y compite con las propiedades mecánicas de fibras sintéticas de alta actuación. Las sedas también son estables a temperaturas fisiológicas altas y en una amplia variedad de pH, y son insolubles en los disolventes más acuosos y orgánicos. La seda es una proteína, más que un polímero sintético, y los productos de degradación (por ejemplo, péptidos, aminoácidos) son biocompatibles. La seda no se deriva de mamíferos y tiene mucha menos biocarga que otros biomateriales naturales comparables (por ejemplo, colágeno derivado de animales bovinos o porcinos).

40 La seda, como el término que es generalmente conocido en la técnica, significa un producto filamentoso de fibra segregado por un organismo tal como un gusano de seda o una araña. Las sedas producidas por insectos, es decir (i) los gusanos de seda *Bombyx mori*, y (ii) las glándulas de arañas, típicamente *Nephilia clavipes*, son las formas del material estudiadas con más frecuencia; sin embargo, de cientos a miles de variantes naturales de seda existen en la naturaleza. La fibroína es producida y segregada por dos glándulas de seda del gusano de seda. Cuando la fibroína sale de las glándulas, se cubre de sericina, una sustancia similar al pegamento. Sin embargo, la seda de araña es apreciada (y diferenciada de la seda del gusano de seda) porque se produce como un único filamento que carece de contaminantes inmunogénicos, tales como sericina.

50 Desafortunadamente, la seda de araña no puede producirse en masa debido a la incapacidad para domesticar arañas; sin embargo, la seda de araña, así como otras sedas pueden clonarse y producirse de manera recombinante, pero con resultados extremadamente variados. A menudo, estos procesos introducen biocargas, y de manera costosa, no pueden producir material en cantidades significativas, dando como resultado propiedades variables del material, y no son rigurosamente controlables ni reproducibles.

55 Como resultado, solamente se ha usado seda de gusano de seda en aplicaciones biomédicas durante más de 1.000 años. La especie *Bombyx mori* de gusano de seda produce una fibra de seda (conocida como una "baba") y usa la fibra para construir su capullo. La baba, cuando se produce, incluye dos filamentos de fibroínas o "broínas", que están rodeados por una capa de goma, conocida como sericina – el filamento de fibroína de la seda posee una significativa integridad mecánica. Cuando las fibras de seda se cosechan para producir hilos o telas, incluyendo suturas, una pluralidad de fibras pueden alinearse juntas, y la sericina se disuelve parcialmente y después se resolidifica para crear una estructura de fibra de seda más grande que tiene más de dos broínas mutuamente

incrustadas en una capa de sericina.

Como aquí se usa, la "fibroína" incluye fibroína de seda (es decir, de *Bombyx mori*) y fibras del tipo fibroína obtenidas de arañas (es decir, de *Nephilia clavipes*). Como alternativa, la proteína de la seda adecuada para su uso en la presente invención puede obtenerse a partir de una solución que contiene una seda producida genéticamente, tal como de bacterias, levadura, células de mamíferos, animales transgénicos o plantas transgénicas. Véase, por ejemplo, el documento WO 97/08315 y la Patente de Estados Unidos N° 5.245.012.

Las fibras de seda de gusano de seda, tradicionalmente disponibles en el mercado comercial para aplicaciones textiles y de sutura, a menudo están "desgomadas" y consisten en múltiples broínas unidas mediante hebras para formar una única fibra más grande de múltiples filamentos. El "desengome" aquí se refiere a la liberación de la capa de sericina que rodea las dos broínas por medio de lavado o extracción en agua caliente con jabón. Tal liberación permite que la unión mediante hebras de broínas cree fibras sencillas más grandes de múltiples filamentos. Sin embargo, la completa extracción a menudo ni se consigue ni se desea. La seda desgomada a menudo contiene o está cubierta de sericina y/o impurezas de sericina se introducen durante la unión mediante hebras con el fin de espesar la fibra sencilla de múltiples filamentos. La capa de sericina protege los filamentos de fibroína delicada (solamente ~5 micrones de diámetro) de deshilarse durante las aplicaciones textiles tradicionales donde se requiere un procesamiento de alto rendimiento. Por lo tanto, la seda desgomada, a menos que se exponga explícitamente como libre de sericina, típicamente contiene 10-26% (por peso) de sericina (véase las Tablas 1 y 2).

Cuando típicamente se hace referencia a la "seda" en el material publicado, se infiere que las observaciones se centran en la "seda" que se da de manera natural y que solamente está disponible (es decir, las fibras de fibroína cubiertas de sericina) que se han usado durante siglos en productos textiles y medicina. La seda de gusano de seda de categoría médica tradicionalmente se usa solamente de dos formas: (i) como sutura de seda virgen, donde la sericina no se ha retirado, y (ii) la sutura tradicional de seda más popular, o comúnmente referida como sutura de seda negra trenzada, donde la sericina se ha retirado completamente, pero se ha sustituido por una capa de cera o silicona para proporcionar una barrera entre la fibroína de seda y el tejido o células del cuerpo. En el presente, la única aplicación médica para la que la seda aún se usa es en ligadura de sutura, particularmente porque la seda aún es apreciada por sus propiedades mecánicas en cirugía (por ejemplo, fuerza de nudo y habilidad manual).

A pesar del uso de la seda virgen como un material de sutura durante cientos de años, la llegada de nuevos biomateriales (colágeno, sintéticos) han permitido las comparaciones entre materiales y han identificado problemas con la sericina. La seda, y más claramente definida como seda de gusano de seda *Bombyx mori*, no es biocompatible. La sericina es antigénica y provoca una fuerte respuesta inmune, alérgica o del tipo de célula hiper T (frente a la respuesta normal leve a "cuerpos extraños"). La sericina puede retirarse (lavarse/extraerse) de la fibroína de la seda; sin embargo, la retirada de sericina de la seda cambia la ultraestructura de las fibras de fibroína, exponiéndolas, y da como resultado la pérdida de fuerza mecánica, llevando a una estructura frágil.

Las estructuras de seda extraída (es decir, hilos, matrices) son especialmente susceptibles de deshilarse y de fallo mecánico durante los procedimientos textiles convencionales debido a la naturaleza de multifilamentos de los filamentos de fibroína de diámetro más pequeño (~5 µm). La fragilidad de la fibroína extraída es la razón por la que cuando se usa seda en el diseño y desarrollo de dispositivos médicos, tras la extracción, típicamente se enseña (Pérez-Rigueiro, J. Appl. Polymer Science, 70, 2439-2447, 1998) que se debe disolver y reconstituir la seda usando métodos convencionales (Patente de Estados Unidos N° 5.252.285) para conseguir un biomaterial con el que se pueda trabajar. La incapacidad para manipular fibroína de seda extraída con métodos y maquinaria textiles de hoy en día ha prevenido que el uso de fibroína no disuelta libre de sericina no se haya explorado como un dispositivo médico.

Las limitaciones adicionales de la fibroína de la seda, ya se haya extraído de seda de gusano de seda, disuelto y reconstituido, o producido a partir de arañas o insectos diferentes a los gusanos de seda incluyen (i) la naturaleza hidrófoba de la seda, un resultado directo de la conformación de cristal de beta-lámina de la proteína de la fibroína núcleo que da a la seda su fuerza, (ii) la falta de dominios de enlace celular que típicamente se encuentran en proteínas mamíferas de matriz extracelular (por ejemplo, la secuencia peptídica RGD), y (iii) la superficie suave de la fibroína de la seda. Como resultado, las células (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos) asociadas a una respuesta inflamatoria y del tejido del huésped son incapaces de reconocer la fibroína de la seda como un material capaz de degradación. De este modo, estas células optan por encapsular y separar con un muro el cuerpo extraño (véase la Fig. 18A) limitando de este modo (i) la degradación de la fibroína de la seda, (ii) el crecimiento interno del tejido, y (iii) la reforma del tejido. De este modo, los filamentos de fibroína de la seda con frecuencia inducen una fuerte respuesta a cuerpos extraños (RCE) que está asociada a inflamación crónica, un granuloma periférico y encapsulación cicatrizal (Fig. 18A).

Además de las ventajas biológicas de la seda, la naturaleza de múltiples filamentos de la seda (por ejemplo, como suturas) así como el tamaño pequeño de los filamentos de fibroína puede llevar a una estructura muy comprimida. Como tal, la seda puede degradarse demasiado rápido. Las proteasas (enzimas) producidas desde las células estimuladas encontradas dentro de la encapsulación periférica pueden penetrar en la estructura implantada (véase la Fig. 11A y la Fig. 11B), pero las células que depositan el nuevo tejido (por ejemplo, fibroblastos) que pueden reforzar el dispositivo (en este caso una sutura negra trenzada) durante la reforma de tejido normal no pueden. Por

lo tanto, el interior de los dispositivos de fibroína no tratada o no modificada no pueden entrar en contacto con la respuesta a cuerpos extraños del huésped y con el tejido (llevado y producido por los fibroblastos) y como resultado, la capacidad del dispositivo para dirigir la reforma del tejido es limitada. El crecimiento celular y del tejido del huésped no está limitado y la degradación normalmente no es posible.

5 En el caso de sutura, se piensa que estos problemas pueden controlarse tratando suturas de fibroína con agentes cruzados o cubriendo las suturas con cera, silicona o polímeros sintéticos, protegiendo de este modo el material del cuerpo. Las capas, tales como sericina, cera o silicona, diseñadas para añadir estabilidad mecánica a la fibroína (combatiendo su fragilidad mientras se proporciona una barrera entre el cuerpo y la fibroína), limitan la unión de células, el reconocimiento y la infiltración y el crecimiento interno de tejido y la degradación de fibroína. Como resultado, tradicionalmente se piensa que la seda es un material no degradable.

10 La clasificación como no degradable puede ser deseable cuando la seda se pretende usar como un dispositivo de ligadura de sutura tradicional, es decir, no se desea el crecimiento interno de la célula y tejido en el dispositivo. Por lo tanto, la unión celular y el crecimiento interno (que llevan a la degradación de la matriz y a la reforma del tejido activo) tradicionalmente se previenen mediante la naturaleza biológica de la seda y el diseño mecánico de la estructura. De hecho, una creencia general de que la seda debe protegerse del sistema inmune y la percepción de que la seda no es biodegradable han limitado el uso de la seda en cirugía. Incluso en el campo de suturas, la seda ha sido sustituida en la mayoría de las aplicaciones por otros materiales sintéticos, ya sean biodegradables o permanentes.

20 Los documentos US 5849040 y US 6302922 describen un proceso para la fabricación de una tela tejida o tricotada para su uso en ropa textil usando seda cruda fijada con sericina.

El documento US 5598615 se refiere a una tela formada a partir de seda que está tratada para proporcionar viscosidad, por ejemplo usando vapor por encima de la temperatura a la que la proteína de la seda se desnaturaliza.

El documento US 6175053 describe un material para apósitos en el que las fibras de la seda están disueltas y reconstituidas.

25 Por lo tanto, existe una necesidad de generar fibras de fibroína de gusano de seda a las que se ha extraído la sericina que sean biocompatibles, estimulen el crecimiento interno de las células y sean biodegradables.

Resumen

30 Las construcciones de fibra desveladas en el presente documento ofrecen una combinación de elevada fuerza, extensa vida de fatiga y rigidez y alargamiento en propiedades de rotura que coinciden bastante con las de los tejidos biológicos. Las fibras en las construcciones están alineadas de manera no-arbitraria en uno o más hilos. Las construcciones de fibra son biocompatibles (debido a la extracción de sericina de las fibras de seda del gusano de seda) y están sustancialmente libres de sericina. Las construcciones de fibra son además no inmunogénicas; es decir, no provocan una respuesta sustancial alérgica, antigénica o de célula hiper T del huésped, reduciendo el efecto perjudicial sobre los tejidos biológicos circundantes, tales como aquellos que pueden acompañar las respuestas del sistema inmune en otros contextos. Además, las construcciones de fibra estimulan el crecimiento interno de las células alrededor de dichas fibras de fibroína y son biodegradables.

40 Las indicaciones de que la construcción de fibra está “sustancialmente libre” de sericina significan que la construcción de fibra comprende menos del 20% de sericina por peso. Preferentemente, la construcción de fibra comprende menos del 10% de sericina por peso. Más preferentemente, la construcción de fibra comprende menos del 1% de sericina por peso (véase Tabla 2). Además, “sustancialmente libre” de sericina puede definirse funcionalmente como un contenido de sericina que no provoca una respuesta sustancial alérgica, antigénica o de célula hiper T del huésped. De la misma manera, la indicación de que hay menos de un 3% de cambio en masa después de una segunda extracción implicaría que la primera extracción “retiró sustancialmente” la sericina de la construcción y que la construcción resultante estuvo “libre sustancialmente” de sericina después de la primera extracción (véase la Tabla 2 y la Fig. 1F).

50 Los métodos de esta divulgación extraen sericina de la construcción mucho más a fondo que los procedimientos típicos de “desengome” que caracterizan las prácticas tradicionales de procesamiento para la producción de productos textiles de seda para aplicaciones no quirúrgicas (véase arriba la definición). La Figura 1A muestra una imagen de una fibra desgomada donde los filamentos de fibroína se unieron mediante hebras formando una fibra más grande recubierta de sericina. Este fibra “desgomada” contiene ~26%, por peso, de sericina. En una realización preferente, estas fibras de fibroína de gusano de seda a las que se extrajeron la sericina retienen su estructura proteica nativa y no se han disuelto ni reconstituido.

55 Las fibras de fibroína de seda “natural” están producidas por un insecto, tal como un gusano de seda o una araña y poseen su estructura proteica nativa, como está formada. Preferentemente, las construcciones de fibra de fibroína de seda son no-recombinantes (es decir, no se producen genéticamente) y no se han disuelto ni reconstituido. En una realización preferente, las fibras de fibroína a las que se extrajeron la sericina comprendían fibras de fibroína obtenidas a partir del gusano de seda Bombyx mori. Además, el término “biodegradable”, aquí se usa para querer

decir que las fibras se degradan en un año cuando están en contacto continuo con un tejido corporal. Además, nuestros datos sugieren (Figs. 13 A-E, Figs. 18 A-C y Figs. 19 A-D) que la velocidad de la degradación pueden estar influenciada y aumentada por la modificación de la superficie de la fibroína (Figs. 13 A-D y Figs. 18 A-C) así como por la configuración geométrica del hilo y/o tejido (Fig. 19A-D). En una realización, el hilo de fibroína de seda perdió el 50% de su fuerza máxima de tracción en un periodo de dos semanas tras la implantación in vivo (Fig. 12) y el 50% de su masa en un periodo de aproximadamente 30 a 90 días in vivo, dependiendo del área de implantación (Fig. 13 Ha-D). La elección del área de implantación in vivo (por ejemplo, intramuscular frente a subcutánea) demostró influenciar significativamente la velocidad de degradación (Figs. 13 A-D).

La "seda de categoría textil" es seda que se produce de manera natural que incluye una capa de sericina de más del 19%-28% por peso de la fibra. La "seda de sutura" es seda que contiene sericina ("sutura de seda virgen") o que está cubierta con una composición hidrófoba, tal como cera de abeja, cera de parafina, silicona o una capa polimérica sintética ("sutura de seda trenzada"). La composición hidrófoba repele las células o inhibe la unión de las células con la fibra cubierta. La seda negra trenzada es una seda de sutura en la que se ha extraído la sericina y se ha sustituido por una capa adicional. La seda de sutura es típicamente no-biodegradable.

Debido a la ausencia de una cera protectora u otra capa hidrófoba sobre las fibras las construcciones de fibroína de seda descritas están diseñadas biológicamente (unión de los dominios de enlace celular) y/o mecánicamente (incremento del área de seda y disminución de la densidad de empaquetamiento) para estimular mayor infiltración celular en comparación con la seda de categoría textil o la seda de sutura cuando se implanta en el tejido corporal. Como resultado, las construcciones de fibroína de seda soportan el crecimiento interno/infiltración celular y la unión y expansión celular mejoradas, lo que lleva a la degradación de la construcción de fibroína de seda creando esencialmente de este modo un nuevo biomaterial biodegradable para su uso en un dispositivo médico y en aplicaciones de ingeniería de tejidos. La habilidad de la construcción de fibra para soportar la unión celular y el crecimiento interno/infiltración de las células y tejidos en la construcción, que a su vez soporta la degradación, pueden además mejorarse por medio de la modificación de la superficie de la fibroína (enlace peptídico usando RGD, modificación química de especies y aumentando la hidrofiliidad a través de tratamiento con plasma de gas) y/o el diseño mecánico de la construcción incrementando de este modo la área de superficie y de este modo incrementando su susceptibilidad a aquellas células y enzimas que poseen la habilidad de degradar la seda. Las fibras de seda están opcionalmente cubiertas por una composición hidrófila, por ejemplo, colágeno o una composición peptídica, o combinadas mecánicamente con un biomaterial que soporta el crecimiento interno de las células y tejidos para formar una estructura compuesta. La elección del biomaterial, la cantidad y la interacción mecánica (por ejemplo, envuelto o trenzado alrededor de un núcleo de fibroína de seda) puede usarse para alterar y/o mejorar las velocidades del crecimiento interno celular y la degradación de las construcciones.

Las fibras en las construcciones están alineadas unas con otras de manera no arbitraria en uno o más hilos. Tal estructura puede ser en paralelo, trenzada, texturizada u organizada helicoidalmente (con una disposición de enrollado, cableado (por ejemplo, cuerda metálica)) para formar un hilo. Un hilo puede definirse por consistir al menos en una fibra de fibroína. Preferentemente, un hilo consiste al menos en tres fibras alineadas de fibroína. Un hilo es un montaje de fibras enrolladas o de otra manera unidas juntas en una hebra continua. Puede generarse un número casi infinito de hilos a través de varios medios de producir y combinar fibras. Una fibra de seda se ha descrito anteriormente; sin embargo, el término fibra es un término genérico que indica que la estructura tiene una longitud 100 veces más grande que su diámetro.

Cuando las fibras se enrollan o de otra manera se entrelazan para formar un hilo, se enrollan/entrelazan lo suficiente para esencialmente cerrarse en las posiciones relativas de fibra y retirarse flojas pero no tanto como para deformar plásticamente las fibras (es decir, no exceden el límite de elasticidad del material), que comprende su vida de fatiga (es decir, reduce el número de ciclos de tensión antes del fallo). Las construcciones de fibra de fibroína libre de sericina pueden tener una fuerza máxima de tracción seca (UTS) de al menos 0,52 N/fibra (Tabla 1, 4), y una rigidez entre aproximadamente 0,27 y aproximadamente 0,5 N/mm por fibra. Dependiendo de la organización y la jerarquía de las fibras, hemos mostrado que las fuerzas máximas de tracción de la construcción de fibroína pueden oscilar entre aproximadamente 0,52 N/fibra y aproximadamente 0,9 N/fibra. Las construcciones de fibra aquí descritas retuvieron aproximadamente el 80% de su fuerza máxima de tracción seca y aproximadamente el 38% de su rigidez seca, cuando se testaron mojadas (Tabla 5). Los alargamientos de rotura entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 50% fueron típicos para las construcciones de fibroína testadas en estados tanto secos como mojados. Las construcciones de fibroína típicamente produjeron en aproximadamente del 40 al 50% de sus fuerzas máximas de tracción y tuvieron una vida de fatiga de al menos 1 millón de ciclos en una carga de aproximadamente 20% de la fuerza máxima de tracción de los hilos.

En una realización de la presente invención, las fibras alineadas de fibroína de gusano de seda a las que se les extrajeron la sericina están enrolladas unas con otras en 0 a 11,8 rollos por cm (véanse las Tablas 6 y 7).

El número de jerarquías en la estructura geométrica de la construcción de fibra así como el número de fibras/grupos/paquetes/hebras/cuerdas dentro de un nivel jerárquico, la manera de entrelazarse en los diferentes niveles, el número de niveles y el número de fibras en cada nivel pueden todos variarse para cambiar las propiedades mecánicas de la construcción de fibra (es decir, el hilo) y por lo tanto, la tela (Tabla 4 y 8). En una realización de la presente invención, la construcción de fibra (es decir, el hilo) está organizada en una organización

jerárquica de un único nivel, comprendiendo dicha organización jerárquica de un único nivel un grupo de hilos paralelos o entrelazados. Como alternativa, la construcción de fibra (es decir, hilo) está organizada en una organización jerárquica de dos niveles, comprendiendo dicha organización jerárquica de dos niveles un paquete de grupos entrelazados. En otra realización de la presente invención, la construcción de fibra (es decir, hilo) está organizada en una organización jerárquica de tres niveles, comprendiendo dicha organización jerárquica de tres niveles una hebra de grupos entrelazados. Finalmente, otra realización de la presente invención, la construcción de fibra (es decir, hilo) está organizada en una organización jerárquica de cuatro niveles, comprendiendo dicha organización jerárquica de cuatro niveles una cuerda de hebras entrelazadas.

La sericina puede retirarse de las fibras de fibroína antes de la alineación en una hebra o en un nivel más alto en la geometría jerárquica de la construcción de fibra. La hebra se manipula a tensión baja (es decir, la fuerza aplicada a la construcción nunca excederá el límite de elasticidad durante ninguna etapa del procesamiento) y con general cuidado y delicadeza después de que se haya retirado la sericina. El equipo del procesamiento está configurado de la misma manera para reducir la abrasión y los ángulos afilados en partes integrantes guías que entran en contacto o dirigen el hilo durante el procesamiento para proteger las fibras frágiles de fibroína del daño; los tiempos de residencia de extracción de 1 hora son suficientes para extraer la sericina pero son lo suficientemente lentos como para no dañar los filamentos expuestos. De manera interesante, cuando una construcción de fibra de seda que consiste en múltiples fibras organizadas en paralelo se ha extraído bajo estas condiciones, resultó un "único" hilo más grande libre de sericina (es decir, las fibras individuales no se pueden separar echadas hacia atrás de la construcción debido a la interacción mecánica entre los filamentos de fibroína más pequeños una vez expuestos durante la extracción). Además, como resultado de la interacción mecánica entre los microfilamentos libres de sericina, la extracción de los hilos enrollados o cableados típicamente ha dado como resultado hilos y estructuras menos "animados". Como resultado de este fenómeno, existió un mayor grado de flexibilidad en el diseño de los hilos y las telas resultantes; por ejemplo, pueden usarse niveles de mayor giro por pulgada (TPI), que normalmente crearían hilos animados que serían difíciles de formar telas. El beneficio añadido de los mayores giros por pulgada fue la reducción en rigidez de hilo y tela (es decir, la elasticidad de la matriz puede incrementarse) (Tablas 6 y 7; Fig. 6A y Fig. 6B).

Una pluralidad de hilos se entrelazan para formar una tela. Las telas se generan a través de la unión de uno más hilos individuales por los que los hilos individuales se transforman en telas para dispositivos médicos y textiles. En una realización de la presente invención, el hilo se enrolla a o por debajo de 30 giros por pulgada. Las telas se producen o forman combinando hilos de manera no arbitraria: tejiendo, tricotando o cosiendo por cadeneta para producir tejidos completados. En una realización, esta combinación de hilos para formar una tela se realiza en una máquina. Sin embargo, es muy importante señalar que el producto final de tela es distinto en base al tipo de hilo usado para hacerlo proporcionando de este modo una enorme fuerza a través del diseño del hilo para cumplir las necesidades clínicas. Una tela puede estar, aunque no se limita a, tejida, tricotada, tricotada con urdimbre, reconstituida, tejida con telar de Jacquard, laminada, con malla o combinaciones de los mismos.

Cabe destacar que los métodos textiles de trenzado, además de hacer hilos, también pueden usarse para hacer telas, tales como tela trenzada plana o una trenza circular más grande (Fig. 4A). Por el contrario, tejer y tricotar, dos métodos de formar telas, aunque no se usan comúnmente, pueden también usarse para hacer hilos. En tales casos, la diferenciación entre "hilo" y "tela" no es completamente aparente, y debería usarse la homogeneidad para hacer claras distinciones, es decir, un hilo es típicamente más homogéneo en composición y estructura que una tela.

En una realización de la presente invención, múltiples fibras de seda de gusano de seda pueden estar organizadas helicoidalmente (por ejemplo, enrolladas o cableadas) o en paralelo, en un único nivel jerárquico o en múltiples niveles jerárquicos, pueden extraerse y usarse para crear una sutura trenzada para ligadura de tejido. En otra realización, la interacción mecánica de los filamentos de fibroína extraídos en una configuración enrollada o cableada tras la extracción puede usarse como una sutura médica.

Las telas no tejidas pueden estar formadas organizando arbitrariamente una pluralidad de hilos, o un único hilo cortado en muchas piezas de pequeña longitud. Los ejemplos no limitativos incluyen una tela para hemóstato o armazón óseo. Todas las telas pueden derivar de una construcción de un único hilo (homogénea) o de construcciones de múltiples hilos (heterogéneas). La habilidad para diseñar una variedad de estructuras de hilo de fibroína de seda, como se describe con detalle más adelante, aumenta de manera espectacular el potencial del diseño de la tela cuando se considera una estructura heterogénea de tela.

En una realización de la presente invención, la tela es un compuesto de las fibras o hilos de fibroína a las que se ha extraído sericina y uno o más polímeros degradables seleccionados del grupo consistente en Colágenos, ácido Poliláctico o sus copolímeros, ácido Poliglicólico o sus copolímeros, Polianhídridos, Elastina, Glicosaminoglicanos y Polisacáridos. Además, la tela de la presente invención puede estar modificada para comprender un fármaco asociado con un factor de unión celular asociado con la tela (por ejemplo, RGD). En una realización de la presente invención, la tela está tratada con plasma de gas o sembrada con células biológicas.

Los aspectos adicionales de esta divulgación se refieren a la reparación de tejidos corporales específicos, tales como reparación de hernia, tejidos y eslingas de la vejiga urinaria, reconstrucción de suelo pélvico, tejidos de la pared peritoneal, vasos (por ejemplo, arterias), tejido muscular (por ejemplo, músculo liso abdominal, cardíaco),

hemóstatos, y ligamentos y tendones de la rodilla y/o del hombro así como otras estructuras frecuentemente dañadas debido al desgaste traumatológico o crónico. Los ejemplos de ligamentos y tendones que pueden producirse incluyen ligamentos cruzados anteriores, ligamentos cruzados posteriores, tendones del manguito del rotador, ligamento colateral medial del codo y rodilla, tendones flexores de la mano, ligamentos laterales del tobillo y tendones y ligamentos de la mandíbula o articulación temporomandibular. Otros tejidos que pueden producirse mediante métodos de esta divulgación incluyen cartílago (articular y del menisco), hueso, piel, vasos sanguíneos, prótesis para sujeción y/o reparación de vasos y tejido conectivo laxo general.

En otros aspectos, las fibras de fibroína de gusano de seda, en la forma de un hilo o de una construcción más grande de hilos, ahora denominada un dispositivo, está despojada de sericina, y fabricada (por ejemplo, tejida, tricotada, fibra húmeda no tejida, trenzada, reconstituida con puntadas, etc.) en tela, esterilizada y usada como una sujeción implantable o un material de reparación que ofrece una vida útil controlable (es decir, velocidad de degradación) y un grado controlable de deposición de colágeno y/o matriz extracelular. El material de sujeción o reparación puede usarse para cualquiera de tales fines en el organismo, y en particular puede usarse para reparación de hernia, reconstrucción de paredes corporales, particularmente en la cavidad torácica y abdominal, y sujeción, colocación o inmovilización de órganos internos, que incluyen, sin limitación, la vejiga, el útero, los intestinos, la uretra y los uréteres. Como alternativa, las fibras de fibroína de gusano de seda pueden estar despojadas de sericina y organizadas en una tela no tejida. Dicha tela no tejida puede usarse como una sujeción implantable o material de reparación como se ha indicado anteriormente, pero más específicamente para aplicaciones donde sería útil la formación de una esponja.

La seda purificada puede purificarse mediante cualquiera de una variedad de tratamientos que retiran las proteínas de sericina encontradas en las fibrillas nativas. La sericina se ha retirado lo suficiente cuando los implantes de seda purificada provocan solamente una reacción a un cuerpo extraño leve y pasajera en ausencia de una respuesta antigénica (célula B, célula T), es decir, son biocompatibles. Una reacción a un cuerpo extraño está caracterizada por una capa interna de macrófagos y/o células gigantes con una zona secundaria de fibroblastos y tejido conectivo. El grado de respuesta a un cuerpo extraño ha demostrado ser controlable a través de la modificación de fibroína (Figs. 13 A-D y Figs. 18 A-C) y el diseño del hilo (Figs. 19 A-D). La sericina puede retirarse de las fibras individuales de fibroínas de gusano de seda, un grupo de fibras de fibroína de gusano de seda (es decir, un hilo), que tienen una orientación organizada (por ejemplo, paralelas o enrolladas), o formar una tela u otra construcción que comprenda una pluralidad de hilos. La construcción puede después esterilizarse e implantarse en un organismo como un dispositivo médico.

Otras características y ventajas de la invención serán aparentes a partir de la siguiente descripción de las realizaciones preferentes de la misma.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1A es una imagen de un microscopio electrónico de barrido (SEM) de una fibra sencilla de seda nativa desgomada y con hebras de 20/22 denier que tiene una capa de sericina.

La Fig. 1B ilustra una SEM de la fibra de seda de la Fig. 1A extraída durante 60 minutos a 37 °C.

La Fig. 1C ilustra una SEM de la fibra de seda de la Fig. 1A extraída durante 60 minutos a 90 °C y que ilustra la retirada completa de la capa de sericina.

La Fig. 1D es una tabla que muestra la fuerza máxima de tracción (UTS) y la rigidez (N/mm para una matriz de 3 cm de longitud) como una función de las condiciones de extracción.

La Fig. 1E ilustra una SEM de una fibroína de seda cruda. La Fig. 1F ilustra una primera extracción a 90 °C durante 60 minutos. La Fig. 1G ilustra una segunda extracción bajo condiciones idénticas. Estas figuras muestran el daño mecánico a los filamentos que da como resultado una pérdida de masa típica del 30% tras la segunda extracción. Por lo tanto, siempre y cuando el porcentaje de pérdida de masa no cambie más del 3% desde la primera a la segunda extracción (90 °C, 1 hora, detergente y sal convencional), se asume que se ha conseguido la extracción completa. La utilidad de una pérdida del 3% en la pérdida de masa total refleja la variabilidad en las medidas, ensayos y daño mecánico dando como resultado una pérdida de masa del hilo tras la segunda extracción.

La Fig. 2A es un modelo representativo en 3-D de un hilo (de cable o enrollado) que representa su jerarquía de 5 niveles (no se muestra el nivel de fibra sencilla). Dependiendo del número de fibras usadas en cada nivel, la cuerda podría servir bien como un hilo para tricotar una malla para reparar una hernia o como una cuerda para usarse en paralelo con otras cuerdas para formar una matriz LCA.

La Fig. 2B es un esquema que representa la generación de un hilo enrollado o cableado de la jerarquía de dos niveles que contiene 36 fibras antes de unirse con hebras en paralelo para formar una matriz LCA o usado para generar una tela tejida o tricotada para ingeniería de tejidos y reparación de tejidos (por ejemplo, malla de hernia). Las representaciones esquemáticas definen visualmente dos formas muy populares de formaciones de tela: un "tejido" y un "tricotado".

- La Fig. 2C ilustra una cuerda sencilla de hilo que tiene una geometría que está helicoidalmente organizada alrededor de un eje central y compuesta por dos niveles de jerarquía que se enrollan. Cuando se usan seis cuerdas en paralelo (por ejemplo, Matriz 1), el hilo tiene propiedades mecánicas similares a las de un ligamento nativo.
- 5 La Fig. 2D ilustra una cuerda sencilla de hilo que tiene una geometría que está helicoidalmente organizada alrededor de un eje central y compuesta por tres niveles de jerarquía que se enrollan. Cuando se usan seis cuerdas en paralelo (por ejemplo, Matriz 2), la matriz tiene propiedades mecánicas similares a las de un ligamento nativo.
- La Fig. 3A ilustra curvas de carga-alargamiento para cinco muestras (n=5) de la Matriz 1 formada por seis cuerdas paralelas de fibroína de seda ilustradas en la Fig. 2A.
- 10 La Fig. 3B es un gráfico de ciclos hasta fallo en UTS, cargas de 1680N y 1200N (n=5 para cada carga) que ilustra los datos de fatiga de la Matriz 1. El análisis de regresión de los datos de fatiga de la Matriz 1, cuando se extrapolan a los niveles de carga fisiológica (400 N) para predecir el número de ciclos hasta fallo *in vivo*, indica una vida de matriz de 3,3 millones de ciclos.
- La Fig. 3C ilustra curvas carga-alargamiento para tres muestras (n=3) de la Matriz 2 (n=3) formada a partir de seis cuerdas paralelas de fibroína de seda como se ilustra en la Fig. 2B.
- 15 La Fig. 3D es un gráfico de ciclos hasta fallo en UTS, cargas 2280N, 2100N y 1800N (n=3 para cada carga) que ilustra los datos de fatiga de la Matriz 2. El análisis de regresión de los datos de fatiga de la Matriz 2, cuando se extrapolan a los niveles de carga fisiológica (400 N) para predecir el número de ciclos hasta fallo *in vivo*, indica una vida de matriz de más de 10 millones de ciclos.
- 20 La Fig. 4A muestra imágenes de múltiples formas de hilo y tela generados en nuestros laboratorios. Varias estructuras diferentes de hilo, que incluyen varios tipos de trenzas (i, ii, iv), una trenza plana (iii), trenza de diámetro variado o estrechada (v), un paquete cableado más grande (~250 fibras) de dos niveles, un hilo paralelo unido con hebras y reconstituido (estampado) que consiste en hilos texturizados de 24-12 fibras (vii), una variedad de hilos enrollados (viii-xi), y un hilo paralelo unido con hebras y reconstituido (estampado) que consiste en hilos cableados de dos niveles de 24-12 fibras (xii).
- 25 La Fig. 4B es un gráfico de curvas carga-alargamiento para (I) una trenza (48 fibras, una trenza con 4 portadores que usa hilo enrollado extraído de 12 fibras) e hilos texturizados (48 fibras en total) y (II) enrollados en comparación con hilos cableados, 12 fibras en total – todas las muestras tuvieron 3 cm de longitud.
- La Fig. 4C es un gráfico de datos de fatiga para hilos pequeños, 3 cm de longitud, en comparación con 3B y 3D para (I) un cable pequeño de 36 fibras y (II) un hilo pequeño texturizados de 60 fibras.
- 30 La Fig. 5A proporciona datos de fuerza y rigidez para un hilo de 36 fibras como una función de 6 velocidades diferentes de tensión en los que fueron testados (N=5 por grupo).
- La Fig. 5B muestra curvas carga-alargamiento para un hilo de 36 fibras, de 3 cm de largo, testado en 2 de las 6 velocidades diferentes de tensión. Los datos representan el efecto de los procedimientos de las pruebas (aquí, específicamente velocidad de tensión) sobre las propiedades mecánicas presentadas (por ejemplo, UTS) de la estructura del hilo.
- 35 La Fig. 6A es un gráfico de UTS como una función de giros por pulgada (TPI); las líneas de tendencia se generaron para extrapolar los datos a un 4º orden polinomial - se muestran TPIs de 0-15. Se observó un máximo que indica una estructura ordenada en la que los filamentos individuales están trabajando al unísono.
- La Fig. 6B es un gráfico de rigidez (para una muestra de 3 cm de longitud) como una función de giros por pulgada (TPI); las líneas de tendencia se generaron para extrapolar los datos a un 5º orden polinomial - se muestran TPIs de 0-15. Se observó un máximo que indica que TPI podría usarse como una herramienta para diseñar una UTS o rigidez específica.
- 40 La Fig. 7A ilustra una SEM de fibroína de seda extraída antes de la siembra con células.
- La Fig. 7B ilustra una SEM de células estomales de médula ósea sembradas y agregadas sobre la fibroína de seda inmediatamente después de la siembra.
- 45 La Fig. 7C ilustra una SEM de células de médula ósea agregadas y extendidas sobre la fibroína de seda 1 día después de la siembra.
- La Fig. 7D ilustra una SEM de células estomales de médula ósea sembradas sobre fibroína de seda 14 días después de la siembra formando una lámina intacta de matriz celular-extracelular.
- 50 La Fig. 8A ilustra una longitud de 3 cm de la cuerda de fibroína de seda ilustrada en la Fig. 2C y sembrada con células estomales de médula ósea, cultivadas durante 14 días en un medio estático y teñidas con MTT para mostrar incluso la cobertura celular de la matriz tras el periodo de crecimiento.

La Fig. 8B ilustra una hebra de control de cuerda de fibroína de seda de 3 cm de longitud teñida con MMT.

La Fig. 9A es un gráfico que ilustra la proliferación de célula estomal de médula ósea sobre la Matriz 1 de fibroína de seda determinada por el ADN celular total sobre un periodo de cultivo de 21 días que indica un significativo incremento en la proliferación celular tras 21 días de cultivo.

- 5 La Fig. 9B es un gráfico de barras que ilustra la proliferación de célula estomal de médula ósea sobre la Matriz 2 de fibroína de seda determinada por el ADN celular total sobre un periodo de cultivo de 14 días que indica un significativo incremento en la proliferación celular tras 14 días de cultivo.

10 La Fig. 10 ilustra la fuerza máxima de tracción de una construcción extraída de seda de 30 fibras que está sembrada con células estomales de médula ósea o no se ha sembrado durante 21 días de cultivo en condiciones fisiológicas de crecimiento.

La Fig. 11A es un gráfico de UTS como una función de degradación enzimática *in vitro*; no se observó pérdida de fuerza en el control negativo, PBS. La seda perdió el 50% de su fuerza tras 21 días en cultivo. Se usó una solución 1 mg/ml de Proteasa XIV de Sigma.

15 La Fig. 11B es un gráfico de pérdida de masa como una función de degradación enzimática *in vitro*; no se observó pérdida de fuerza en el control negativo, PBS. Se observó una pérdida de masa del 50% después de 41 días en cultivo.

La Fig. 12 es un gráfico de pérdida de UTS como una función de degradación *in vivo* después de la implantación de matriz modificada con RGD en un modelo de rata subcutánea no cargada durante 10, 20 y 30 días. Se observó una pérdida de masa del 50% después de ~10 días *in vivo* en un ambiente no cargado.

20 La Fig. 13A muestra secciones histológicas de matrices de fibroína de seda libres de sericina de 12(0) x 3(8) no modificadas y modificadas con RGD después de 30 días de implantación subcutánea en una rata Lewis. La fila I es la tinción H/E a 40X, la fila II es la tinción H/E a 128X, la fila III es la tinción tricrómica de colágeno a 128X, la fila IV es colágeno echado hacia atrás de las imágenes de la fila III para tener en cuenta la cuantificación del crecimiento interno del colágeno y la fila V son los píxeles asociados a las secciones transversales del resto de las fibroínas de seda echadas hacia atrás para tener en cuenta la cuantificación de la degradación. Tras el análisis cualitativo, en el medio subcutáneo, tanto los grupos no tratados como los modificados soportaron en crecimiento interno celular y la deposición de colágeno dentro de la propia matriz con encapsulación periférica limitada.

30 La Fig. 13B representa cuantitativamente un descenso del 36% en el área en sección transversal de seda modificada con RGD después de 30 días de implantación subcutánea lo que indica una significativa mejora en la habilidad del huésped para degradar las matrices de fibroínas de seda con superficie modificada en comparación con los controles no tratados.

La Fig. 13C muestra cuantitativamente un significativo incremento del 63% en la deposición de colágeno dentro de las matrices de fibroína modificadas con RGD en comparación con los controles no tratando demostrando de nuevo la habilidad de la matriz de seda modificada para soportar el crecimiento interno de células y tejidos del huésped.

35 La Fig. 13D muestra la tinción H/E de un hilo de fibroína extraído de 36 fibras implantado intramuscularmente en el área abdominal de una rata Lewis. Las imágenes se muestran a 40X y 128X para matrices no modificada y modificadas con RGD. Los resultados muestran, cualitativamente, que la modificación con RGD incrementó de manera espectacular la infiltración de células y tejidos en un plazo de 30 días *in vivo*. A diferencia de la sutura con seda negra trenzada o sutura con seda virgen, no se observaron encapsulación periférica o células de plasma. En comparación con los implantes subcutáneos, se observó poca o ninguna infiltración celular y deposición de colágeno en los controles no tratados lo que indica el efecto del área de implantación además de la modificación de la superficie.

45 La Fig. 13E es una representación numérica de pérdida de masa *in vivo* de los dos grupos diferentes de modificación en comparación con los controles no tratados. La modificación con RGD, seguida de la modificación con plasma de gas incrementó significativamente ($p < 0,05$) la extensión de la degradación después de 90 días de implantación intramuscular. Sin embargo, parece que la degradación fue más agresiva en el medio subcutáneo en comparación con el medio intramuscular, como se esperó.

50 La Fig. 14 ilustra un análisis electroforético en gel de amplificación RT-RGD de marcadores seleccionados conforme avanzaba el tiempo. El gel muestra la regulación por incremento en ambos niveles de expresión I y II de tipos de colágeno normalizados para el gen doméstico, GAPDH por la célula estomal de médula ósea cultivada sobre la Matriz 2 durante 14 días en cultivo. No se detectaron colágeno de tipo II (como un marcado para cartílago) ni sialoproteína ósea (como un marcador de formación de tejido óseo) lo que indica una respuesta por las BMSC de diferenciación específica de ligamentos cuando se cultivó con la Matriz 2.

55 Las Figs. 15A y 15B ilustran una cuerda sencilla de Matriz 1 (no sembrada en el momento de la implantación) tras seis semanas de implantación *in vivo* y usada para reconstruir el ligamento colateral medial (LCM) en un modelo de

conejo. La Fig. 15A muestra las fibras de fibroína de la Matriz 1 rodeadas por el crecimiento interno de las células y el tejido del huésped progenitor en la matriz y alrededor de las fibras individuales de fibroína visualizadas mediante tinción de hematoxilina y eosina. La Fig. 15B muestra el crecimiento interno del tejido colagenoso en la matriz y alrededor de las fibras individuales de fibroína visualizadas mediante tinción tricrómica.

5 Las Figs. 16A, 16B y 16C ilustran células estomales de médula ósea sembradas y cultivadas sobre fibras de colágeno durante 1 día (Fig. 16A) y 21 días (Fig. 16B); RT-PCR (Fig. 16C) y análisis electroforético en gel de colágeno de expresión I y III frente al gen doméstico GAPDH; a=Colágeno I, día 14; b=Colágeno I, día 18; c=Colágeno III, día 14; d=Colágeno III, día 18; e=GAPDH, día 14; f=GAPDH, día 18. No se detectaron colágeno de tipo II (como un marcador para cartílago) ni sialoproteína ósea (como un marcador de formación de tejido óseo) lo que indica una respuesta de diferenciación específica de ligamento.

La Fig. 17 ilustra RT-PCR cuantitativo a tiempo real en 14 días que produjo una proporción de transcripción de colágeno I a colágeno III, normalizada a GAPDH, de 8,9:1.

15 La Fig. 18A y Fig. 18B son secciones transversales teñidas con H/E de 6 paquetes de (A) 2-0 sutura con seda negra trenzada y (B) seda modificada con superficie RGD (36 fibras/paquete), respectivamente, 30 días después de la implantación intramuscular. La figura 18C es la seda modificada con RGD pre-sembrada con las BMSC durante 4 semanas antes de la implantación. La Fig. 18A muestra una reacción a cuerpo extraño típica y extensa a sutura con seda negra trenzada disponible en el mercado (Ethicon, Inc.) donde no se puede observar ni crecimiento interno ni infiltración celular. La Fig. 18B demuestra la habilidad de la seda obtenida por ingeniería para estimular el crecimiento interno de células y tejidos. Las figs. 18A, 18B y 18C ilustran la respuesta del tejido a las construcciones de fibra de seda que están cubiertas de cera (Fig. 18A), despojadas de sericina y cubiertas con RGD (Fig. 18B), y despojadas de sericina y sembradas con células madres del adulto progenitor (Fig. 18C).

20 Las Figs. 19A-D muestran imágenes en sección transversal teñidas con H/E a 40X (fila superior, Fig. 19A y Fig. 19B) y 128X (fila inferior, Fig. 19C y 19D) de dos hilos (4x3x3 y 12x3), conteniendo cada uno el mismo número de fibras, pero organizados de manera diferente con jerarquías específicas tras la implantación en un modelo de rata durante 30 días. Los resultados indican que el diseño y la estructura del hilo pueden influenciar la extensión del crecimiento interno de las células y tejidos cuando la construcción de hilo de 12x3 tuvo en cuenta el crecimiento interno, mientras que parece que 4x3x3 lo impidió.

30 La Fig. 20A, B y C son fotos de (A) una tela no tejida mojada de una única fibra extraída tras la formación de la tela (las fibras pueden primero extraerse y formarse en el no tejido – datos no mostrados), (B) una tela tricotada producida a partir de una forma de puntadas en cadena usando hilo de 12 fibras extraído tras la formación de la tela, y (C) una tela tejida producida a partir del hilo de 12 fibras pre-extraído con hilo de 36 fibras pre-extraído que corre en la dirección de la trama.

35 La Fig. 21 es un organigrama esquemático de los varios métodos y secuencias que pueden emplearse para crear una matriz de fibroína de seda biocompatible y biodegradable. Por ejemplo, extraer una única fibra, enrollarla en hilos y tricotarla en telas o unir hilos mediante hebras, enrollar los hilos unidos mediante hebras, formar la tela y después extraerla. Existe un número casi infinito de combinaciones, pero todas dependerán de la jerarquía del hilo, el número de fibras por nivel y el TPI por nivel como se muestra en las Tablas 4, 6, 7 y 8.

Descripción detallada

40 En métodos descritos con más detalle, más adelante, las fibras de fibroína de seda están alineadas en una orientación paralela; las fibras pueden permanecer en una orientación estrictamente paralela o pueden enrollarse o de otra manera entrelazarse para formar un hilo. El hilo puede incluir cualquier número de jerarquías, comenzando en el nivel de la fibra y expandiéndose a través del paquete, hebra, cuerda, etc, niveles. El entrecruzado puede proporcionarse en cualquier nivel. Además, la sericina se extrae de las fibras de seda en cualquier punto en la jerarquía hasta el punto en el que el número de fibras excede aquel en el que la solución extractora puede penetrar a través del hilo. El número máximo de fibras de fibroína de gusano de seda (20/22 denier como se compran) que pueden combinarse y extraerse satisfactoriamente es aproximadamente 50 (Tabla 4). Después, estos hilos pueden usarse como una construcción de fibra y pueden incorporarse en una tela para su uso, por ejemplo, en la generación de una malla de tejido suave para reparaciones tales como reparación de hernia, reconstrucción de suelo abdominal y eslingas de vejiga. La formación de construcciones de fibra se analizará, más adelante, en el contexto de aplicaciones ejemplares.

55 Aunque gran parte de la siguiente discusión se refiere a una matriz basada en fibra de seda (es decir, construcción, armazón) para producir un ligamento cruzado anterior (LCA), puede formarse una variedad de otros tejidos, tales como otros ligamentos y tendones, cartílago, músculo, hueso, piel y vasos sanguíneos, usando una nueva matriz basada en fibra de seda. En el caso de LCA, se describió un hilo grande (540-3900 fibras por hilo, antes de unirse mediante hebras en paralelo; véase Tabla 8 y 11) con múltiples niveles jerárquicos de entrecruzado y propiedades fisiológicas relevantes. Además de una matriz LCA basada en fibra de seda, múltiples configuraciones de hilo más pequeño (seda de 1-50 fibras) (Tabla 1, 4 y 5) con propiedades fisiológicas relevantes después de combinarse bien en paralelo o en una formación específica de tela, pueden servir como matrices de tejido para una formación guiada

de tejido (Fig. 2A-B). Además de las matrices de seda para la formación guiada de tejido o ingeniería, este trabajo está específicamente dirigido para producir una variedad de estructuras de sujeción de tejido de matrices basadas en fibra de seda para la reparación guiada de tejido (por ejemplo, reparación de hernia, eslingas de vejiga para incontinencia urinaria por estrés) (Fig. 2A-B y Fig. 20A-C).

- 5 Las construcciones (es decir, telas o hilos) pueden tener la superficie modificada o pueden estar sembradas con las células apropiadas (Figs. 7A-D, Figs. 8A-B y Figs. 16A-C) y expuestas a la estimulación mecánica apropiada, si es necesario, para la proliferación y diferenciación en el ligamento, tendón u otro tejido deseado de acuerdo con las técnicas anteriormente descritas.

- 10 Para sembrar sobre la construcción de fibra pueden usarse células estomales de médula ósea y también pueden usarse otras células progenitoras, pluripotentes o madre, tales como las del hueso, músculo y piel, por ejemplo, para diferenciarse en ligamentos y otros tejidos.

- 15 Las telas también pueden formarse a partir de construcciones similares de filamentos purificados, y usarse en varias aplicaciones. Las telas pueden dividirse en varias clases, incluyendo tejida, no tejida, telas tricotadas, y telas cosidas por cadeneta, cada una con numerosos subtipos. Cada uno de estos tipos es útil como un implante en circunstancias particulares. Al hablar de estas telas basadas en seda, describimos la seda natural, por ejemplo, de *Bombyx mori*, como una "fibra de fibroína". Las fibras deberían tener al menos un metro de longitud, y su longitud debería mantenerse a lo largo del proceso para facilitar su manipulación durante su procesamiento e incorporación en una tela. Dado que un hilo puede definirse como un montaje de fibras enrolladas o de otra manera mantenidas unidas en una hebra continua y que una fibra sencilla de fibroína, como se ha definido anteriormente, comprende múltiples
20 broínas unidas mediante hebras, algunas veces de múltiples capullos, una fibra sencilla de fibroína puede denominarse "hilo". Así mismo, las fibras de fibroína están enrolladas juntas o de otra manera entrelazadas para formar un "hilo". Los hilos se usan para tejer o tricotar telas para su uso en la invención. En un procedimiento alternativo, los hilos de seda están dispersados en longitudes más cortas (5 mm a 100 mm) o en filamentos de fibroína de seda. Estos filamentos pueden después colocarse (mojados) para formar una tela no tejida (Fig. 20A).

- 25 Cuando los hilos se forman en un tejido, la tensión (fuerza) ejercida sobre los hilos (típicamente, a través de maquinaria) no es superior al límite de elasticidad del hilo (Fig. 3A-D). Por consiguiente, los hilos se manipulan a velocidades más bajas y bajo cargas más pequeñas que los hilos que típicamente se usan en, por ejemplo, la fabricación textil cuando se forma la tela para preservar la integridad de las fibras frágiles de fibroína expuestas. De la misma manera, los puntos de contacto entre la maquinaria de manipulación y el hilo están diseñados para evitar
30 ángulos afilados e interacciones de alta fricción para prevenir que las fibras se estropeen o deshilachen alrededor del perímetro del hilo (Figs. 4A-C).

- En la técnica médica y quirúrgica se conocen numerosas aplicaciones de tela como implantes. Un ejemplo es una sujeción en la reparación de hernias. Para tal reparación, una tela, más típicamente tejida con urdimbre con una puntada deseada (por ejemplo, un punto atlas diseñado para impedir que la malla se deshilache durante el corte), se cose (o a veces se grapa o pega) o simplemente se coloca en su lugar sin tensionar, en el interior de la pared abdominal después de que se haya reparado con suturas convencionales. Una función de la tela tricotada con urdimbre es proporcionar sujeción a corto plazo a la reparación. En una realización preferente de la presente invención, las fibras de fibroína dentro de la tela estimulan el crecimiento interno de células y el posterior crecimiento del tejido en la propia tela (Figs. 13A y 13D) así como a través de los intersticios de la tela formados durante el tricotado y en la región que necesita repararse. Esta realización ayuda a fortalecer permanentemente el área dañada a través del crecimiento interno y la reforma del tejido funcional cuando la matriz de la seda se degrada (Figs. 13A, B y C).

- 45 Las telas que fortalecen la reparación se usan en situaciones similares para reparar o sujetar cualquier parte de la pared abdominal, particularmente en la reparación de hernia y reconstrucción de suelo abdominal, o en reparación y sujeción de otras paredes y tabiques corporales, por ejemplo del pecho, o de órganos tales como el corazón o la vejiga, particularmente después de cirugía o retirada de tumor. Las telas implantables pueden también usarse para sujetar vejigas u otros órganos internos (incluidos pero no limitados a los intestinos, los uréteres o uretra y el útero) para mantenerlos en sus posiciones normales después de cirugía, daño o desgaste natural como resultado de la edad o embarazo, o para posicionarlos en una localización apropiada. El "órgano" aquí incluye órganos "sólidos", tales como un hígado, y órganos tubulares tales como un intestino o un uréter. Las telas, especialmente las telas gruesas tales como algunos tipos no tejidos o aquellas que pueden crearse a través de tricotado o trenzado tridimensional (Figs. 4A-C), pueden usarse para llenar cavidades dejadas por la cirugía para proporcionar una construcción de fibra a la que las células pueden migrar o a las que las células pueden pre-acoplarse (por ejemplo, para aumentar la velocidad de la reparación). Las áreas de uso incluyen cavidades tanto en tejidos blandos como en
50 tejidos duros tales como hueso. En otros casos, las telas se usan para prevenir adhesiones, o para prevenir el acoplamiento y/o crecimiento interno de células; esto puede conseguirse por medio de la modificación de la superficie de la matriz de fibroína de seda o por medio del acoplamiento de un fármaco o factor a la matriz.

- 60 Las telas basadas en fibroína de seda de la invención pueden modificarse fácilmente de varias maneras para mejorar la curación o reparación en el área. Estas modificaciones pueden usarse de manera individual o en combinación. Las telas basadas en fibroína de seda de la invención pueden tener la superficie modificada para

soportar el acoplamiento y la expansión celular, el crecimiento interno y la reforma de las células y tejidos, y la degradación del dispositivo a través del uso del enlace peptídico RGD o irradiación de plasma de gas (Figs. 13A-E). Las telas pueden modificarse para tener factores de acoplamiento celular, tales como el péptido bien conocido "RGD" (arginina-glicina-ácido aspártico) o cualquiera de los muchos materiales naturales o sintéticos que estimulan el acoplamiento, tales como suero, factores y proteínas de suero que incluyen fibronectina, sangre, médula, grupos, determinantes, etc., conocidos en la bibliografía. Tales materiales pueden estar en cualquiera de las clases bioquímicas usuales de tales materiales, incluyendo sin limitación proteínas, péptidos, carbohidratos, polisacáridos, proteoglicanos, ácidos nucleicos, lípidos, moléculas orgánicas pequeñas (menos de aproximadamente 2000 Daltons) y combinaciones de estos. Tal modificación de plasma puede mejorar la funcionalidad de la superficie de la tela y/o cargar sin afectar las propiedades mecánicas del volumen a granel de materiales. Las telas pueden estar irradiadas por plasma de gas después de la extracción de sericina sin comprometer la integridad de las fibras de fibroína de seda a las que se les ha extraído la sericina (Tabla 9).

Además, la tela puede tratarse para que envíe un fármaco. El acoplamiento del fármaco a la tela puede ser covalente, o covalente por medio de enlaces degradables, o por cualquier tipo de enlace (por ejemplo, atracción de carga) o absorción. Cualquier fármaco puede usarse potencialmente; ejemplos no limitativos de fármacos incluyen antibióticos, factores del crecimiento tales como proteínas morfogenéticas óseas (BMP) o factores de diferenciación del crecimiento (GDF), inhibidores del crecimiento, quimioatrayentes, ácidos nucleicos para la transformación, con o sin materiales encapsulantes.

En otra modificación, las células pueden añadirse a la tela antes de su implantación (Figs. 7A-D, Figs. 8A-B, y Figs. 9A-B). Las células pueden sembrarse/absorberse sobre la tela. Las células pueden también o además cultivarse sobre la tela, como una primera etapa hacia la sustitución o la mejora de tejido. Las células pueden ser de cualquier tipo, pero se prefieren las células alógenas, preferentemente de los tipos "inmunoprotegidas", "inmunoprivilegiadas" o células madre y las células autólogas son particularmente preferentes. Las células se seleccionan para ser capaces de proliferar en los tipos celulares requeridos sobre o en la construcción de fibra (Figs. 9A-B).

Otra clase de modificación es la incorporación de otros polímeros (por ejemplo, en forma de fibra o gel) en la tela, para proporcionar propiedades estructurales específicas o para modificar las superficies nativas de la fibroína de seda y sus características biológicas (véanse las Figs. 16A-C: siembra de fibras de colágeno con las BMSC). En un tipo de incorporación, las fibras o hilos de seda y de otro material se mezclan en el proceso de hacer el hilo. En otro tipo, las fibras, hilos o telas basadas en seda están cubiertos o recubiertos con una solución o con fibras de otro polímero. La mezcla puede hacerse (i) arbitrariamente, por ejemplo uniendo mediante hebras (1 o múltiples fibras de) tanto seda como el polímero juntos en paralelo antes de girarlos o (ii) de una manera organizada tal como en trenzado donde las fibras o hilos que están entrando en el hilo o tela más grande pueden alternar posiciones de alimentación en la máquina creando un resultado previsible. La acción de cubrir o envolver puede realizarse mediante trenzado o cableado sobre un núcleo central, donde el núcleo puede ser el polímero, la fibroína de seda o un compuesto de ambos, dependiendo del efecto deseado. Como alternativa, un hilo puede envolverse de una manera controlada sobre el otro polímero, donde el hilo que se envuelve puede usarse para estabilizar la estructura. Cualquier polímero biocompatible se puede usar potencialmente. Ejemplos de polímeros adecuados incluyen proteínas, particularmente proteínas estructurales tales como colágeno y fibrina, y polímeros sintéticos degradables que proporcionan fuerza, tales como polímeros que comprenden anhídridos, ácidos hidroxilo y/o carbonatos. Las capas pueden proporcionarse como geles, particularmente geles degradables, formados por polímeros naturales o por polímeros sintéticos degradables. Pueden usarse geles que comprenden fibrina, colágeno y/o proteínas con membrana de base. Los geles pueden usarse para enviar células o nutrientes, o para proteger la superficie del acoplamiento celular. Además, las proteínas o péptidos pueden acoplarse covalentemente a las fibras o las fibras pueden modificarse con plasma en un gas cargado (por ejemplo, nitrógeno) para depositar grupos amino; cada una de estas capas soporta el acoplamiento y el crecimiento interno celular, cuando la seda es normalmente hidrófoba, y estas capas hacen que las fibras sean más hidrófilas.

Ejemplos no limitativos de algunas de estas realizaciones se describen en ejemplos, más adelante.

Se seleccionó el trazado mojado para un prototipo de formación de tela porque es el procedimiento más simple. El producto no tejido (Fig. 20A) se creó a partir de una fibra sencilla de fibroína de seda antes de la extracción al nivel de la tela. El producto es correspondientemente un material relativamente económico, y puede usarse en aplicaciones en las que su baja fuerza de tracción sería satisfactoria. Cuando se necesita más fuerza de tracción, podría unirse un material no tejido, como es bien conocido para telas y papel o mineralizado para reparación de hueso. Como alternativa, el material de hilo de seda producido mediante extracción de sericina puede formarse en una variedad de hilos más complejos, como se ha descrito anteriormente. El tamaño y el diseño del hilo pueden usarse para controlar la porosidad, con independencia de las capacidades de la máquina del no tejido. Los hilos también pueden tricotarse (Fig. 20B) o tejerse (Fig. 20C) en una tela. Un tipo de tela de interés es una malla simple, similar a una gasa, que puede usarse sola (por ejemplo, como un hemóstato), o para enviar células o fármacos (por ejemplo, un factor coagulante) a un área, en una situación en la que la flexibilidad es importante.

Cuando la fuerza es importante, una tela tejida con urdimbre (Fig. 20B), que incluye las familiares prendas de punto y jerséis, que tienen una elasticidad que puede controlarse a través del diseño helicoidal del hilo usado en la tela, y típicamente con sustancial fuerza de tracción, puede ser útil para aplicaciones (por ejemplo, reparación de hernia,

eslingas de vejiga, reconstrucciones de suelo pélvico, etc.) que requieren la provisión de sujeción mecánica durante un tiempo significativo, tal como meses.

En otras aplicaciones, el material debería tener poca elasticidad y mucha fuerza. Para tales telas, una trama densa de hilos gruesos es apropiada, produciendo un material que es similar a las telas tejidas convencionales (Fig. 20C). Tal material puede estar opcionalmente complementado con un tratamiento de capa o tratamiento de calor para unir los cruces de los segmentos del hilo, previniendo de este modo que se enreden o se estiren. Los tratamientos de calor no deben desnaturalizar completamente la proteína de seda. La tela pueden opcionalmente coserse, pegarse o graparse en su sitio, como se hace actualmente con la malla de polipropileno. El implante, como cualquiera de otros tipos tratados, puede cubrirse con varios materiales para mejorar la curación local y el proceso de crecimiento interno del tejido, y/o con una capa para prevenir la adhesión del área de reparación a la víscera.

En otra alternativa, la tela, la malla, el material no tejido, tricotado u otro material de reparación puede estar hecho de seda no extraída, y después la tela acabada puede extraerse como aquí se describe (Fig. 21) (por ejemplo, con solución de jabón alcalino a temperatura elevada) para retirar las sericinas inmunomoduladoras del material. Como una alternativa adicional, la extracción de la sericina puede tener lugar en una fase intermedia, tal como la extracción del hilo, grupo o hebra formada, siempre y cuando el número de fibras no exceda aquel en el que la solución extractora puede penetrar a través de las fibras (véase la Fig. 21 para opciones no limitadoras).

La discusión anterior ha descrito la realización de telas compuestas por hilos, donde la forma más típica de hilo tratada en las formaciones de telas derivaría de girar fibras de fibroína de gusano de seda juntas de una manera organizada y extraer la sericina. También pueden usarse muchas geometrías de hilo y métodos de formación de hilo como se ha descrito (Tablas 4, 5, 6, 7 y 8). Tales métodos pueden incluir la formación de paquetes no enrollados de fibras de fibroína, unidas juntas envolviendo paquetes con seda u otro material como se ha tratado anteriormente. Cualquiera de estos hilos podría formarse, como se ha descrito anteriormente, mezclando fibras de seda con otros materiales. Incluso además, las fibras pueden entrelazarse, por ejemplo, formar un cable, enrollarse, trenzarse, formar una malla, tricotarse, etc. (véanse las Figs. 2A y B y 21). El término "entrelazado" aquí se usa para indicar una estructura repetitiva organizada (es decir, no arbitraria) en términos de cómo las fibras contactan y se unen unas con otras.

La mezcla también podría hacerse a niveles más altos de organización, tales como el uso de filamentos de diferentes materiales para formar un hilo más grueso, o usando hilos de diferentes materiales para tejer o tricotar. En cada caso, el material final incluiría seda purificada, esencialmente libre de sericina como un componente significativo, usado para una o todas de sus características de fuerza y compatibilidad (es decir, a largo plazo) y degradación (Figs. 11A-B). El otro polímero u otros polímeros se seleccionan por su biocompatibilidad, soporte (o inhibición a través de la rápida formación de tejido en la zona deseada) del acoplamiento o infiltración celular (Figs. 16A-C), perfil de degradación in vivo, y propiedades mecánicas. Los polímeros biodegradables incluyen cualquiera de los polímeros biodegradables conocidos, incluyendo productos naturales tales como proteínas, polisacáridos, glicosaminoglicanos, y polímeros naturales derivados, por ejemplo, celulosas; y polímeros y copolímeros sintéticos biodegradables que incluyen ácidos polihidroxi, policarbonatos, polinahídridos, algunos poliamidos y copolímeros y mezclas de los mismos. En particular, el colágeno y la elastina son proteínas adecuadas.

Las construcciones/matrices de tela que contienen seda usadas para la reparación de tejidos pueden tratarse para que contengan células en el momento de la implantación (Figs. 7A-D, Figs. 8A-B, Figs. 9A-B y Fig. 18C) para mejorar el resultado del tejido in vivo. Las células pueden ser xenogénicas, más preferentemente alogénicas, y lo más preferentemente autólogas. Cualquier tipo de célula es potencialmente de uso, dependiendo de la localización y la función prevista del implante. Las células pluripotentes son preferentes cuando las señales apropiadas de diferenciación están presentes o se proporcionan en el ambiente. Otros tipos de células incluyen células osteogénicas, fibroblastos, y células del tipo de tejido del área de implantación.

Aunque se ha descrito seda de *Bombyx mori* y otras sedas de gusano convencionales, cualquier fuente de seda o proteínas derivadas de seda pueden usarse en la invención, siempre y cuando provoque no más que una respuesta leve a un cuerpo extraño sobre la implantación (es decir, sea biocompatible) (véanse las Figs. 18B y C). Éstas incluyen sin limitación sedas de gusanos de seda, arañas, y células cultivadas, particularmente células obtenidas genéticamente, y plantas y animales transgénicos. La seda producida por clonación puede ser de secuencias completas o parciales de genes nativos del tipo seda, o de genes sintéticos que codifican secuencias del tipo seda.

Aunque en muchos casos solamente se usará un único tipo de tela en la formación de un dispositivo médico o prótesis, en algunos casos podría ser útil usar dos o más tipos de tela en un único dispositivo. Por ejemplo, en la reparación de hernia, es deseable que el lado orientado al tejido de la tela de reparación atraiga a las células, mientras que la cara peritoneal debería repeler a las células para prevenir adhesiones. Este efecto puede conseguirse teniendo una capa de seda que no atraiga a las células, y otra capa que lo haga (por ejemplo, una capa no tratada y una capa que contenga RGD, como en el ejemplo, más adelante). Otro ejemplo incluye la formación de una eslinga de vejiga. La eslinga básica debería ajustarse y ser de alguna manera elástica, y tener una vida útil pronosticada. Sin embargo, la cara de la eslinga más cercana a la vejiga debería tener la menor consistencia posible. Esto puede conseguirse colocando una capa de tela fina pero ajustadamente tejida, no tejida o tricotada, fabricada de un hilo que tiene un diámetro más pequeño (por ejemplo, una única fibra) de la invención en la eslinga

donde estará en contacto con la vejiga. La tela no tejida debería ser de una medida (denier) lo más pequeña posible. Son posibles otras numerosas situaciones que necesitan dos o más tipos de tela.

Los ejemplos de estructuras anteriormente descritas se fabricaron y evaluaron en una serie de pruebas. En un primer ejemplo, se formó una tela a partir de fibrillas de seda purificada. En primer lugar, la seda cruda se procesó en fibrillas de fibroína purificada. Las fibras crudas de gusano de seda se extrajeron en una solución acuosa de Na_2CO 0,02 M y 0,3% p/v de solución de jabón IVORY durante 60 minutos a 90 °C. Las fibras extraídas se enjuagaron con agua para completar la extracción de la proteína de sericina similar al pegamento. La suspensión resultante de fibrillas se colocó mojada sobre una pantalla, se perforó con una aguja y se secó (Fig. 20 A). El material afelpado resultante fue de alguna manera como la lana al tacto, y fue muy poroso. Estuvo lo suficientemente unido mediante enredo y agujas que se manipuló fácilmente y se cortó a la forma deseada.

En otro ejemplo, las fibrillas de fibroína de seda purificada se trataron con agentes que atraen las células (Tabla 9). Primero, los hilos se hicieron enrollando fibras purificadas de fibroína de seda. Algunos hilos estaban hechos de filamentos que se derivatizaron con el péptido RGD para atraer células, usando procedimientos descritos en Sofia y col, J. Biomed. Mater. Res. 54: 139-148, 2001. Las secciones de hilos tratados y no tratados (sutura de seda negra trenzada) se implantaron en la pared abdominal de ratas (Figs. 18A-C). Después de 30 días de implantación, las suturas negras trenzadas contenían grupos compactos de fibrilla, con infiltración celular entre los grupos de fibrilla pero no dentro de ellos. Sin embargo, los grupos de fibrilla tratados con RGD estaban extensamente invadidos por células huésped, y estaban expandidos pero no compactos (Figs. 13A-E, 18B), pero no estaban significativamente degradados (Figs. 13A-E).

Este ejemplo ilustra el uso de la derivatización para controlar la velocidad de degradación de fibrillas de fibroína de seda implantadas, así como la demostración de la habilidad de fibrillas derivatizadas para reclutar células para una estructura del tipo tela. Claramente, puede obtenerse una mayor especificidad de reclutamiento usando un atrayente más específico. Pueden usarse técnicas similares (derivatización química) o métodos más simples tales como absorción, adsorción, cobertura, bebidas, para proporcionar otros materiales en el área de implantación.

Cada una de las muestras presentadas en las Tablas más adelante, se prepararon de acuerdo con la descripción anterior, donde la sericina se retiró más de 60 minutos a una temperatura de 90 ° +/-2 °C. Se ha descubierto que usando una temperatura en este nivel durante un periodo suficiente de tiempo se producen fibras de las cuales la sericina se ha retirado sustancialmente (Figs. 1 A-C, Tablas 1, 2, 3) (para producir una construcción de fibra que está sustancialmente libre de sericina con el fin de producir una significativa respuesta inmunológica y para no impedir de manera significativa la biodegradabilidad de la fibra) mientras se preserva sustancialmente la integridad mecánica de la fibroína (Tabla 1). Hay que tener en cuenta que cuando las temperaturas alcanzan los 94 °C (Tabla 1), la UTS no estuvo afectada de manera espectacular; sin embargo, la rigidez disminuyó de manera significativa lo que indica una sensibilidad térmica de la seda a temperaturas de 94 °C o superiores. Las fibras de cada grupo se estiraron manualmente (es decir, se pusieron paralelas) tirando de los extremos de las fibras; como alternativa, el estiramiento podía haberse hecho fácilmente por medio de un proceso automatizado. La fuerza aplicada fue ligeramente mayor que la requerida para estirar el grupo.

Las designaciones de geometría de la muestra en todas las Tablas reflejan las siguientes construcciones: # de fibras (tpi en el nivel de fibra en dirección S) x # de grupos (tpi en el nivel de grupo en dirección Z) x # de paquetes (tpi en el nivel de paquete en dirección S) x # de hebra (tpi en el nivel de hebra en dirección Z) x etc., donde las muestras están enrolladas entre niveles a menos que se indique de otra manera. La designación giro-por-pulgada, tal como 10s x 9z tpi, refleja (el número de giros de las fibras/pulgada dentro del grupo) x (el número de giros de los grupos/pulgada dentro del paquete). En cada muestra, la inclinación del giro es sustancialmente más alta que la encontrada normalmente en hilos convencionales que están enrollados en una inclinación baja meramente para sujetar las fibras juntas. Aumentando la inclinación de los giros (es decir, aumentando los giros por pulgada) disminuye la fuerza de tracción, pero también disminuye la rigidez y aumenta el alargamiento de rotura de la construcción.

La fuerza máxima de tracción (UTS), porcentaje de alargamiento de rotura (% Elong), y rigidez se midieron todos usando una máquina de pruebas de material servo hidráulico INSTRON 8511 con software FAST-TRACK, que torció la muestra a la alta velocidad de ~100% longitud de la muestra por segundo en un análisis de tirar de ella-hasta-fallo. En otras palabras, hasta el punto de fallo, la muestra se estira para doblar su longitud cada segundo, lo que restringe en gran medida la capacidad de la muestra para relajarse y rebotar hasta del fallo. Sin embargo, las Figs. 5A-B demuestran el efecto que la velocidad de tensión puede tener sobre las propiedades mecánicas observadas así como las condiciones de las pruebas en mojado y seco que demostraron tener (Figs. 6A-B) un efecto espectacular sobre la UTS y la rigidez de la matriz de seda. Se necesita consistencia si las comparaciones se van a hacer entre conjuntos de datos. Los datos resultantes se analizaron usando el software Instron Series IX. La fuerza máxima de tracción es la tensión máxima de la curva resultante tensión/presión, y la rigidez es la pendiente tensión/presión trazada hasta el límite de elasticidad. A menos que se especifique, se usó al menos N=5 para todos los grupos testados para generar promedios y desviaciones típicas. Se emplearon métodos estadísticos convencionales para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, por ejemplo, la prueba t de Student, ANOVA de un factor.

Las fibras de fibroína en las muestras en todas las Tablas y Figuras anteriores (y a lo largo de esta divulgación) son nativas (es decir, las fibras no están disueltas ni reformadas); la disolución y reformulación de las fibras da como resultado una estructura diferente de fibra con diferentes propiedades mecánicas tras la reforma. Sorprendentemente, estas muestras demuestran que los hilos de fibras de fibroína de seda, de los cuales la sericina se ha retirado completamente o casi completamente, pueden poseer fuerzas altas u otras propiedades mecánicas que hacen que los hilos sean adecuados para varias aplicaciones biomédicas (Tabla 4, Figs. 2A-D y Figs. 20A-C), tales como la formación de una construcción o sujeción de fibra para sustitución de ligamento, reparación de hernia o reconstrucción de suelo pélvico. Previamente, se creía que la fibroína tenía que disolverse y extrudirse en una fibra reformulada para proporcionar las propiedades mecánicas deseadas. Generalmente se ha encontrado que en tales fibras de fibroína reformada se sufre de fuerza de fatiga. Los métodos de la presente invención tienen en cuenta la retirada de sericina sin una pérdida significativa de fuerza (Tablas 1 y 4; Figs. 3A-D y 4A-B).

En la Tabla 8, las muestras 1 y 2 comparan las propiedades de un grupo de 3 fibras (muestra 1) con las de un grupo de 4 fibras (muestra 2). La muestra 2 tenía una configuración cuadrada de fibras, mientras que las fibras de la muestra 1 tenían una configuración triangular. Como se muestra en la Tabla, la adición de la fibra extra en la muestra 2 disminuyó la rigidez por fibra de la muestra lo que demuestra la habilidad para controlar las propiedades del hilo y tela a través del diseño jerárquico.

La Tabla 4 ilustra los efectos de diferentes configuraciones de construcciones de fibra con cable y una geometría de fibra enrollada. Hay que tener en cuenta, en particular, que las muestras 7 y 8 incluyen el mismo número de fibras y el mismo número de niveles geométricos. La geometría de fibra enrollada de la muestra 8 ofrece una mayor UTS y una mayor rigidez, mientras que la geometría cableada de la muestra 7 tiene menos fuerza y menor rigidez. De las muestras 7-9, la geometría cableada de la muestra 7 tiene la mayor proporción fuerza-a-rigidez; para su uso como una construcción de fibra de LCA, se desea una alta proporción fuerza-a-rigidez (es decir, que posea una elevada fuerza y una baja rigidez).

Las Tablas 1 y 4 demuestran el efecto de la extracción de sericina sobre las fibras. Todas las muestras se sumergieron en una solución de extracción, como se describe en la Tabla 1. Las muestras 1-5 se sumergieron en un baño a temperatura ambiente, a 33 °C y 37 °C. Se cree que estas temperaturas son demasiado bajas para proporcionar una significativa extracción de sericina. Las muestras 6-9 se extrajeron a 90 °C, donde se cree que la completa extracción de sericina fue alcanzable, pero durante tiempos variados. Similarmente, la muestra 10 se extrajo a la temperatura ligeramente más alta de 94 °C. Los datos sugieren que de 30 a 60 minutos a 90 °C es suficiente para retirar de manera significativa la sericina (véase Tablas 2 y 3) y que 94 °C podrían ser perjudiciales para la estructura proteica de la seda como se muestra por el espectacular descenso en rigidez.

Finalmente, las muestras 11 a 16 tienen geometrías cableadas comparables; las fibras de las muestra 12, 14 y 16 se extrajeron, mientras que las fibras de las muestras 11, 13 y 15 no. Como se puede ver en la Tabla, la extracción parece haber tenido poco efecto sobre las máximas fuerzas de tracción (altas) por fibra.

Las fibras de la muestra 10 de la Tabla 4 se sometieron a un procedimiento de encogimiento con espirales, en el que las fibras se enrollan en una dirección y después en la dirección opuesta, rápidamente; las fibras después se calentaron para cerrarse en la estructura de giro y se probaron no extraídas. La fuerza y rigidez del hilo resultante fueron comparativamente inferiores a las de la mayoría de los otros hilos no extraídos testados. Sin embargo, las Tablas 7 y 8 muestran la notable habilidad de las fibroínas, tras la extracción, de soportar hasta 30 TPI. La Tabla 6 muestra el efecto de ordenamiento que TPI tiene sobre las matrices de seda probablemente debido al ordenamiento de la estructura con multifilamentos tras la extracción.

La Fig. 10 demuestra las propiedades de un grupo de 39 fibras paralelas de fibroína sembradas y no sembradas en condiciones de cultivo durante 21 días. Estas tres muestras mostraron propiedades mecánicas muy similares, reflejando de este modo poca degradación, si hubo alguna, de matrices de seda debido al crecimiento celular de las mismas o debido a tiempo in vitro. Los valores de rigidez son probablemente mucho más bajos en este experimento en comparación con las otras muestras como resultado de la incubación mojada de 21 días antes de las pruebas mecánicas (véase Tabla 5).

La Tabla 4, muestras 14-16 son todas muestras trenzadas. Las fibras de la muestra 14 se trenzaron a partir de ocho portadores, con un carrete montado sobre cada portador, en el que se extrajeron dos fibras de cada carrete. Las fibras de la muestra 15 se extrajeron de 16 portadores, con un carrete montado sobre cada portador; de nuevo, se extrajeron dos fibras de cada carrete. Finalmente, la muestra 16 se formó a partir de 4 hilos, comprendiendo cada hilo 3 grupos enrollados de cuatro fibras (proporcionando un total de 12 fibras por hilo); cada uno de los hilos se extrajo de un carrete y un portador separado.

La Tabla 9 demuestra el efecto de la modificación de superficie. La designación, "PBS", refleja que las muestras se sumergieron en una solución de tampón fosfato salino durante aproximadamente 24 horas antes de las pruebas. Se midió el efecto de exponer estas muestras a la solución de salino y se proporcionó una indicación de que la construcción de fibra puede mantener sus propiedades mecánicas y sustancialmente preservar la estructura proteica inherente en un medio de salino (por ejemplo, dentro de un cuerpo humano). La designación "RGD" refleja que las muestras se sumergieron en una solución salina de arg-gli-asp (RGD) durante aproximadamente 24 horas antes de

las pruebas. La RGD puede aplicarse a la construcción para atraer células a la construcción y de este modo estimular el crecimiento celular en la misma. Por consiguiente, cualquier efecto de RGD sobre las propiedades mecánicas de la construcción es también de interés, aunque no estuvo claro que hubiera una degradación significativa de la construcción. Por consiguiente, estas muestras ofrecen evidencia de que la exposición prolongada a una solución salina o esterilización con gas de óxido de etileno o a una solución RGD dio como resultado poca, si hubo alguna, degradación de las propiedades del material de las construcciones de fibra. A pesar de ello, los datos asociados a las muestras 28 y 29, en los que la jerarquía geométrica se extendió a un nivel más alto, revelan que UTS/fibra desciende cuando se alcanzan niveles más altos (y aumentó el cómputo total de fibra). Éste es un efecto del diseño jerárquico (Tabla 8) más que de la modificación de superficie.

La Tabla 4, las muestras 18 a 23 se tensaron bajo 6 libras de fuerza constante durante 1, 2, 3, 4, 5 y 6 días, respectivamente, antes de las pruebas para evaluar el efecto de tensión sobre las propiedades mecánicas con el paso del tiempo. De estos datos, no parece que haya habido mucho cambio, si hubo alguno, en las propiedades del material de la construcción cuando el procedimiento de pre-tensión se extendió durante periodos más largos de tiempo. La muestra 25 también se “pre-tensó” (después de enrollarse) a una fuerza de 6 libras durante un día antes de las pruebas; para comparación, la muestra 24, que tenía una configuración geométrica idéntica no se pre-tensó. Las muestras 24 y 25 revelan por lo tanto el efecto de la pre-tensión de la construcción para retirar la parte floja en la estructura, lo que da como resultado una ligera reducción tanto en la UTS de la construcción como en su alargamiento de rotura.

La construcción basada en fibra de seda sirve como una matriz para infiltrarse en células o que ya esté infiltrada o sembrada con células, tales como células de progenitor, fibroblastos de ligamento o tendón o células musculares, que pueden proliferar y/o diferenciar para formar un ligamento cruzado anterior (LCA) u otro tipo de tejido deseado. La nueva construcción basada en fibra de seda está diseñada para tener fibras en cualquiera de una variedad de geometrías de fibra, tales como un cable, o en una estructura entrelazada, tal como un hilo enrollado, trenza, hilo del tipo malla o hilo del tipo tricotado. El hilo muestra propiedades mecánicas que son idénticas o casi idénticas a las de un tejido natural, tales como un ligamento cruzado anterior (véanse las Tablas 4, 1, más adelante); y variaciones simples en la organización y geometría de la construcción de fibra pueden dar como resultado la formación de cualquier tipo de tejido deseado (véase la Tabla 10, más adelante). Como alternativa, para colocar o sujetar un órgano puede formarse una pluralidad de hilos en una tela u otra construcción que está implantada. Además, la construcción puede usarse para llenar cavidades internas tras cirugía o para prevenir las adhesiones de tejidos o estimular el acoplamiento o el crecimiento interno de células.

Las células estromales pluripotentes de médula ósea (BMSC) que están aisladas y cultivadas como se describe en el siguiente ejemplo pueden sembrarse sobre la construcción de fibra de seda y cultivarse en un biorreactor en condiciones estáticas. Si las células sembradas en la construcción de fibras se dirigen adecuadamente, sufrirán una diferenciación específica de ligamento y tendón formando un tejido viable y funcional. Además, las propiedades histomorfológicas de un tejido producido in vitro por bioingeniería generado a partir de células pluripotentes dentro de una construcción de fibra están afectadas por la aplicación directa de fuerza mecánica a la construcción de fibra durante la generación del tejido. Este descubrimiento proporciona nuevas percepciones en la relación entre tensión mecánica, métodos bioquímicos y de inmovilización celular y diferenciación celular, y tiene aplicaciones en la producción de una amplia variedad de ligamentos, tendones y tejidos in vitro a partir de células pluripotentes.

Una construcción de fibra que comprende fibras de seda que tienen una geometría de cable, se ilustra en las Figs. 2C y 2D. La construcción de fibra comprende una jerarquía en términos de la manera en la que las fibras están agrupadas en paralelo y enrollada y cómo el grupo resultante se agrupa y enrolla, etc, a través de una pluralidad de niveles en la jerarquía, como se explica con más detalle, más adelante. Las fibras de seda se tensan primero en paralelo usando, por ejemplo, un estante que tiene pinzas cargadas con un muelle que sirven como anclas para las fibras. El estante puede estar sumergido en la solución de extracción de sericina para que las pinzas puedan mantener una tensión constante sobre las fibras durante la extracción, aclarado y secado.

La solución de extracción puede ser una solución alcalina de jabón o detergente y se mantiene aproximadamente a 90 °C. El estante está sumergido en la solución durante un periodo de tiempo (por ejemplo, al menos 0,5 a 1 hora, dependiendo del flujo de la solución y de las condiciones de mezcla) que es suficiente para retirar toda (+/- 0,4% del resto, por peso) o sustancialmente toda la sericina (contando con un posible residuo de rastro) de las fibras. Después de la extracción, el estante se retira de la solución y las fibras se aclaran y secan. Se usan máquinas de giro controladas por ordenador, cada una de las cuales monta las fibras o las construcciones de fibra alrededor de un perímetro de un disco y rota el disco alrededor de un eje central para girar las fibras (es decir, cableado) o construcciones de fibras giradas una alrededor de otra de acuerdo con los procesos convencionales usados en la industria textil, aunque a una velocidad de inclinación más alta para los giros (por ejemplo, entre aproximadamente 0 y aproximadamente 11,8 giros por cm) que la tradicionalmente producida en hilos tradicionales. La velocidad de cableado o giro, sin embargo, no debería ser tan alta para causar deformación plástica de las fibras como resultado de la tensión de globo creada cuando el hilo se descarga del carrete antes del giro o cableado.

La extracción puede realizarse en cualquier nivel de la construcción siempre y cuando la solución pueda penetrar a través de la construcción para retirar la sericina de todas las fibras. Se cree que el límite superior para el número de fibras en una disposición compacta que todavía puede impregnarse completamente con la solución es

aproximadamente 20-50 fibras. Sin embargo, por supuesto, aquellas fibras pueden disponerse como un grupo de 20 fibras paralelas o, por ejemplo, como 4 grupos de 5 fibras paralelas, en los que los grupos pueden estar enrollados, o incluso una construcción que comprende un nivel aún más alto tal como 2 paquetes de 2 grupos de 5 fibras, en los que los grupos y paquetes pueden estar enrollados. Aumentar el número de niveles jerárquicos en la estructura también puede aumentar el espacio vacío, aumentado de este modo potencialmente el número máximo de fibras de las que la sericina puede extraerse completamente de 20 a 50 fibras.

Debido a que la sericina, en algunos casos, se retira de la construcción después de que las fibras se hayan agrupado o después de que se haya formado una construcción de un nivel más alto, no hay necesidad de aplicar cera u otro tipo de capa mecánicamente protectora sobre las fibras o con el fin de formar también una barrera para prevenir el contacto con sericina sobre las fibras; y la construcción puede estar libre de capas, en general (particularmente estar libre de capas que el cuerpo no degrada completamente o que causan una respuesta inflamatoria).

Como se describe en los ejemplos más adelante, se caracterizaron las propiedades mecánicas de la fibroína de seda (como se ilustra en las Figs. 1A, 1B y 1C), y las geometrías para formar matrices aplicables para producir LCA se derivaron usando un modelo computacional teórico (véase la Fig. 1D). Se eligió una construcción de seis cuerdas para su uso como una sustitución de LCA para aumentar el área de superficie de matriz y para mejorar la sujeción para el crecimiento interno del tejido. Dos jerarquías geométricas de construcción para reparación de LCA comprenden lo siguiente:

Matriz 1: 1 hilo LCA = 6 cuerdas paralelas; 1 cuerda = 3 hebras enrolladas (3 giros/cm); 1 hebra = 6 paquetes enrollados (3 giros/cm); 1 paquete = 30 fibras paralelas lavadas; y

Matriz 2: 1 hilo LCA = 6 cuerdas paralelas; 1 cuerda = 3 hebras enrolladas (2 giros/cm); 1 hebra = 3 paquetes enrollados (2,5 giros/cm); 1 paquete = 3 grupos (3 giros/cm); 1 grupo = 15 fibras paralelas de fibroína de seda extraídas.

El número de fibras y geometrías para la Matriz 1 y Matriz 2 se seleccionaron de tal manera que las prótesis de seda son similares a las propiedades biomecánicas de LCA en fuerza máxima de tracción, rigidez lineal, límite de elasticidad y % de alargamiento de rotura, sirviendo como un sólido punto de inicio para el desarrollo de un LCA producido con tejido. Los efectos de aumentar el número de fibras, número de niveles y cantidad de giros en cada una de estas propiedades biomecánicas se muestran en la Tabla 8 y Tablas 6 y 7, respectivamente.

La habilidad para generar dos matrices con diferentes geometrías ambas dando como resultado propiedades mecánicas que imitan las propiedades de LCA indica que existe una amplia variedad de configuraciones geométricas para conseguir las propiedades mecánicas deseadas. Las geometrías alternativas para cualquier tejido de ligamento o tendón deseado pueden comprender cualquier número, combinación u organización de cuerdas, hebras, paquetes, grupos y fibras (véase la Tabla 10, más adelante) que dan como resultado una construcción de fibra con propiedades mecánicas aplicables que imitan aquellas del ligamento o tendón deseado. Por ejemplo, una prótesis de LCA (1) puede tener cualquier número de cuerdas en paralelo siempre y cuando haya un medio para asegurar la construcción final de fibra *in vitro* o *in vivo*. Además, pueden emplearse varios números de niveles de giros (donde un único nivel se define como un grupo, paquete, hebra o cuerda) para una geometría determinada siempre y cuando la construcción de fibra dé como resultado las propiedades mecánicas deseadas. Además, existe un gran grado de libertad en el diseño de la geometría y organización de la construcción de fibra en la producción de una prótesis de LCA; por consiguiente, el modelo computacional teórico desarrollado puede usarse para pronosticar el diseño de construcción de fibra de un tejido de ligamento o tendón deseado (véase el ejemplo, más adelante). Por ejemplo, cuando se desean múltiples paquetes de matriz más pequeña (por ejemplo, un total de 36 fibras) con solamente dos niveles de jerarquía para estimular el crecimiento interno, se necesita un TPI de 8-11 o ~3-4 giros por cm y puede pronosticarse por el modelo sin necesidad de trabajo empírico.

Como consecuencia, puede usarse una variación en geometría (es decir, el número de cuerdas usadas para hacer una prótesis o el número de fibras en un grupo) para generar matrices aplicables a la mayoría de ligamentos y tendones. Por ejemplo, para ligamentos o tendones más pequeños de la mano, la geometría y organización usadas para generar una única cuerda de Matriz 1 (o dos cuerdas o tres cuerdas, etc.) pueden ser apropiadas dado que la organización de la construcción de fibra da como resultado propiedades mecánicas adecuadas para el medio fisiológico particular. Específicamente, para alojar un ligamento o tendón más pequeño comparado con la Matriz 1 o Matriz 2, se usarían menos fibras por nivel para generar paquetes o hebras más pequeñas. Después podrían usarse múltiples paquetes en paralelo. En el caso de un ligamento más grande tal como LCA, podría ser deseable tener más paquetes más pequeños girados en TPIs más altos para reducir la rigidez y estimular el crecimiento interno en lugar de tener menos paquetes más grandes donde el crecimiento interno no puede darse por lo que hay una degradación limitada de la matriz.

Sin embargo, la invención no está limitada con respecto a la geometría de cable como la descrita, y puede usarse cualquier geometría o combinación de geometrías (por ejemplo, paralela, trenzada, del tipo malla) que dé como resultado propiedades mecánicas de la construcción de fibra similares a las de LCA (es decir, más de 2000 N de fuerza máxima de tracción, entre 100-600 N/mm de rigidez lineal para un LCA nativo o injerto de sustitución

comúnmente usado tal como tendón patelar con una longitud de entre 26 y 30 mm) o al ligamento y tendón deseado que se va a producir. El número de fibras y la geometría de la Matriz 1 y Matriz 2 se seleccionaron para generar mecánicamente las matrices apropiadas de LCA, u otras matrices del ligamento o tendón deseado [por ejemplo, el ligamento cruzado posterior (LCP)]. Por ejemplo, se usó una única cuerda de la construcción de Matriz 1 de seis cuerdas para reconstruir el ligamento colateral medial (LCM) en un conejo (véase la Fig. 15A y la Fig. 15B). Las propiedades mecánicas de las construcciones de seda de seis cuerdas de la Matriz 1 y Matriz 2 están descritas en la Tabla 10 y en las Figs. 3A-3D, como se describe con más detalle en el ejemplo, más adelante. Las geometrías adicionales y sus propiedades mecánicas relacionadas están enumeradas en la Tabla 11 como un ejemplo del alto grado de libertad del diseño que daría como resultado una construcción de fibra aplicable en la producción de tejido de LCA de acuerdo con los métodos aquí descritos.

De manera ventajosa, la construcción de fibra basada en fibra de seda puede consistir solamente en seda. Los tipos y fuentes de seda incluyen los siguientes: sedas de gusanos de seda, tales como *Bombyx mori* y especies relacionadas; sedas de arañas, tales como *Nephila clavipes*; sedas de bacterias producidas genéticamente, de levadura, de células de mamíferos, células de insectos, y plantas y animales transgénicos; sedas obtenidas a partir de células cultivadas a partir de gusanos de seda o arañas; sedas nativas; secuencias totales o parciales clonadas de sedas nativas; y sedas obtenidas a partir de genes sintéticos que codifican seda o secuencias del tipo seda. En su forma cruda, las fibroínas de seda nativa obtenidas a partir de gusanos de seda *Bombyx mori* están cubiertas por una proteína similar al pegamento llamada sericina, que se extrae completamente o esencialmente completamente de las fibras antes de que las fibras que forman la construcción de fibra se siembren con células.

La construcción de fibra pueden comprender un compuesto de: (1) seda y fibras de colágeno; (2) seda y espumas, mallas o esponjas de colágeno; (3) fibras de fibroína de seda y espumas, mallas o esponjas de seda; (4) seda y polímeros biodegradables [por ejemplo, celulosa, algodón, gelatina, polilactida, poliglicólico, poli(lactida-co-glicólido), policaprolactona, poliamidas, polianhídridos, poliaminoácidos, poliortoésteres, poliacetales, proteínas, poliuretanos degradables, polisacáridos, policianoacrilatos, glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de condroitina, heparina, etc.), polisacáridos (nativos, reprocesados o versiones producidas genéticamente: por ejemplo, ácido hialurónico, alginatos, xantanos, pectina, chitosán, chitina y similares), elastina (nativa, reprocesada o versiones producidas genéticamente y químicas), y colágenos (nativos, reprocesados o versiones producidas genéticamente), o (5) seda y polímeros no biodegradables (por ejemplo, poliamida, poliéster, poliestireno, polipropileno, poliacrilato, polivinilo, policarbonato, politetrafluoroetileno, o material de nitrocelulosa. El compuesto generalmente mejora las propiedades de la construcción de fibra tales como la porosidad, degradabilidad, y también mejora la siembra celular, proliferación, diferenciación o desarrollo del tejido. Las Figs. 16A, 16B y 16C ilustran la habilidad de las fibras de colágeno para soportar el crecimiento de BMSC y la diferenciación específica del ligamento.

La construcción de fibra también puede tratarse para aumentar la proliferación celular y/o diferenciación de tejido en la misma. Los tratamientos ejemplares de construcción de fibra para aumentar la proliferación celular y la diferenciación de tejido incluyen, pero no se limitan a, metales, irradiación, entrelazado, modificación química de superficie [por ejemplo, capa peptídica RGD (arg-gli-asp), capa de fibronectina, combinación de factores de crecimiento], y modificaciones de la superficie física.

Un segundo aspecto de esta divulgación se refiere a un LCA mecánicamente y biológicamente funcional formado a partir de una construcción nueva de fibra basada en fibra de seda y células estromales de médula ósea (BMSC) autólogas o alogénicas (dependiendo del receptor del tejido) sembradas sobre la construcción de fibra. La construcción de fibra basada en fibra de seda induce a la diferenciación de célula estromal hacia el linaje del ligamento sin necesidad de ninguna estimulación mecánica durante el cultivo con el biorreactor. Las BMSC sembradas sobre la construcción de fibra basada en fibra de seda y que se cultivaron en una placa de Petri comienzan a unirse y extenderse (véanse las Figs. 7A-D); las células proliferan para cubrir la construcción de fibra (véase Figs. 8A-B, Fig. 9A y Fig. 9B) y se diferencian, como muestra la expresión de marcadores específicos de ligamento (véase la Fig. 14). Los marcadores para cartílago (colágeno tipo III) y para hueso (sialoproteína ósea) no se expresaron (véase la Fig. 14). Los datos que ilustran la expresión de los marcadores específicos de ligamento se establecen en un ejemplo, más adelante.

Otro aspecto de esta divulgación se refiere a un método para producir un LCA ex vivo. Las células capaces de diferenciarse en células de ligamento crecen bajo condiciones que estimulan los movimientos y fuerzas experimentados por un LCA in vivo durante el curso del desarrollo embrionario en la función de ligamento maduro. Específicamente, bajo condiciones estériles, las células pluripotentes se siembran dentro de una construcción de fibra basada en fibra de seda tridimensional a la que las células pueden adherirse y que ventajosamente tiene forma cilíndrica. La construcción de fibra basada en fibra de seda tridimensional usada en el método sirve como una construcción de fibra preliminar, que está complementada y posiblemente incluso sustituida por componentes extracelulares de la construcción de fibra producidos por las células diferenciadoras. El uso de la nueva construcción de fibra basada en fibra de seda puede mejorar o acelerar el desarrollo del LCA. Por ejemplo, la nueva construcción de fibra basada en fibra de seda puede estar diseñada para poseer propiedades mecánicas específicas (por ejemplo, mayor fuerza de tracción) para que pueda soportar fuerzas resistentes antes del refuerzo de los componentes extracelulares de la construcción de fibra (por ejemplo, colágeno y tenascina). Otras propiedades ventajosas de la nueva construcción de fibra preliminar basada en fibra de seda incluyen, sin limitación, la biocompatibilidad y la susceptibilidad a la biodegradación.

Las células pluripotentes pueden estar sembradas dentro de la construcción de fibra preliminar bien antes o después de la formación de la construcción de fibra, dependiendo de la construcción de fibra particular usada y del método de formación de la construcción de fibra. La siembra uniforme es normalmente preferible. En teoría, el número de células sembradas no limita el ligamento final producido; sin embargo, la siembra óptima puede aumentar la velocidad de generación. Las cantidades óptimas de siembra dependerán de las condiciones específicas del cultivo. La construcción de fibra puede sembrarse con desde aproximadamente 0,05 a 5 veces la densidad celular fisiológica de un ligamento nativo.

Se usan uno o más tipos de células pluripotentes en el método. Tales células tienen la habilidad de diferenciarse en una amplia variedad de tipos de células en respuesta a las señales apropiadas de diferenciación y de expresar marcadores específicos de ligamento. Más específicamente, el método usa células, tales como células estromales de médula ósea, que tienen la habilidad de diferenciarse en células de tejido de ligamento y tendón. Si el ligamento resultante generado por bioingeniería va a transplantarse en un paciente, las células deberían derivarse de una fuente que sea compatible con el receptor previsto. Aunque el receptor será generalmente un humano, las aplicaciones en medicina veterinaria también existen. Las células pueden obtenerse del receptor (autólogas), aunque las células de un donante compatible también pueden usarse para hacer ligamentos alogénicos. Por ejemplo, cuando se hacen ligamentos alogénicos (por ejemplo, usando células de otro humano tales como células estromales de médula ósea aisladas de médula ósea donada o fibroblastos de LCA aislados de tejido donado de LCA), podrían usarse células de fibroblasto de ligamento cruzado anterior humano aisladas del tejido intacto de LCA del donante (por ejemplo, cadavérico o de trasplantes totales de rodilla), tejido de LCA desgarrado (por ejemplo, cosechado en el momento de cirugía de un paciente que está sufriendo reconstrucción de LCA) o células estromales de médula ósea. La determinación de la compatibilidad está dentro de los medios del médico experto.

Los ligamentos y tendones que incluyen, aunque no se limitan a, el ligamento cruzado posterior, los tendones del manguito del rotador, el ligamento colateral medial del codo y rodilla, los tendones flexores de la mano, ligamentos laterales del tobillo y tendones y ligamentos de la mandíbula o articulación temporomandibular diferentes de LCA, cartilago, hueso y otros tejidos pueden generarse mediante ingeniería con la construcción de fibra de acuerdo con los métodos de esta divulgación. De esta manera, las células que van a sembrarse sobre la construcción de fibra se seleccionan de acuerdo con el tejido a ser producido (por ejemplo, pluripotente o del tipo de tejido deseado). Las células sembradas sobre la construcción de fibra, como aquí se describe, pueden ser autólogas o alogénicas. El uso de células autólogas crea eficazmente un aloinjerto o autoinjerto para implantación en un receptor.

Como se vuelve a mencionar, para formar un LCA, se siembran células tales como células estromales de médula ósea sobre la construcción de fibra. Las células estromales de médula ósea son un tipo de células pluripotentes y también son referidas en la técnica como células madre mesenquimales o simplemente células estromales. Como se vuelve a mencionar, la fuente de estas células puede ser autóloga o alogénica. Además, células de adulto o células madre embrionarias o células pluripotentes pueden usarse si el medio apropiado (bien in vivo o in vitro), sembrado sobre la construcción de fibra basada en fibra de seda, puede recapitular un ALC o cualquier otro ligamento o tejido deseado en la composición extracelular de construcción de fibra (por ejemplo, proteína, contenido de glicoproteína), organización, estructura o función.

Las células de fibroblasto también pueden sembrarse sobre la construcción de fibra inventiva. Debido a que las células de fibroblasto no son a menudo referidas como células pluripotentes, los fibroblastos pretenden incluir fibroblastos de LCA de humano maduro (autólogos o alogénicos) aislados del tejido de LCA, fibroblastos de otro tejido de ligamento, fibroblastos de tejido de tendón, de prepucio neonatal, de sangre del cordón umbilical, o de cualquier célula, ya sea madura o pluripotente, desdiferenciada madura, o producida genéticamente, de manera que cuando se cultivan en el medio apropiado (bien in vivo o in vitro), y se siembran sobre la construcción de fibra basada en fibra de seda, puedan recapitular un LCA o cualquier otro ligamento o tejido deseado en la composición extracelular de la construcción de fibra (por ejemplo, proteína, contenido de glicoproteína), organización, estructura o función.

Las caras del cilindro de la construcción de fibra están individualmente acopladas a anclas, a través de las cuales se ejercerá una variedad de fuerzas a la construcción de fibra. Para facilitar el envío de fuerza a la construcción de fibra, la superficie completa de cada respectiva cara de la construcción de fibra puede estar en contacto con la cara de las respectivas anclas. Las anclas con una forma que refleja el área de acoplamiento (por ejemplo, cilíndrica) son las más adecuadas para su uso en este método. Una vez montadas, las células en la construcción de fibra fijada se cultivan bajo condiciones apropiadas para el crecimiento celular y la regeneración. La construcción de fibra se somete a una o más fuerzas mecánicas aplicadas a través de las ondas acopladas (por ejemplo, por medio de movimiento de una o ambas de las anclas acopladas) durante el curso del cultivo. Las fuerzas mecánicas se aplican durante el periodo de cultivo para imitar las condiciones experimentadas por el ALC nativo u otros tejidos in vivo.

Las anclas deben estar hechas de un material adecuado para el acoplamiento de la construcción de fibra, y el acoplamiento resultante debería ser lo suficientemente fuerte como para soportar la tensión de las fuerzas mecánicas aplicadas. Además, las anclas pueden ser de un material que sea adecuado para el acoplamiento de la construcción de fibra extracelular que las células diferenciadoras producen. Las anclas soportan tejido óseo en crecimiento (bien in vitro o in vivo) mientras sujetan el ligamento que se está desarrollando. Algunos ejemplos de material adecuado para ancla incluyen, sin limitación, hidroxapatita, coral Goniopora, hueso desmineralizado, hueso

(alógeno o autógeno). Los materiales del ancla también pueden incluir titanio, acero inoxidable, polietileno de alta densidad, DACRON y TEFLON.

Como alternativa, el material del ancla puede crearse o además mejorarse impregnando un material seleccionado con un factor que estimule bien el enlace de construcción de fibra del ligamento o el enlace de construcción de fibra del hueso o ambos. Se considera que el término "impregnar" incluye cualquier método de aplicación que distribuye apropiadamente el factor en el ancla (por ejemplo, cubriendo, extendiéndose, contactando). Ejemplos de tales factores incluyen sin limitación laminina, fibronectina, cualquier proteína extracelular de la construcción de fibra que estimule la adhesión, seda, factores que contengan regiones de enlace peptídico de arginina-glicina-aspartato (RGD) o los propios péptidos RGD. Los factores de crecimiento o la proteína morfogénica ósea también pueden usarse para mejorar el acoplamiento del ancla. Además, las anclas pueden pre-sembrarse con células (por ejemplo, células madre, células de ligamento, osteoblastos, células progenitoras osteogénicas) que se adhieren a las anclas y se unen a la construcción de fibra, para producir un acoplamiento mejorado de construcción de fibra tanto in vitro como in vivo.

En la solicitud en trámite junto con la presente del mismo solicitante U.S.S.N. 09/950.561 se desvela un sistema de ancla ejemplar. La construcción de fibra está acoplada a las anclas por medio de un contacto con la cara del ancla o alternativamente por medio de una penetración real del material de la construcción de fibra a través del material del ancla. Debido a que la fuerza aplicada a la construcción de fibra por medio de las anclas dicta el ligamento final producido, el tamaño del ligamento final producido es, en parte, dictado por el tamaño del área de acoplamiento del ancla. Debería usarse un ancla del tamaño apropiado para el ligamento final deseado. Un ejemplo de forma de ancla para la formación de un LCA es un cilindro. Sin embargo, otros tamaños y formas de ancla también funcionarán adecuadamente. Por ejemplo, las anclas pueden tener el tamaño y la composición apropiados para la inserción directa en túneles óseos en el fémur y tibia de un receptor del ligamento producido por bioingeniería.

Como alternativa, las anclas solo pueden usarse temporalmente durante el cultivo in vitro, y después retirarse cuando la construcción de fibra se implante sola in vivo.

Incluso además, la nueva construcción de fibra basada en fibra de seda puede sembrarse con las BMSC y cultivarse en un biorreactor. Actualmente existen dos tipos de medios de crecimiento que pueden usarse de acuerdo con los métodos de esta divulgación: (1) el sistema del aparato biorreactor in vitro, y (2) el menisco in vivo, que sirve como un "biorreactor" ya que proporciona el ambiente fisiológico que incluye células progenitoras y estímulos (tanto químicos como físicos) necesarios para el desarrollo de un LCA viable dada una construcción de fibra con propiedades biocompatibles y mecánicas apropiadas. El aparato biorreactor proporciona condiciones óptimas de cultivo para la formación de un ligamento en términos de diferenciación y producción de construcción de fibra extracelular (MEC), y que de este modo proporciona el ligamento con propiedades mecánicas y biológicas óptimas antes de la implantación en un receptor. Además, cuando la construcción de fibra basada en fibra de seda se siembra y cultiva in vitro, una placa de Petri puede considerarse el biorreactor dentro de la cual existen las condiciones apropiadas para el crecimiento celular y la regeneración, es decir, un medio estático.

Las células también pueden cultivarse sobre la construcción de fibra sin la aplicación de ninguna fuerza mecánica, es decir, en un medio estático. Por ejemplo, la construcción de fibra basada en fibra de seda sola, sin fuerzas mecánicas ni estimulación aplicadas in vitro, cuando se siembra y cultiva con las BMSC, induce a las células a proliferar y expresar marcadores específicos de ligamento y tendón (véase los ejemplos, aquí descritos). El menisco puede servir como un medio de crecimiento y desarrollo fisiológico que puede proporcionar las células y las señales ambientales correctas (químicas y físicas) a la construcción de fibra de manera que técnicamente se desarrolla un LCA. Por lo tanto, el menisco (como su propia forma de biorreactor) más la construcción de fibra (bien no sembrada, sembrada y no diferenciada in vitro, o sembrada y diferenciada in vitro antes de la implantación) dará como resultado el desarrollo de un LCA, u otro tejido deseado dependiendo del tipo de célula sembrada sobre la construcción de fibra y la localización anatómica de la implantación de la construcción de fibra. Las Figs. 15 A-B ilustran los efectos del medio del menisco colateral medial sobre el desarrollo del ligamento colateral medial (LCM) cuando solamente una construcción de fibra basada en seda no sembrada con las propiedades mecánicas apropiadas de LCM se implanta durante 6 semanas in vivo. Ya se hayan cultivado las células en un medio estático sin aplicarse estimulación mecánica, o en un medio dinámico, tal como en un aparato biorreactor, las condiciones apropiadas para el crecimiento celular y la regeneración están ventajosamente presentes para la producción del ligamento o tejido deseado.

En los experimentos descritos en los ejemplos, más adelante, la estimulación mecánica aplicada demostró influir en la morfología, y organización celular de las células progenitoras dentro del tejido resultante. Los componentes extracelulares de la construcción de fibra segregados por las células y la organización de la construcción de fibra extracelular en todo el tejido también estuvieron significativamente influenciados por las fuerzas aplicadas a la construcción de fibra durante la generación del tejido. Durante la generación del tejido in vitro, las células y la construcción de fibra extracelular se alinearon a lo largo del eje de carga, reflejando la organización in vivo de un LCA nativo que también está a lo largo de varios ejes de carga producidos por el movimiento y la función del menisco natural. Estos resultados sugieren que los estímulos físicos experimentados en esencia por las células del tejido que se está desarrollando, tal como LCA, juegan un papel significativo en la diferenciación de células progenitoras y formación de tejidos. Además indican que este papel puede duplicarse eficazmente in vitro mediante

manipulación mecánica para producir un tejido similar. Cuanto más se parezcan las fuerzas producidas por la manipulación mecánica a las fuerzas experimentadas por un LCA in vivo, más se parecerá el tejido resultante a un LCA nativo.

5 Cuando la estimulación mecánica se aplica in vitro a la construcción de fibra por medio de un biorreactor, existe un control independiente pero concurrente sobre la tensión cíclica y de rotación cuando se aplica a un ancla con respecto a la otra ancla. Como alternativa, la construcción de fibra sola pueden implantarse in vivo, sembrarse con células de LCA del paciente y exponerse in vivo a las señalización mecánica a través del paciente.

10 Cuando la construcción de fibra se siembra con células antes de la implantación, las células se cultivan dentro de la construcción de fibra bajo condiciones apropiadas para el crecimiento y diferenciación celular. Durante el proceso de cultivo, la construcción de fibra puede estar sometida a una o más fuerzas mecánicas a través del movimiento de una o ambas anclas acopladas. Las fuerzas mecánicas de tensión, compresión, torsión y rotura, y combinaciones de las mismas, se aplican en las combinaciones, magnitudes y frecuencias apropiadas para imitar los estímulos mecánicos experimentados por un LCA in vivo.

15 Varios factores influirán en la cantidad de fuerza que la construcción de fibra puede tolerar (por ejemplo, la composición de construcción de fibra, densidad de fibra). Se espera que la fuerza de la construcción de fibra cambie a lo largo del curso del desarrollo del tejido. Por lo tanto, las fuerzas mecánicas o tensiones aplicadas aumentarán, disminuirán o permanecerán constantes en magnitud, duración, frecuencia y variedad durante el periodo de generación del ligamento, para corresponder apropiadamente con la fuerza de construcción de fibra en el momento de la aplicación.

20 Cuando se produce un LCA, cuanto más precisan sean la intensidad y la combinación de estímulos aplicados a las construcción de fibra durante el desarrollo del tejido, más se parecerá el ligamento resultante a un LCA nativo. Deben considerarse dos tejidos en lo que respecta a la función natural del LCA cuando se concibe el régimen de fuerza mecánica in vitro que imita mucho el medio in vivo: (1) los diferentes tipos de movimiento experimentados por el LCA y las respuestas del LCA a los movimientos del menisco y (2) la extensión de las tensiones mecánicas experimentadas por el ligamento. Las combinaciones específicas de los estímulos mecánicos están generadas por los movimientos naturales de la estructura de la rodilla y se transmiten al LCA nativo.

30 Para describir brevemente los movimientos de la rodilla, la conexión de la tibia y el fémur por el LCA proporciona seis grados de libertad cuando se consideran los movimientos de los dos huesos uno en relación con el otro. La tibia puede moverse en tres direcciones y puede rotar en relación con los ejes para cada una de estas tres direcciones. Se impide que la rodilla alcance los niveles completos de estos seis grados de libertad debido a la presencia de ligamentos y fibras capilares y las propias superficies de las rodillas (Biden y col., "Experimental Methods Used to Evaluate Knee Ligament Function", Knee Ligaments: Structure, Function, Injury and Repair, Ed. D. Daniel y col., Raven Press, págs. 135-151, 1990). También son posibles pequeños movimientos traslacionales. Las áreas de acoplamiento del LCA son responsables de sus papeles estabilizadores en el menisco. El LCA funciona como un estabilizador primario de traslación anterior-tibial, y como un estabilizador secundario de angulación valgus-varus y rotación tibial (Shoemaker y col., "The Limits of Knee Motion", Knee Ligaments: Structure, Function, Injury and Repair, Ed. D. Daniel y col., Raven Press, págs. 153-161, 1990). Por lo tanto, el LCA es responsable de estabilizar la rodilla en tres de los seis posibles grados de libertad. Como resultado, el ALC ha desarrollado una organización específica de fibra y una estructura general para realizar estas funciones estabilizadoras. Estas condiciones se estimulan in vitro para producir un tejido con una estructura y una organización de fibra similares.

40 La extensión de las tensiones mecánicas experimentadas por el LCA puede resumirse de manera similar. El LCA sufre cargas cíclicas de aproximadamente 400 N entre uno y dos millones de ciclos por año (Chen y col., J. Biomed. Mat. Res. 14: 567-586, 1980). También se consideran la rigidez lineal (~182 N/mm), la deformación máxima (100% de LCA) y la energía absorbida en fallo (12,8 N-m) (Woo y col., The tensile properties of human anterior cruciate ligament (ACL) and ACL graft tissues, Knee Ligaments: Structure, Function, Injury and Repair, Ed. D. Daniel y col., Raven Press, págs. 279-289, 1990) cuando se desarrolla una sustitución quirúrgica de LCA.

50 La sección de ejemplos, más adelante, detalla la producción de un ligamento cruzado anterior (LCA) prototipo producido por bioingeniería ex vivo. Las fuerzas mecánicas que imitan un subconjunto de los estímulos mecánicos experimentados por un LCA nativo in vivo (deformación rotacional y deformación lineal) se aplicaron en combinación, y se estudió el ligamento resultante que se formó para determinar los efectos de las fuerzas aplicadas sobre el desarrollo del tejido. La exposición del ligamento en desarrollo a la carga fisiológica durante la formación in vitro indujo a las células a adoptar una orientación definida a lo largo de los ejes de carga, y también a generar matrices extracelulares a lo largo de los ejes. Estos resultados indican que la incorporación de fuerzas mecánicas complejas multi-dimensionales en el régimen para producir una red más compleja de ejes de carga que imite el entorno del LCA nativo producirá un ligamento producido por bioingeniería que se parezca mucho a un LCA nativo.

55 Las diferentes fuerzas mecánicas que pueden aplicarse incluyen, sin limitación, tensión, compresión, torsión y rotura. Estas fuerzas se aplican en combinaciones que estimulan las fuerzas experimentadas por un LCA en el curso de los movimientos y la función natural del menisco. Estos movimientos incluyen, sin limitación, extensión y flexión del menisco como se define en el plano coronal y sagital, y flexión del menisco. Óptimamente, la combinación de

- fuerzas aplicadas imita los estímulos mecánicos experimentados por un ligamento cruzado anterior in vivo de manera tan precisa como lo es experimentalmente posible. Se espera que la variación del régimen específico de aplicación de fuerza durante el curso de generación del ligamento influya en la velocidad y resultado del desarrollo del tejido, con condiciones óptimas que se determinarán empíricamente. Las variables potenciales en el régimen incluyen, sin limitación: (1) velocidad de tensión, (2) porcentaje de tensión, (3) tipo de tensión (por ejemplo, traslación y rotación), (4) frecuencia, (5) número de ciclos dentro de un régimen dado, (6) número de regímenes diferentes, (7) duración en puntos extremos de deformación de ligamento, (8) niveles de fuerza, y (9) diferentes combinaciones de fuerza. Existe una amplia variedad de variaciones. El régimen de fuerzas mecánicas aplicadas puede producir fibras helicoidalmente organizadas similares a las del ligamento nativo, descrito más adelante.
- Los paquetes de fibra de un ligamento nativo están dispuestos en una organización helicoidal. El modo de acoplamiento y la necesidad del menisco para rotar ~140° de flexión ha dado como resultado que el LCA nativo herede un giro de 90° y que los paquetes periféricos de fibra desarrollen una organización helicoidal. Esta característica biomecánica única permite que el LCA mantenga una carga extremadamente alta. En el LCA funcional, esta organización helicoidal de fibras permite que las fibras anteriores-posteriores y posteriores-anteriores permanezcan relativamente isométricas unas con respecto a otras para todos los grados de flexión, por lo que la carga puede distribuirse igualmente a todos los paquetes de fibra en cualquier grado de flexión del menisco, estabilizando la rodilla en todos los niveles de movimiento de la articulación. Las fuerzas mecánicas que estimulan una combinación de flexión del menisco y extensión del menisco pueden aplicarse al ligamento en desarrollo para producir un LCA producido por ingeniería que posee esta misma organización helicoidal. El aparato mecánico usado en el experimento presentado en los ejemplos, más adelante, proporciona control sobre la tensión y las velocidades de tensión (tanto traslacional como rotacional). El aparato mecánico controlará la carga real experimentada por los ligamentos que están creciendo, que sirve para "enseñar" a los ligamentos con el paso del tiempo a través del control y el aumento de los regímenes de carga.
- Otro aspecto de esta divulgación se refiere al ligamento cruzado anterior generado por bioingeniería producido por los métodos anteriormente descritos. El ligamento generado por bioingeniería producido por estos métodos está caracterizado por el patrón de rizo de la orientación celular y/o construcción de fibra en la dirección de las fuerzas mecánicas aplicadas durante su generación. El ligamento también está caracterizado por la producción/presencia de componentes celulares de la construcción de fibra (por ejemplo, colágeno de tipo I y tipo III, fibronectina y proteínas tenascina-C) a lo largo del eje de carga mecánica experimentada durante el cultivo. Los paquetes de fibra de ligamento pueden estar dispuestos en una organización helicoidal, como se ha tratado anteriormente.
- Los métodos anteriores que usan la nueva construcción de fibras basada en fibra de seda no están limitados a la producción de un LCA, sino que también pueden usarse para producir otros ligamentos y tendones encontrados en la rodilla (por ejemplo, ligamento cruzado posterior) u otras partes del cuerpo (por ejemplo, mano, muñeca, tobillo, codo, mandíbula y hombro), tales como por ejemplo, pero sin limitar a, ligamento cruzado posterior, tendones del manguito del rotador, ligamento colateral medial del codo y rodilla, tendones flexores de la mano, ligamentos laterales del tobillo y tendones y ligamentos de la mandíbula o articulación temporomandibular. Todas las articulaciones móviles en un cuerpo humano tiene ligamentos especializados que conectan las extremidades articulares de los huesos en las articulaciones. Cada ligamento en el cuerpo tiene una estructura y organización específica que está dictada por su función y entorno. Los varios ligamentos del cuerpo, sus localizaciones y funciones están enumeradas en *Anatomy, Descriptive and Surgical* (Gray, H., Eds. T. P., Howden, R., Bounty Books, New York, 1977). Determinando los estímulos físicos experimentados por un ligamento o tendón dado, e incorporando fuerzas que imitan estos estímulos, el método anteriormente descrito para producir un LCA ex vivo puede adaptarse para producir ligamentos y tendones generados por bioingeniería ex vivo que estimula cualquier ligamento o tendón en el cuerpo.
- El tipo específico de ligamento o tendón a ser producido se predetermina antes de la generación del tejido ya que varios aspectos del método varían con las condiciones específicas experimentadas in vivo por el ligamento o tendón nativo. Las fuerzas mecánicas a las que el ligamento o tendón en desarrollo está sometido durante el cultivo celular se determinan para el tipo particular de ligamento o tendón que se está cultivando. Las condiciones específicas pueden determinarse estudiando el ligamento o tendón nativo y su entorno y función. Una o más fuerzas mecánicas experimentadas por el ligamento o tendón in vivo se aplican a la construcción de fibra durante el cultivo de las células en la construcción de fibra. El médico experto reconocerá que un ligamento o tendón que es superior a aquellos actualmente disponibles puede producirse mediante la aplicación de un subconjunto de fuerzas experimentadas por el ligamento o tendón nativo. Sin embargo, óptimamente, la completa variedad de fuerzas in vivo se aplicarán a la construcción de fibra en las magnitudes y combinaciones apropiadas para producir un producto final que se parezca lo más posible al ligamento o tendón nativo. Estas fuerzas incluyen, sin limitación, las fuerzas descritas anteriormente para la producción de un LCA. Debido a que las fuerzas mecánicas aplicadas varían con el tipo de ligamento o tendón, y el tamaño final del ligamento o tendón estará influenciado por las anclas usadas, el médico experto determinará la composición óptima del ancla, el tamaño y las áreas de acoplamiento de la construcción de fibra para cada tipo de ligamento o tendón. El tipo de células sembradas sobre la construcción de fibra obviamente se determina en base al tipo de ligamento o tendón a ser producido.

Pueden producirse ex vivo otros tipos de tejido usando métodos similares a los descritos anteriormente para la generación de ligamentos o tendones ex vivo. Los métodos anteriormente descritos también pueden aplicarse para

producir una variedad de productos de ingeniería de tejidos que implican la deformación mecánica como una parte principal de su función, tales como músculo (por ejemplo, músculo liso, músculo óseo, músculo cardíaco), hueso, cartílago, discos vertebrales, y algunos tipos de vasos sanguíneos. Las células estromales de médula ósea poseen la habilidad de diferenciarse entre estos así como otros tejidos. La geometría de la construcción de fibra basada en seda o construcción compuesta de fibra puede adaptarse fácilmente a la correcta configuración anatómica geométrica del tipo de tejido deseado. Por ejemplo, las fibras de fibroína de seda pueden reformarse en un tubo cilíndrico para recrear arterias.

Los resultados presentes en los ejemplos, más adelante, indican que el crecimiento en un entorno que imita el entorno mecánico específico de un tipo de tejido dado inducirá a la apropiada diferenciación celular para producir un tejido generado por bioingeniería que se parece significativamente al tejido nativo. Las variedades y tipos de deformación mecánica de la construcción de fibra pueden extenderse para producir una amplia variedad de organización estructural de tejido. El ambiente del cultivo celular puede reflejar el ambiente in vivo experimentado por el tejido nativo y las células que contiene, durante el curso del desarrollo embrionario a la función madura de las células dentro del tejido nativo, de la manera más precisa posible. Los factores a considerar cuando se diseñan condiciones específicas de cultivo para producir un tejido dado incluyen, sin limitación, la composición de la construcción de fibra, el método de inmovilización celular, el método de fijación de la construcción de fibra o tejido, las fuerzas específicas aplicadas, y el medio del cultivo celular. El régimen específico de estimulación mecánica depende del tipo de tejido a producirse, y se establece variando la aplicación de fuerzas mecánicas (por ejemplo, solamente tensión, solamente torsión, combinación de tensión y torsión, con o sin rotura, etc.), la amplitud de la fuerza (por ejemplo, ángulo o alargamiento), la frecuencia y duración de la aplicación, y la duración de los periodos de estimulación y descanso.

El método para producir el tipo específico de tejido ex vivo es una adaptación del método anteriormente descrito para producir un LCA. Los componentes implicados incluyen células pluripotentes, una construcción de fibra tridimensional a la que las células pueden adherirse, y una pluralidad de anclas que tienen una cara adecuada para el acoplamiento de la construcción de fibra. Las células pluripotentes (tales como células estromales de médula ósea) se siembran en la construcción de fibra tridimensional por medio de la inmovilización uniforme de las células dentro de la construcción de fibra. El número de células sembradas tampoco se ve como limitativo, sin embargo, sembrar la construcción de fibra con una alta densidad de células podría acelerar la generación de tejido.

Las fuerzas específicas aplicadas se determinarán para cada tipo de tejido producido a través del examen de tejido nativo y los estímulos mecánicos experimentados in vivo. Un tipo dado de tejido experimenta fuerzas características que están dictadas por la localización y función del tejido dentro del cuerpo. Por ejemplo, el cartílago es conocido por experimentar una combinación de rotura y compresión/tensión in vivo; el hueso experimenta compresión.

También pueden incorporarse estímulos adicionales (por ejemplo, estímulos químicos, estímulos electromagnéticos) a los métodos anteriormente mencionados para producir ligamentos, tendones y otros tejidos generados por bioingeniería. La diferenciación celular es conocida por estar influenciada por estímulos químicos del entorno, a menudo producidos por células circundantes, tales como factores segregados de crecimiento o diferenciación, contacto célula-célula, gradientes químicos y niveles específicos de pH, por nombrar unos pocos. Los tipos de tejido más especializados experimentan otros estímulos más únicos (por ejemplo, la estimulación eléctrica del músculo cardíaco). Se espera que la aplicación de tales estímulos específicos de tejido (por ejemplo, 1-10 ng/ml factor transformador del crecimiento beta-1 (TGF- β 1) independientemente o junto con las fuerzas mecánicas apropiadas facilite la diferenciación de las células en un tejido de la manera que más se aproxime al tejido natural específico.

Los tejidos producidos por los métodos anteriormente descritos proporcionan un conjunto ilimitado de equivalentes de tejido para implantación quirúrgica en un receptor compatible, particularmente para sustitución o reparación de tejido dañado. Los tejidos producidos por ingeniería también pueden utilizarse para estudios in vitro de función de tejido normal o patológica, por ejemplo, para prueba in vitro de respuestas a nivel de célula y tejido a manipulaciones moleculares, mecánicas o genéticas. Por ejemplo, pueden usarse tejidos basados en células normales o transfectadas para evaluar respuestas de tejidos a estímulos bioquímicos o mecánicos, identificar las funciones de genes específicos o productos genéticos que pueden estar sobre expresados o noqueados, o para estudiar los efectos de agentes farmacológicos. Tales estudios probablemente permitirán comprender mejor el desarrollo del ligamento, tendón y tejido, función normal y patológica, y finalmente llevar hacia sustituciones por ingeniería de tejidos completamente funcionales, basadas en parte en enfoques de ingeniería de tejidos ya establecidos, nuevos elementos de comprensión en la diferenciación celular y desarrollo de tejido, y el uso de señales mecánicas reguladoras junto con factores bioquímicos derivados de células y exógenos para mejorar las propiedades estructurales y funcionales del tejido.

La producción de tejidos por ingeniería, tales como ligamentos y tendones, también tiene el potencial para aplicaciones tales como cosecha de células estromales de médula ósea de individuos a un alto riesgo de lesión de tejido (por ejemplo, ruptura de LCA) antes de la lesión. Estas células podrían almacenarse hasta necesitarse o sembrarse en la construcción de fibra adecuada y diferenciarse in vitro bajo estímulos mecánicos para producir una variedad de tejidos protésicos producidos por bioingeniería que se mantendrán en reserva hasta que el donante los necesite. El uso de prótesis de tejido vivo producido por bioingeniería que mejor se ajusta al entorno biológico in vivo y que proporciona la carga fisiológica requerida para mantener, por ejemplo, el equilibrio dinámico de un ligamento

normal completamente funcional, debería reducir el tiempo de rehabilitación para un receptor de una prótesis de meses a semanas, particularmente si el tejido se ha pre-cultivado y almacenado. Los beneficios incluyen una recuperación más rápida de la actividad funcional, estancias más cortas en el hospital, y menos problemas con los rechazos y fallos del tejido.

- 5 Los aspectos adicionales de esta invención se ejemplifican con más detalle en los siguientes ejemplos. Para aquellos expertos en la técnica resultará aparente que pueden practicarse muchas modificaciones, tanto a los materiales como a los métodos, sin partir de la invención.

En un primer ejemplo, las fibras crudas del gusano de seda *Bombyx mori*, mostradas en la Fig. 1A, se extrajeron para retirar la sericina, la proteína similar al pegamento que cubre la fibroína de seda nativa (véanse las Figs. 1A-C). El número apropiado de fibras por grupo se dispusieron en paralelo y se extrajeron en una solución acuosa de 0,02 M Na_2CO_3 y 0,3% (por peso) de solución de jabón IVORY durante 60 minutos a 90 °C, después se aclararon completamente con agua para extraer las proteínas de sericina similares al pegamento.

- 10 El número apropiado de fibras por grupo se dispusieron en paralelo y se extrajeron en una solución acuosa de 0,02 M Na_2CO_3 y 0,3% (por peso) de solución de jabón IVORY durante 60 minutos a 90 °C, después se aclararon completamente con agua para extraer las proteínas de sericina similares al pegamento.
- 15 Se derivó la ecuación de Costello para una geometría de cuerda helicoidal con tres hebras para pronosticar las propiedades mecánicas de la construcción basada en fibra de seda. El modelo derivado es una serie de ecuaciones que cuando se combinan tienen en cuenta las propiedades de material de fibra de seda extraída y la jerarquía geométrica de la construcción de fibra deseada para computar la fuerza y rigidez totales de la construcción de fibra como una función del ángulo de inclinación para un nivel dado de jerarquía geométrica.

- 20 Las propiedades del material de una fibra sencilla de seda incluyen diámetro de fibra, módulo de elasticidad, relación de Poisson, y la fuerza máxima de tracción (UTS). La jerarquía geométrica puede definirse como el número de niveles de giro en un nivel de construcción de fibra dada. Cada nivel (por ejemplo, grupo, paquete, hebra, cuerda, ligamento) se define además por el número de grupos de fibras enrolladas una alrededor de la otra y el número de fibras en cada grupo del primer nivel enrollado donde el primer nivel se define como un grupo, el segundo nivel como un paquete, el tercero como una hebra y el cuarto como una cuerda, el quinto como el ligamento.

- 25 El modelo asume que cada grupo de múltiples fibras actúa como una única fibra con un radio efectivo determinado por el número de fibras individuales y su radio inherente, es decir, el modelo reduce la fricción entre las fibras individuales debido a su limitado papel en un ángulo dado con inclinación relativamente alta.

- 30 Dos geometrías aplicables (Matriz 1 y Matriz 2) de las muchas configuraciones geométricas de construcción de fibra (véase Tabla 10, arriba) calculadas para producir propiedades mecánicas que imitan las de un LCA nativo se derivaron para un análisis más detallado. Se seleccionó una construcción de seis cuerdas para su uso como la sustitución de LCA. Las configuraciones de la matriz son las siguientes: Matriz 1: 1 prótesis LCA = 6 cuerdas paralelas; 1 cuerda = 3 hebras enrolladas (3 giros/cm); 1 hebra = 6 paquetes enrollados (3 giros/cm); 1 paquete = 30 fibras paralelas lavadas; y Matriz 2: 1 matriz LCA= 6 cuerdas paralelas; 1 cuerda = 3 hebras enrolladas (2 giros/cm); 1 hebra = 3 paquetes enrollados (2,5 giros/cm); 1 paquete = 3 grupos (3 giros/cm); 1 grupo = 15 fibras paralelas de fibroína de seda extraída. El número de fibras y geometrías se seleccionaron de manera que las prótesis de seda fueran similares a las propiedades biomecánicas de LCA en UTS, rigidez lineal, límite de elasticidad y % de alargamiento de rotura (véase Tabla 10, arriba), sirviendo de este modo como un sólido punto de inicio para el desarrollo de un LCA producido por ingeniería de tejidos.

- 35 Las propiedades mecánicas de la fibroína de seda se caracterizaron usando un sistema servo hidráulico de tensión/compresión Instron 8511 con software Fast-Track (Instron Corp., Canton, Massachusetts, USA) (véase la Fig. 1D). Los análisis individuales de tirar-hasta-fallo y fatiga se realizaron sobre fibras de seda sencilla, fibroína extraída y cuerdas organizadas. Las fibras y la fibroína se organizaron en las geometrías helicoidales paralelas de la Matriz 1 (véase la Fig. 2C) y de la Matriz 2 (véase la Fig. 2D) para su caracterización. La prueba individual de tirar hasta fallo se realizó a una velocidad de tensión de 100%/s; se generaron los histogramas de alargamiento de fuerza y los datos se analizaron usando el software Instron Series IX. Tanto la Matriz 1 como la Matriz 2 produjeron propiedades mecánicas y de fatiga similares a las del LCA en UTS, rigidez lineal, límite de elasticidad y porcentaje de alargamiento de rotura (véase la Tabla 10 y las Figs. 3A-D).

- 40 Los análisis de fatiga se realizaron usando un sistema servo hidráulico de tensión/compresión Instron 8511 con software Wavemaker sobre cuerdas individuales tanto de la Matriz 1 como de la Matriz 2. Los datos se extrapolaron para representar la prótesis de LCA de 6 cuerdas, que se muestra en las Figs. 3B y 3D. Los extremos de la cuerda se insertaron en un molde de epoxi para generar una construcción de 3 cm de largo entre las anclas. Los ciclos hasta fallo en UTS de 1.680 N y 1.200 N (n=5 para cada carga) para la Matriz 1 (véase la Fig. 3B) y UTS de cargas de 2280 N, 2100 N y 1800 N (n=3 para cada carga) para la Matriz 2 (véase la Fig. 3D) se determinaron usando una función de onda sinodal H a 1 Hz generada por el software Wavemaker 32 versión 6.6 (Instron Corp.). La prueba de fatiga se realizó en una solución de tampón fosfato salino (PBS) a temperatura ambiente.

- 45 La retirada completa de sericina se observó después de 60 minutos a 90 °C como lo determinó SEM (véanse las Figs. 1A-C). La retirada de sericina de las fibras de seda alteró la ultraestructura de las fibras, dando como resultado una superficie más lisa de fibra, y la fibroína de seda subyacente se reveló (mostrada en las Figs. 1A-C), con un diámetro medio que oscilaba entre 20 y 40 μm . La fibroína mostró un significativo descenso del 15,2% en la fuerza

máxima de tracción (1,033 +/- 0,042 N/fibra a 0,876 +/- 0,1 N/fibra) ($p < 0,05$, prueba t de Student pareada) (véase la Fig. 1D). Las propiedades mecánicas de las matrices de seda optimizada (véanse las Figs. 2A-D y Figs. 3A-D) están resumidas en la Tabla 11 y en la Fig. 3A (para Matriz 1) y Fig. 3C (para Matriz 2). A partir de estos resultados es evidente que la matrices de seda optimizada mostraron valores comparables a los de LCA nativo, que han confirmado tener una fuerza máxima de tracción media (UTS) de ~2100 N, rigidez de ~250 N/nm, límite de elasticidad ~2100 N y 33% de alargamiento de rotura (Véase Woo, SL-Y, y col, The Tensile Properties of Human Anterior Cruciate Ligament (ACL) and ACL Graft Tissue in Knee Ligaments: Structure, Function, Injury and Repair, 279-289, Ed. D. Daniel y col., Raven Press 1990).

Los análisis de regresión de los datos de fatiga de la construcción de fibra, mostrados en la Fig. 3B para la Matriz 1 y Fig. 3D para la Matriz 2, cuando se extrapolan a niveles de carga fisiológica (400 N) pronostican el número de ciclos hasta fallo in vivo, indican una vida de construcción de fibra de 3,3 millones de ciclos para la Matriz 1 y una vida de más de 10 millones de ciclos para la Matriz 2. El diseño de construcción de fibra helicoidal que utiliza fibras de seda lavada dio como resultado una construcción de fibra con propiedades estructurales fisiológicamente equivalentes, lo que confirma su idoneidad como un armazón para ingeniería de tejidos de ligamento.

En otro ejemplo que implica el aislamiento y cultivo celular, se eligieron células estromales de médula ósea (BMSC), células pluripotentes capaces de diferenciarse entre linajes osteogénicos, condrogénicos, tendónogénicos, adipogénicos y miogénicos, ya que la formación de las condiciones apropiadas puede dirigir su diferenciación a la línea celular de fibroblasto de ligamento deseado (Markolf y col., J. Bone Joint Surg. 71A: 887-893, 1989; Caplan y col., Mesenchymal stem cells and tissue repair, The Anterior Cruciate Ligament: Current and Future Concepts, Ed. D. W. Jackson y col., Raven Press, Ltd, New York, 1993; Young y col., J. Orthopaedic Res. 16: 406-413, 1998).

Las BMSC humanas se aislaron de la médula ósea de la cresta ilíaca de donantes que dieron el consentimiento de al menos 25 años de edad por un proveedor comercial (Cambrex, Walkersville, MD). Veintidós milímetros de médula humana se aspiraron asépticamente en una jeringa de 25 ml que contenía tres mililitros de solución salina heparinizada (1000 unidades por mililitro). La solución heparinizada de médula se envió en hielo durante la noche al laboratorio para el aislamiento y cultivo de las células estromales de médula ósea. Tras la llegada del proveedor, los veinticinco mililitros aspirados se volvieron a suspender en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 100 U/ml penicilina, 100 mg/L de estreptomycin (P/S) y 1 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (Life Technologies, Rockville, MD) y se colocaron en placas en 8-10 microlitros de aspirado/cm² en matraces de cultivo de tejido. Se añadió medio reciente a los aspirados de médula dos veces a la semana durante nueve días de cultivo. Las BMSC se seleccionaron en base a su habilidad para adherirse al plástico de cultivo del tejido; las células hematopoyéticas no adherentes se retiraron durante la sustitución del medio después de 9-12 días de cultivo. El medio se cambió dos veces por semana a partir de entonces. Cuando las BMSC primarias se hicieron casi confluentes (12-14 días), se separaron usando tripsina al 0,25%/ EDTA 1 mM y se volvieron a colocar en placas a 5x10³ células/cm². Las hBMSC del primer pase (P1) se tripsinizaron y se congelaron en DMSO al 8%/SFB al 10%/DMEM para futuro uso.

Las hBMSC P1 congeladas se descongelaron, se volvieron a colocar en placas a 5x10³ células/cm² (P2), se tripsinizaron cuando estuvieron cerca de la confluencia, y se usaron para sembrar la construcción de fibra. Las matrices de seda esterilizada (óxido de etileno) (específicamente, cuerdas sencillas de Matrices 1 y 2, paquetes de 30 fibras paralelas de seda extraída, y cuerdas helicoidales de fibras de colágeno) se sembraron con células en cámaras de cultivo customizadas (volumen total de 1 ml) y se trabajaron con máquina en bloques de Teflón para minimizar el volumen del medio celular y aumentar el contacto entre la construcción de fibra y la célula. Las matrices sembradas, después de un periodo de incubación de 4 horas con la suspensión celular (3,3x10⁶ BMSC/ml) se transfirieron a una placa de Petri que contenía una cantidad apropiada de medio de cultivo celular durante la duración de los experimentos.

Para determinar la velocidad de degradación de la fibroína de seda, se midió la fuerza máxima de tracción (UTS) como una función del periodo de cultivo en condiciones de crecimiento fisiológico, es decir, en el medio de cultivo celular. Se extrajeron grupos de 30 fibras paralelas de seda de 3 cm de longitud, se sembraron con hBMSC, y cultivaron sobre la fibroína durante 21 días a 37 °C y con CO₂ al 5%. Los grupos de control no sembrados se cultivaron en paralelo. La UTS de la fibroína de seda se determinó como una función de duración de cultivo para grupos sembrados y no sembrados.

También se examinó la respuesta de las células estromales de médula ósea a la construcción de fibra de seda.

Las BMSC se unieron y crecieron sobre las matrices de seda y colágeno después de 1 día en cultivo (Véanse las Figs. 7A-C y Figs. 16A) y formaron extensiones celulares para tender un puente sobre las fibras vecinas. Como se muestra en la Fig. 7D y Fig. 16B, se observó una lámina uniforme de células que cubría la construcción los días 14 y 21 del cultivo, respectivamente. El análisis MTT confirmó la completa cobertura de la construcción de fibra por LAS BMSC sembradas después de 14 días en cultivo (véanse las Fig. 8A-B). La cuantificación de ADN total de células cultivadas sobre la Matriz 1 (véase la Fig. 9A) y Matriz 2 (véase la Fig. 9B) confirmó que las BMSC proliferaron y crecieron sobre la construcción de seda con la cantidad más alta de ADN medida después de 21 y 14 días, respectivamente, en cultivo.

Los grupos de 30 fibras de fibroína de seda de control extraída tanto de BMSC sembrada como no sembrada, mantuvieron su integridad mecánica como una función del periodo de cultivo durante 21 días (véase la Fig. 10).

El análisis RT-PCR de las BMSC sembradas sobre cuerdas de la Matriz 2 indicó que tanto el colágeno I como el II se regularon por incremento durante 14 días en cultivo (Fig. 14). El colágeno de tipo II y la sialoproteína ósea (como indicadores de diferenciación específica de cartílago y hueso, respectivamente) no fueron detectables ni se expresaron mínimamente durante el periodo de cultivo. La RT-PCR cuantitativa en tiempo real a los 14 días produjo una proporción de transcripción de colágeno I a colágeno III, normalizado a GAPDH, de 8,9:1 (véase la Fig. 17). La alta proporción de colágeno I con respecto a colágeno III indica que la respuesta no es la curación de heridas ni la formación de tejido cicatrizal (como se observa con altos niveles de colágeno de tipo III), sino más bien el ligamento específico; la proporción relativa de colágeno I con respecto a colágeno III en un LCA nativo es ~6,6:1 (Amiel y col., *Knee Ligaments: Structure, Function, Injury, and Repair*, 1990).

Además, se llevan a cabo estudios para permitir comprender la influencia de la estimulación mecánica dirigida multidimensional sobre la formación de ligamento a partir de células estromales de médula ósea en el sistema del biorreactor. El biorreactor es capaz de aplicar tensiones cíclicas multidimensionales independientes pero concurrentes (por ejemplo, translación, rotación) a los ligamentos en desarrollo. Después de un periodo de descanso estático de 7 a 14 días (tiempo después de la siembra), las velocidades de tensión rotacional y translacional y la deformación lineal y rotacional se mantienen constantes durante 1 a 4 semanas. La tensión translacional (3,3%-10%, 1-3 mm) y la tensión rotacional (25%, 90°) se aplican simultáneamente a una frecuencia de 0,0167 Hz (un ciclo completo de tensión y relajación por minuto) a las matrices basadas en seda sembradas con las BMSC; lo que de otra forma sería un conjunto idéntico de biorreactores con matrices sembradas sin carga mecánica sirve como control. Los ligamentos se exponen a las tensiones cíclicas constantes durante la duración de los días del experimento.

Después del periodo de cultivo, las muestras de ligamento, tanto las cuestionadas mecánicamente como los controles (estáticas) se caracterizan para: (1) la apariencia histomorfológica general (mediante inspección visual); (2) la distribución celular (procesamiento de imagen de secciones histológicas y teñidas con MTT); (3) la morfología y orientación celular (análisis histológico); y (4) la producción de marcadores específicos de tejido (RT-PCR, inmunotinción).

La estimulación mecánica afecta considerablemente a la morfología y organización de las BMSC y a la construcción de fibra extracelular recién desarrollada, la distribución de las células a lo largo de la construcción de fibra, y la regulación por incremento de una cascada de diferenciación específica del ligamento; las BMSC se alinean a lo largo del eje largo de la fibra, adquieren una morfología de esferoide similar a la de los fibroblastos de ligamento/tendón y regulan por incremento los marcadores específicos de ligamento/tendón. Se espera que la construcción de fibra extracelular recién formada (es decir, la composición de proteínas producidas por las células) se alinee a lo largo de las líneas de carga así como del eje largo de la construcción de fibra. Se espera que la estimulación mecánica dirigida mejore el desarrollo y la formación del ligamento in vitro en un biorreactor siendo el resultado de las BMSC sembradas sobre la construcción nueva de fibra basada en seda. La orientación longitudinal de las células y la construcción de fibra recién formada es similar a los fibroblastos de ligamento encontrados dentro de un LCA in vivo (Woods et al., *Amer. J. Sports Med.* 19: 48-55, 1991). Además, la estimulación mecánica mantiene la correcta proporción de expresión entre las transcripciones de colágeno tipo I y las transcripciones de colágeno tipo III (por ejemplo, mayor que 7:1) lo que indica la presencia de un tejido de ligamento recién formado frente a la formación de tejido cicatrizal. Los resultados anteriores indicarán que el aparato mecánico y el sistema del biorreactor proporcionan un entorno adecuado (por ejemplo, tensiones multidimensionales) para la formación in vitro de ligamentos producidos por ingeniería de tejidos que se inician a partir de células estromales de médula ósea y la construcción nueva de fibra basada en seda.

Las condiciones de cultivo usadas en estos experimentos preliminares pueden además extenderse para reflejar de manera más precisa el entorno fisiológico de un ligamento (por ejemplo, aumentando los diferentes tipos de fuerzas mecánicas) para la creación in vitro de equivalentes funcionales de LCA nativo para un potencial uso clínico. Estos métodos no están limitados a la generación de un LCA producido por bioingeniería. Aplicando la magnitud y variedad apropiada de fuerzas experimentadas in vivo, cualquier tipo de ligamento en el cuerpo así como otros tipos de tejidos pueden producirse ex vivo mediante los métodos de esta divulgación.

ES 2 425 101 T3

Tabla 1. Fuerza máxima de tracción y rigidez (N/mm dada una muestra de 3 cm de longitud) en función de la extracción de sericina de un hilo de seda de gusano de seda de 10 fibras con 0 giros por pulgada (es decir, paralelo) y (i) temperatura y (ii) tiempo. Las muestras de repetición se procesaron dos años después de las muestras iniciales sin cambio significativo en las propiedades. N=5 para todas las muestras.

Hilo	# de fibras	Temp	Tiempo	UTS (N)	desv.típ.	Rig (N/mm)	desv.típ	UTS/fibra (N)	Rigidez/fibra (N/mm)
10(0)	10	TA	60 min	10,74	0,83	6,77	0,65	1,07	0,68
10(0)	10	TA	60 min (repetición)	10,83	0,28	6,36	0,14	1,08	0,64
10(0)	10	33C	60 min	10,44	0,17	6,68	0,55	1,04	0,67
10(0)	10	37C	60 min	9,60	0,84	6,09	0,59	0,96	0,61
10(0)	10	37C	60 min (repetición)	9,54	0,74	5,81	0,67	0,95	0,58
10(0)	10	90C	15 min	9,22	0,55	4,87	0,62	0,92	0,49
10(0)	10	90C	30 min	8,29	0,19	4,91	0,33	0,83	0,49
10(0)	10	90C	60 min	8,60	0,61	4,04	0,87	0,86	0,40
10(0)	10	90C	60 min (repetición)	8,65	0,67	4,55	0,69	0,87	0,46
10(0)	10	94C	60 min	7,92	0,51	2,42	0,33	0,79	0,24
9(12s) x 3(9z)	27	no-extraída		24,50	0,38	8,00	0,49	0,91	0,30
9(12s) x 3(9z)	27	90C	60 min	21,88	0,18	7,38	0,34	0,81	0,27
9(6s) x 3(3z)	27	no-extraída		24,94	0,57	9,51	0,57	0,92	0,35
9(6s) x 3(3z)	27	90C	60 min	21,36	0,40	7,95	1,00	0,79	0,29
9(12s) x 3(6z)	27	no-extraída		24,69	0,65	9,08	0,56	0,91	0,34
9(12s) x 3(6z)	27	90C	60 min	21,80	0,47	7,48	0,97	0,81	0,28

5

Tabla 2. Pérdida de masa en función de la extracción de sericina. La desviación típica de +/- 0,43% de un N=5, refleja la mayor precisión que puede conseguirse cuando se confirma la retirada de sericina, es decir, 0,87 o 1% de error siempre estará inherente a estos métodos usados y una pérdida de masa de aproximadamente 24% representa construcciones sustancialmente libres de sericina

hilo	no extraído y secado (mg)	extraído y secado (mg)	% de pérdida de masa
9(12) x 3(6)	57,6	43,6	24,31
9(12) x 3(6)	58,3	43,9	24,70
9(12) x 3(6)	57,0	42,9	24,74
9(12) x 3(6)	57,2	42,7	25,35
promedio	57,53	43,28	24,77
Desv. típ.	0,57	0,57	0,43

10

ES 2 425 101 T3

Tabla 3. Ilustra el cambio en masa en función de una segunda extracción de sericina. En correlación con las Figs. 1E-1G, menos de un 3% de pérdida de masa es probablemente indicativo de la pérdida de masa de fibroína debido al daño mecánico durante la 2^a extracción.

hilo	masa después de 1x extracción, secada (mg)	masa después de 2x extracción, secada (mg)	% de pérdida de masa
9(12) x 3(6)	42,5	41,7	1,88
9(12) x 3(6)	43,1	42	2,55
9(12) x 3(6)	43,1	42,1	2,32
9(12) x 3(6)	42,5	41,7	1,88
9(12) x 3(6)	42,6	42,4	0,47
9(12) x 3(6)	43,7	42,4	2,97
9(12) x 3(6)	43,4	42,9	1,15
9(12) x 3(6)	43,7	43,1	1,37
9(12) x 3(6)	44	43,2	1,82
promedio	43,18	42,39	1,82
desv. típ.	0,56	0,57	0,76

ES 2 425 101 T3

Geometría	Método hebra	Condición	# de niveles de hebras	Total # de fibras	Promedio UTS (N)	Desv. tip. UTS (N)	Promedio de % Alarg.	Desv. tip. de Alarg.	Promedio de rigidez (N/mm)	Desv. tip. de rigidez (N/mm)	UTS por fibra	Rigidez por fibra
1(0) x 3(10)	cable	extraída	2	3	1,98	0,05	10,42	1,63	2,17	0,51	0,66	0,72
1(0) x 4(10)	cable	extraída	2	4	2,86	0,14	11,98	1,54	2,08	0,31	0,72	0,52
3(0) x 3(3)	cable	extraída	2	9	6,72	0,17	12,30	0,72	4,54	0,16	0,75	0,50
1(0) x 3(10) x 3(9)	cable	extraída	3	9	6,86	0,23	13,11	1,45	4,06	0,36	0,76	0,45
2(0) x 6(11)	cable		2	12	7,97	0,26	10,05	0,91			0,66	
4(6) x 3(3)	giro	no extraída	2	12	10,17	0,18	19,86	1,16			0,85	
1(0) x 3(10) x 4(9)	cable	extraída	3	12	9,29	0,19	14,07	0,98	5,10	0,31	0,77	0,43
1(0) x 4(11) x 3(11)	giro	extraída	3	12	9,70	0,14	12,56	1,03	7,60	0,33	0,81	0,63
1(0) x 4(10) x 3(9)	cable	extraída	3	12	8,78	0,17	14,25	1,09	5,10	0,32	0,73	0,43
15 (texturizado)	texturizado	no extraída, seca	1	15	10,62	0,68	10,76	1,70	4,75	0,30	0,71	0,316
30(0)	paralelo	extraída, mojada	1	30	20,24	1,46	26,32	3,51	1,14	0,15	0,67	0,038
30(0)	paralelo	incubada 21 días, mojada	1	30	19,73	2,10	20,70	6,03			0,66	
30(0)	paralelo	sembrada en célula 21 días, mojada	1	30	20,53	1,02	29,68	7,08			0,68	
2 fibras/portador en un 8	trenza	extraída, seca	2	16	10,93	0,13			6,96	1,14	0,68	0,435
4 fibras/portador en un 8	trenza	extraída, seca	2	32	24,60	0,22			12,39	0,53	0,77	0,387
4(6) x 3(3) en portador 4	trenza	extraída, seca	3	48	37,67	0,18	22,38	0,98			0,78	
15(0) x 3(12)	cable	seca	2	45	27,39	0,62	31,68	1,35	4,63	0,49	0,61	0,102889

Geometría	Método hebra	Condición	# de niveles de hebras	Total # de fibras	Promedio UTS (N)	Desv. tip. UTS (N)	Promedio de % Alarg.	Desv. tip. de Alarg.	Promedio de rigidez (N/mm)	Desv. tip. de rigidez (N/mm)	UTS por fibra	Rigidez por fibra
15(0) x 3(12) x 3(10)	cable	no extraída, 1 día tras la fabricación	3	135	73,61	6,00	33,72	5,67	12,33	1,53	0,55	0,091333
15(0) x 3(12) x 3(10)	cable	no extraída, 2 días tras la fabricación	3	135	72,30	5,68	31,18	4,35			0,54	
15(0) x 3(12) x 3(10)	cable	no extraída, 3 días tras la fabricación	3	135	70,74	2,97	29,50	4,47			0,52	
15(0) x 3(12) x 3(10)	cable	no extraída, 4 días tras la fabricación	3	135	75,90	1,57	34,57	4,12			0,58	
15(0) x 3(12) x 3(10)	cable	no extraída, 5 días tras la fabricación	3	135	71,91	5,71	38,72	3,75			0,53	
15(0) x 3(12) x 3(10)	cable	no extraída, 6 días tras la fabricación	3	135	74,57	1,45	37,67	4,27			0,55	
13(0) x 3(11) x 3(10) x 3(0)	cable	no extraída, seca	4	351	189,01	14,00	45,87	3,72			0,54	
13(0) x 3(11) x 3(10) x 3(0)	cable	no extraída, ciclos 30x a pretensión, seca	4	351	170,12	7,37	39,95	1,37			0,48	

Tabla 4

ES 2 425 101 T3

Tabla 5. Comparación de UTS y rigidez entre condiciones de pruebas mecánicas mojadas (2 h de incubación en PBS a 37 °C) y secas. N=5. Los resultados muestran aproximadamente un descenso del 17% en UTS en función de la prueba en mojado.

Hilo	# de fibras	Condiciones de la Prueba de Hilo	UTS (N)	Desv. típ. UTS	Rigidez (N/mm)	Desv. típ. Rigidez	UTS/fibra (N)	Rigidez/fibra (N/mm)
9(12s) x 3(9z)	27	extraído-seco	21,88	0,18	7,38	0,34	0,81	0,27
9(12s) x 3(9z)	27	extraído-mojado	18,52	0,25	2,56	0,31	0,69	0,09
9(6s) x 3(3z)	27	extraído-seco	21,36	0,40	7,95	1,00	0,79	0,29
9(6s) x 3(3z)	27	extraído-mojado	17,94	0,30	2,40	0,28	0,66	0,09
9(12s) x 3(6z)	27	extraído-seco	21,80	0,47	7,48	0,97	0,81	0,28
9(12s) x 3(6z)	27	extraído-mojado	18,74	0,22	2,57	0,11	0,69	0,10
12(0) x 3(10s)	36	extraído-seco	30,73	0,46	16,24	0,66	0,85	0,45
12(0) x 3(10s)	36	extraído-mojado	25,93	0,29	6,68	0,70	0,72	0,19
4(0) x 3(10s) x 3(9z)	36	extraído-seco	30,07	0,35	15,49	1,06	0,84	0,43
4(0) x 3(10s) x 3(9z)	36	extraído-mojado	22,55	0,66	7,63	1,00	0,63	0,21

5 Tabla 6. Efecto de TPI sobre UTS y Rigidez. N=5

Hilo	TPI	UTS (N)	desv. típ.	Rigidez (N/mm)	desv. típ	UTS/fibra (N)	Rigidez/fibra (N/mm)
12(0) x 3(2)	2	23,27	0,28	6,86	0,60	0,65	0,19
12(0) x 3(4)	4	24,69	0,31	7,61	1,17	0,69	0,21
12(0) x 3(6)	6	25,44	0,42	6,51	1,35	0,71	0,18
12(0) x 3(8)	8	25,21	0,23	5,80	0,67	0,70	0,16
12(0) x 3(10)	10	25,94	0,24	6,45	0,77	0,72	0,18
12(0) x 3(12)	12	25,87	0,19	6,01	0,69	0,72	0,17
12(0) x 3(14)	14	22,21	0,58	5,63	0,71	0,62	0,16

ES 2 425 101 T3

Tabla 7. Datos adicionales de tpi para verificar que pueden usarse hasta 30tpi sin causar daño al hilo que daría como resultado una disminución espectacular en UTS y rigidez; nota, todas las matrices (N=5 por grupo) estaban enrolladas.

Hilo	# de fibras	UTS (N)	Desv. típ. (N)	Rigidez (N/mm)	Desv. típ. (N/mm)	UTS/fibra (N)	Rigidez/fibra (N/mm)	Condiciones
1(30) x 6(20) x 3(4,5)	18	10,92	0,44	1,21	0,02	0,61	0,07	no extraída, mojada
1(30) x 6(20) x 3(10)	18	11,48	0,37	1,25	0,06	0,64	0,07	no extraída, mojada
1(30) x 6(6)	6	3,83	0,24	0,37	0,04	0,64	0,06	no extraída, mojada
15(20)	15	13,19	0,27	6,03	0,67	0,88	0,40	extraída,seca

Tabla 8. Efecto de la jerarquía del hilo en las propiedades mecánicas, es decir, el número de niveles y el número de fibras por nivel pueden tener una influencia significativa sobre el hilo y los resultados de la tela.

Geometría	Condición	# de niveles de unión con hebras	# total de Fibras	UTS (N)	Desv. tip. UTS (N)	Promedio % Alarg.	Desv. tip. % Alarg.	Promedio rigidez (N/mm)	Desv. tip. Rigidez (N/mm)	UTS por fibra	Rigidez por fibra
1(0) x 3(10)	extraído	2	3	1,98	0,05	10,42	1,63	2,17	0,51	0,66	0,72
1(0) x 3(10) x 3(9)	extraído	3	9	6,86	0,23	13,11	1,45	4,06	0,36	0,76	0,45
1(0) x 3(10) x 4(9)	extraído	3	12	9,29	0,19	14,07	0,98	5,10	0,31	0,77	0,43
1(0) x 4(10)	extraído	2	4	2,86	0,14	11,98	1,54	2,08	0,31	0,72	0,52
1(0) x 4(10) x 3(9)	extraído	3	12	8,78	0,17	14,25	1,09	5,10	0,32	0,73	0,43
15(0) x 3(12)	seco extraído	2	45	27,39	0,62	31,68	1,35	4,63	0,49	0,61	0,10
15(0) x 3(12) x 3(10)	seco extraído	3	135	73,61	6,00	33,72	5,67	12,33	1,53	0,55	0,09

ES 2 425 101 T3

Tabla 9. Efectos de la modificación de superficie (esterilización de gas RGD y ETO) sobre las propiedades mecánicas de la matriz de seda extraída; se usó PBS como un control negativo durante los tratamientos de modificación.

Hilo	# de fibras	Modificación de Superficie/Es terilización	UTS (N)	desv. típ.	Rigidez (N/mm)	desv. típ.	UTS/fibra (N)	Rigidez/fibra (N/mm)
12(0) x 3(10s)	36	No tratada	25,94	0,24	6,45	0,77	0,72	0,18
12(0) x 3(10s)	36	RGD	23,82	2,10	3,79	2,06	0,66	0,11
12(0) x 3(10s) x3(9z)	108	No tratada	48,89	4,84	9,22	0,84	0,45	0,09
12(0) x 3(10s) x3(9z)	108	RGD	55,28	3,28	8,17	0,81	0,51	0,08
4(11s) x 3(11z) x 3(10s)	36	ETO	18,72	0,45	5,52	0,42	0,52	0,15
4(11s) x 3(11z) x 3(10s)	36	RGD + ETO	19,30	0,62	4,67	0,3	0,54	0,13

5

Tabla 10

	UTS (N)	Rigidez (N/mm)	Límite de Elasticidad (N)	Alargamiento (%)
Matriz 1 de seda	2337+/-72	354+/-26	1262+/-36	38,6+/-2,4
Matriz 2 de seda	3407+/-63	580+/-40	1647+/-214	29+/-4
LCA humano	2160+/-157	242+/-28	~1200	~26-32%

Propiedades mecánicas para dos cuerdas diferentes en base a una longitud de cuerda de 3 cm en comparación con las propiedades de LCA humano

Tabla 11:

Nivel de Giro (# giros/cm)	Matriz 1	Matriz 2	Matriz 3	Matriz 4	Matriz 5	Matriz 6	Matriz 7
# fibras por grupo	30 (0)	15 (0)	1300 (0)	180 (0)	20 (0)	10 (0)	15 (0)
# grupos por paquete	6 (3)	3 (3)	3 (2)	3 (3,5)	6 (3)	6 (3)	3 (3)
# paquetes por hebra	3 (3)	6 (2,5)	1 (0)	3 (2)	3 (2)	3 (2,5)	3 (2,5)
# hebras por cuerda	6 (0)	3 (2,0)	-	2 (0)	3 (1)	3 (2)	3 (2)
# cuerdas por LCA	-	6 (0)	-	-	3 (0)	6 (0)	12 (0)
UTS (N)	2337	3407	2780	2300	2500	2300	3400
Rigidez (N/mm)	354	580	300	350	550	500	550

Ejemplos de varias jerarquías geométricas que darían como resultado propiedades mecánicas adecuadas para sustitución de LCA. Nota: la Matriz 1 y 2 se han desarrollado como se muestra en los ejemplos; la Matriz 3 produciría una prótesis de un único paquete, la Matriz 4 produciría una prótesis de 2 hebras, la Matriz 5 produciría una prótesis de 3 cuerdas, la Matriz 6 es otra variación de una prótesis de 6 cuerdas, y la Matriz 7 producirá una prótesis de 12 cuerdas.

En el presente documento también se describe:

Una tela que comprende: un hilo, comprendiendo dicho hilo una o más fibras de fibroína a las que se les ha extraído la sericina, siendo dichas fibras biocompatibles y estando organizadas de manera no arbitraria, en el que dicho hilo estimula el crecimiento interno de células alrededor de dichas fibras de fibroína y es biodegradable.

- 5 Las fibras de fibroína a las que se les ha extraído la sericina pueden comprender fibras de fibroína obtenidas a partir del gusano de seda *Bombyx mori*.

Las fibras de fibroína a las que se les ha extraído la sericina pueden conservar su estructura proteica nativa y pueden no haberse disuelto ni reconstituido.

La tela puede ser no-inmunogénica.

- 10 Las fibras de fibroína a las que se les ha extraído la sericina pueden incluir menos del 20% de sericina por peso, por ejemplo, menos del 10% de sericina por peso, o menos del 1% de sericina por peso.

- 15 El hilo puede tener una fuerza máxima de tracción de al menos 0,52 N por fibra y opcionalmente una rigidez de entre aproximadamente 0,27 y aproximadamente 0,5 N/mm por fibra y además opcionalmente conserva el 80% de su UTS cuando se ensaya mojado o tiene un alargamiento de rotura de entre aproximadamente 10% y aproximadamente 50%.

Cuando la tela tiene una rigidez de entre aproximadamente 0,27 y aproximadamente 0,5 N/mm por fibra y un alargamiento de rotura de entre aproximadamente 10% y aproximadamente 50% el hilo puede tener una vida de fatiga de al menos 1 millón de ciclos en una carga de aproximadamente 20% de la fuerza máxima de tracción del hilo.

- 20 El hilo puede comprender fibras paralelas o entrelazadas de fibroína a las que se les ha extraído la sericina, comprendiendo opcionalmente al menos tres fibras alineadas de fibroína a las que se les ha extraído la sericina, que opcionalmente pueden estar entrelazadas y pueden formar, por ejemplo, una trenza, hilo texturizado, hilo enrollado, hilo cableado, y combinaciones de los mismos. Cuando las fibras alineadas de fibroína a las que se les ha extraído la sericina están enrolladas o formando un cable una alrededor de la otra pueden tener de 0 a 11,8 giros por cm.

- 25 La tela puede comprender además un hilo que tiene una organización jerárquica de un único nivel, comprendiendo dicha organización jerárquica de un único nivel un grupo de hilos paralelos o entrelazados.

La tela puede comprender además una organización jerárquica de dos niveles, comprendiendo dicha organización jerárquica de dos niveles un paquete de grupos entrelazados.

- 30 La tela puede comprender además una organización jerárquica de tres niveles, comprendiendo dicha organización jerárquica de tres niveles una hebra de paquetes entrelazados.

La tela puede comprender además un hilo que tiene una organización jerárquica de cuatro niveles, comprendiendo dicha organización jerárquica de cuatro niveles una cuerda de hebras entrelazadas.

La tela puede comprender adicionalmente hilo enrollado a o por debajo de 11,8 giros por cm (30 giros por pulgada).

La tela puede tener una pluralidad de hilos están entrelazados para formar una tela.

- 35 La tela puede comprender un compuesto de fibras de fibroína a las que se les ha extraído la sericina y uno o más polímeros degradables seleccionados del grupo consistente en Colágenos, ácido Poliláctico y sus copolímeros, ácido poliglicólico o sus copolímeros, Polianhídridos, Elastina, Glicosaminoglicanos, y Polisacáridos y opcionalmente en dicha tela una pluralidad de hilos están organizados de manera no arbitraria en una tela seleccionada del grupo consistente en tela tejida, telas tricotadas, telas tricotadas con urdimbre, telas reconstituidas, telas con telar de Jacquard, telas laminadas, malla y combinaciones de las mismas o una pluralidad de hilos organizados de manera arbitraria en una tela no tejida.

- 40 La tela puede comprender adicionalmente un fármaco asociado con la tela.

La tela puede comprender adicionalmente un factor de acoplamiento celular asociado con la tela, por ejemplo RGD.

La tela puede tratarse con plasma de gas.

- 45 La tela puede comprender adicionalmente células biológicas sembradas sobre la tela.

También se desvela:

Un método para formar una tela que comprende:

a) alinear las fibras de fibroína en paralelo o entrecruzadas con otras fibras de fibroína de seda para formar un hilo,

b) retirar sustancialmente la sericina de las fibras de fibroína de seda sin alterar sustancialmente la estructura nativa de la fibroína en las fibras,

c) y organizar una pluralidad de hilos para formar una tela

Adicionalmente el método puede comprender entrelazar las fibras paralelas de seda antes de extraer la sericina.

5 Adicionalmente el método puede comprender entrelazar las fibras paralelas de seda después de extraer la sericina.

Adicionalmente el método puede comprender alinear múltiples fibras de fibroína en hilos, en el que cada hilo comprende al menos tres fibras paralelas o entrelazadas, en el que opcionalmente las fibras de fibroína de cada hilo están enrolladas una alrededor de otra en 0 a 11,8 giros por cm.

10 Adicionalmente el método puede comprender múltiples hilos enrollados uno alrededor del otro en 0 a 11,8 giros por cm.

Opcionalmente, en el método anterior la sericina se extrae de no más de aproximadamente 50 fibras de fibroína paralelas o entrelazadas.

Adicionalmente el método puede comprender hilo enrollado a o por debajo de 11,8 giros por cm (30 giros por pulgada).

15 Adicionalmente el método puede comprender formar una tela tricotada o tejida a partir de una pluralidad de hilos organizados de manera no arbitraria o formar una tela no tejida a partir de una pluralidad de hilos organizados de manera arbitraria. En otra opción la tela puede formarse después de extraer la sericina de las fibras en los hilos o la tela puede formarse antes de extraer la sericina de las fibras en los hilos, u opcionalmente el hilo puede exponerse a una fuerza que no es superior a su límite de elasticidad.

20 Adicionalmente el método puede comprender asociar un fármaco con la tela.

Adicionalmente el método puede comprender asociar un factor de acoplamiento celular con la tela, por ejemplo, asociar RGD con la tela.

El método puede comprender adicionalmente tratar la tela con plasma de gas.

Adicionalmente el método puede comprender:

25 esterilizar la tela.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una construcción biomaterial biodegradable de fibra para su uso en un dispositivo médico que comprende: un hilo, comprendiendo dicho hilo una o más fibras de fibroína de seda a las que se les ha extraído la sericina alineadas de forma no arbitraria en la que las fibras de fibroína de seda a las que se les ha extraído la sericina están sustancialmente libres de sericina, conservan sustancialmente su estructura proteica nativa y no se han disuelto ni reconstituido, siendo dichas fibras de fibroína de seda a las que se les ha extraído la sericina biocompatibles, en el que dicho hilo estimula el crecimiento interno de células alrededor de dichas fibras de fibroína de seda a las que se les ha extraído la sericina.
- 10 2. La construcción de fibra citada en la reivindicación 1, en la que las fibras de fibroína a las que se les ha extraído la sericina comprenden fibras de fibroína obtenidas a partir del gusano de seda *Bombyx mori*.
3. El implante de tela de la reivindicación 1, en el que el implante de tela es no inmunogénico.
4. La construcción de fibra de la reivindicación 1, en la que las fibras de fibroína a las que se les ha extraído la sericina incluyen menos del 20% de sericina por peso.
- 15 5. La construcción de fibra de la reivindicación 1, en la que el hilo tiene una fuerza máxima de tracción de al menos 0,52 N por fibra.
6. La construcción de fibra de la reivindicación 5, en la que el hilo tiene una rigidez de entre aproximadamente 0,27 y aproximadamente 0,5 N/mm por fibra.
7. La construcción de fibra de la reivindicación 6, en la que el hilo conserva el 80% de su UTS cuando se ensaya mojado.
- 20 8. La construcción de fibra de la reivindicación 7, en la que el hilo tiene un alargamiento de rotura de entre aproximadamente 10% y aproximadamente 50%.
9. La construcción de fibra de la reivindicación 1, en la el que el hilo comprende fibras paralelas o entrelazadas de fibroína a las que se les ha extraído la sericina.
- 25 10. La construcción de fibra de la reivindicación 1, que además comprende un hilo que tiene una organización jerárquica de un único nivel, comprendiendo dicha organización jerárquica de un único nivel un grupo de hilos paralelos o entrelazados.
11. La construcción de fibra de la reivindicación 1, que además comprende una organización jerárquica de dos niveles, comprendiendo dicha organización jerárquica de dos niveles un paquete de grupos entrelazados.
- 30 12. La construcción de fibra de la reivindicación 1, que además comprende una organización jerárquica de tres niveles, comprendiendo dicha organización jerárquica de tres niveles una hebra de paquetes entrelazados.
13. La construcción de fibra de la reivindicación 1, que además comprende una organización jerárquica de cuatro niveles, comprendiendo dicha organización jerárquica de cuatro niveles una cuerda de hebras entrelazadas.
14. La construcción de fibra de la reivindicación 1 que comprende un compuesto de:
 - (i) seda y fibras de colágeno;
 - 35 (ii) seda y espumas, mallas o esponjas de colágeno;
 - (iii) fibras de fibroína de seda y espumas, mallas o esponjas de seda;
 - (iv) seda y polímeros biodegradables; o
 - (v) seda y polímeros no biodegradables
- 40 15. Un dispositivo médico de sujeción de tejidos que comprende una construcción de fibra de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso para sujetar, al menos en parte, una cavidad interna en tejidos blandos tras cirugía, impedir adhesiones de tejidos o estimular el acoplamiento y crecimiento interno de células.

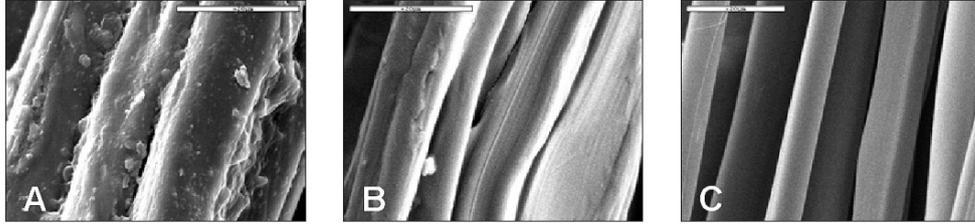


FIG. 1A

FIG. 1B

FIG. 1C

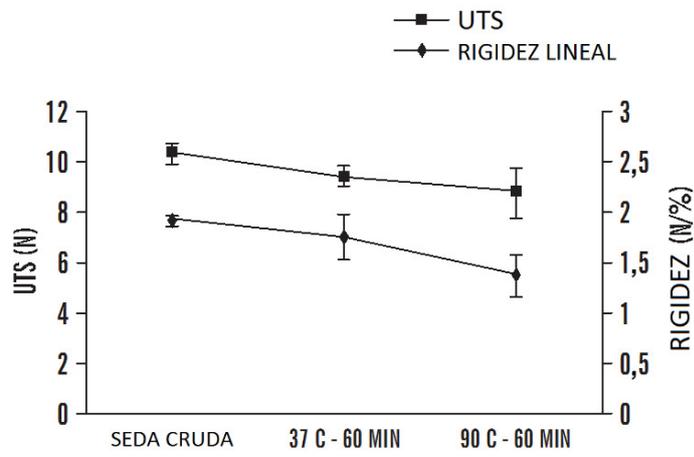
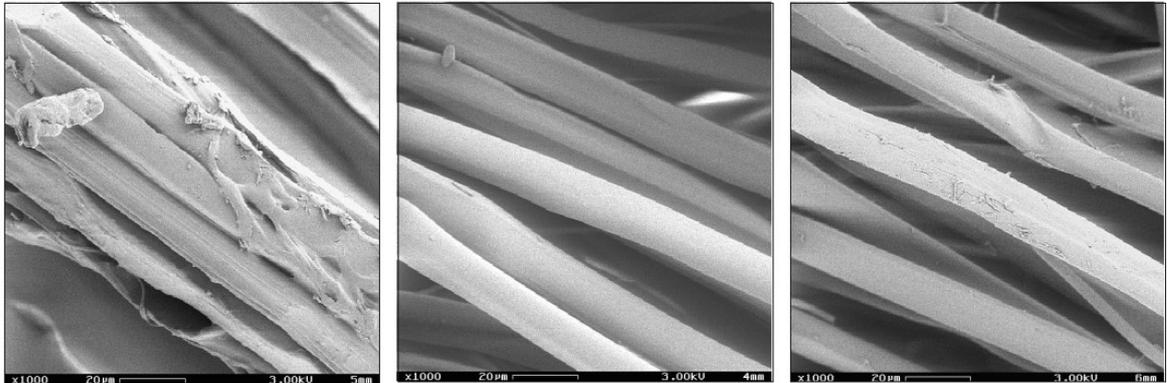


FIG. 1D



SEDA CRUDA

FIG. 1E

SEDA LAVADA 1x

FIG. 1F

SEDA LAVADA 2x

FIG. 1G

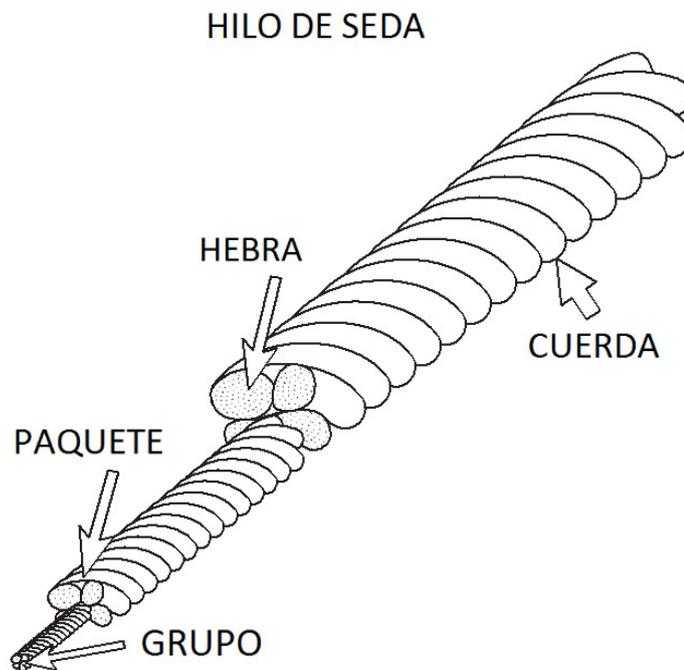


FIG. 2A

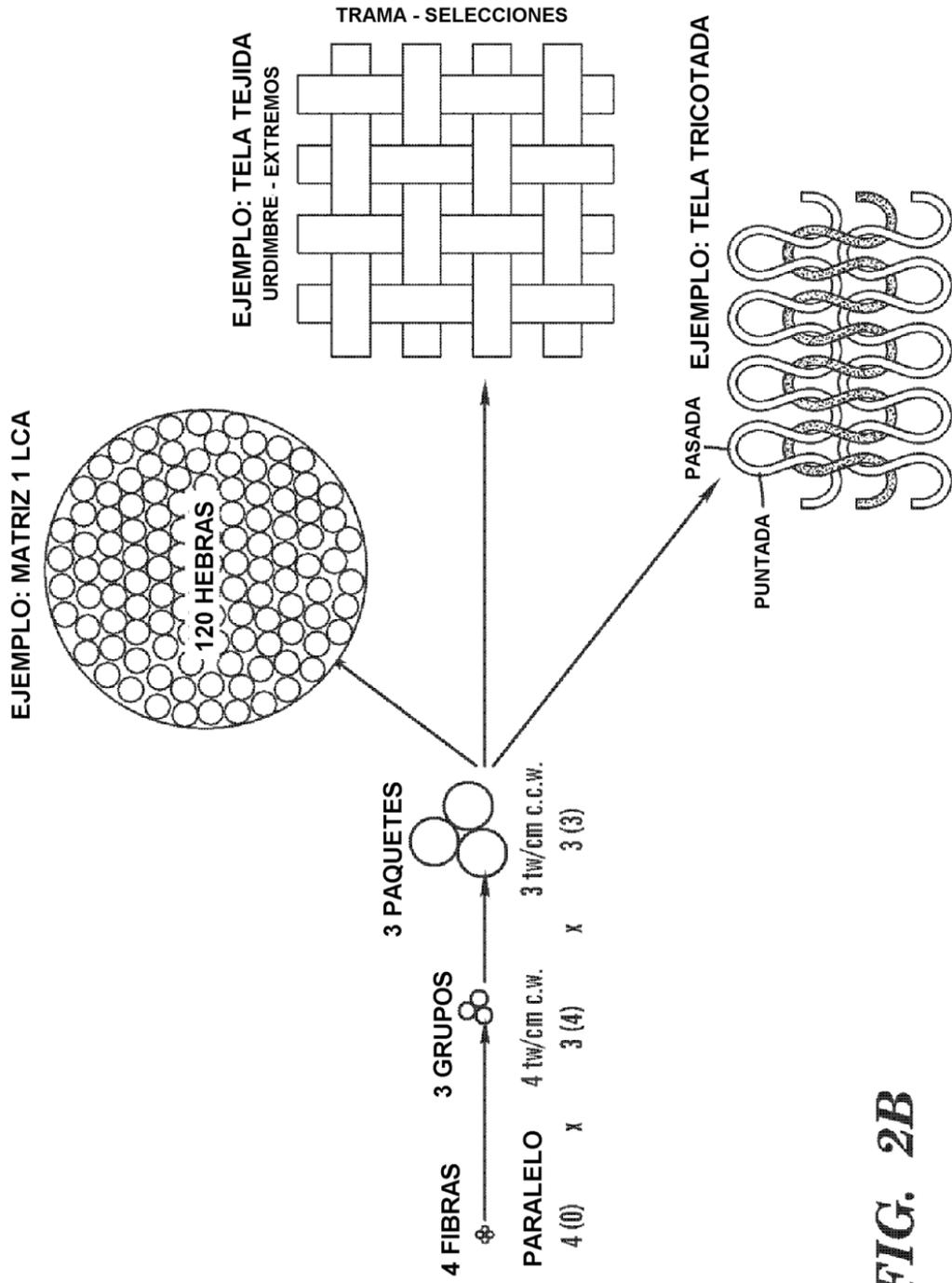


FIG. 2B

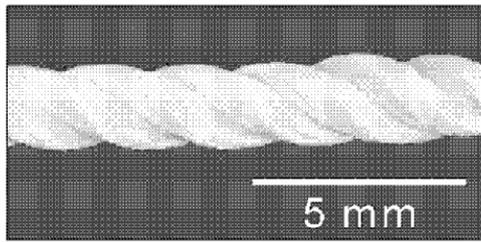


FIG. 2C

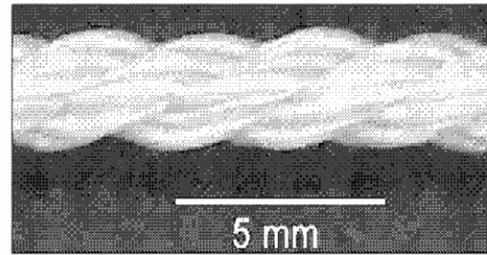


FIG. 2D

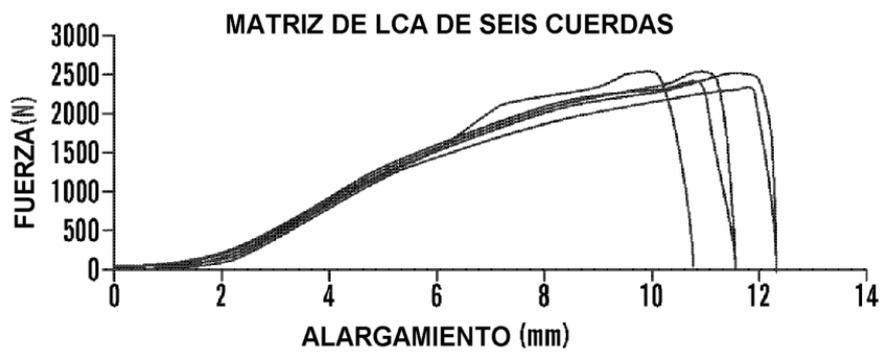


FIG. 3A

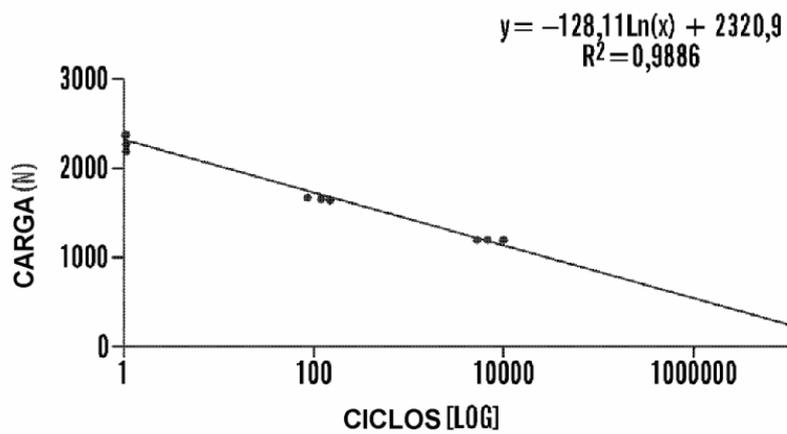


FIG. 3B

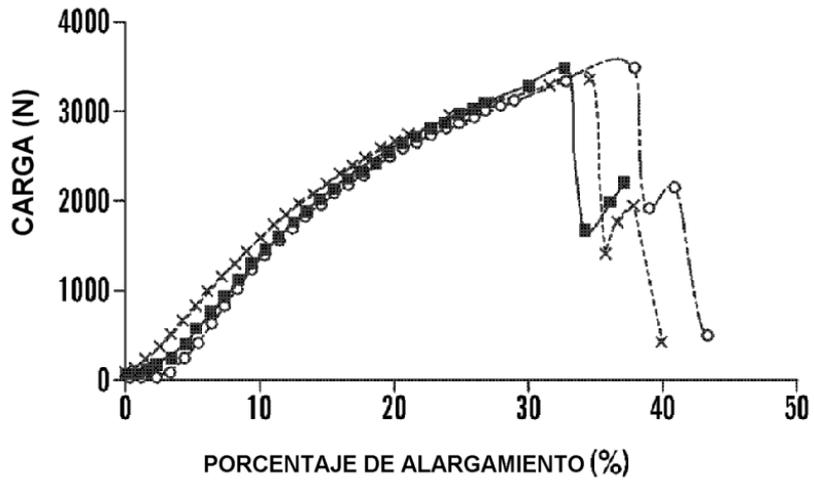


FIG. 3C

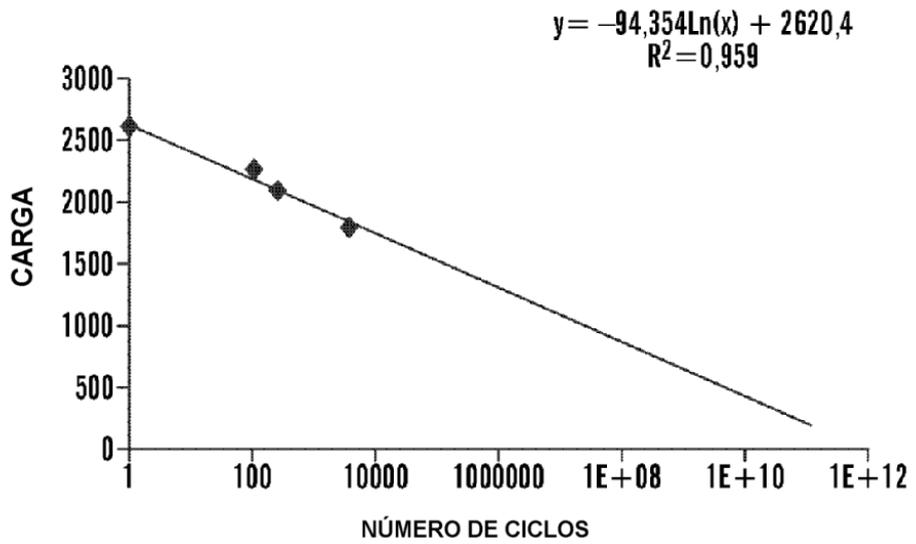


FIG. 3D

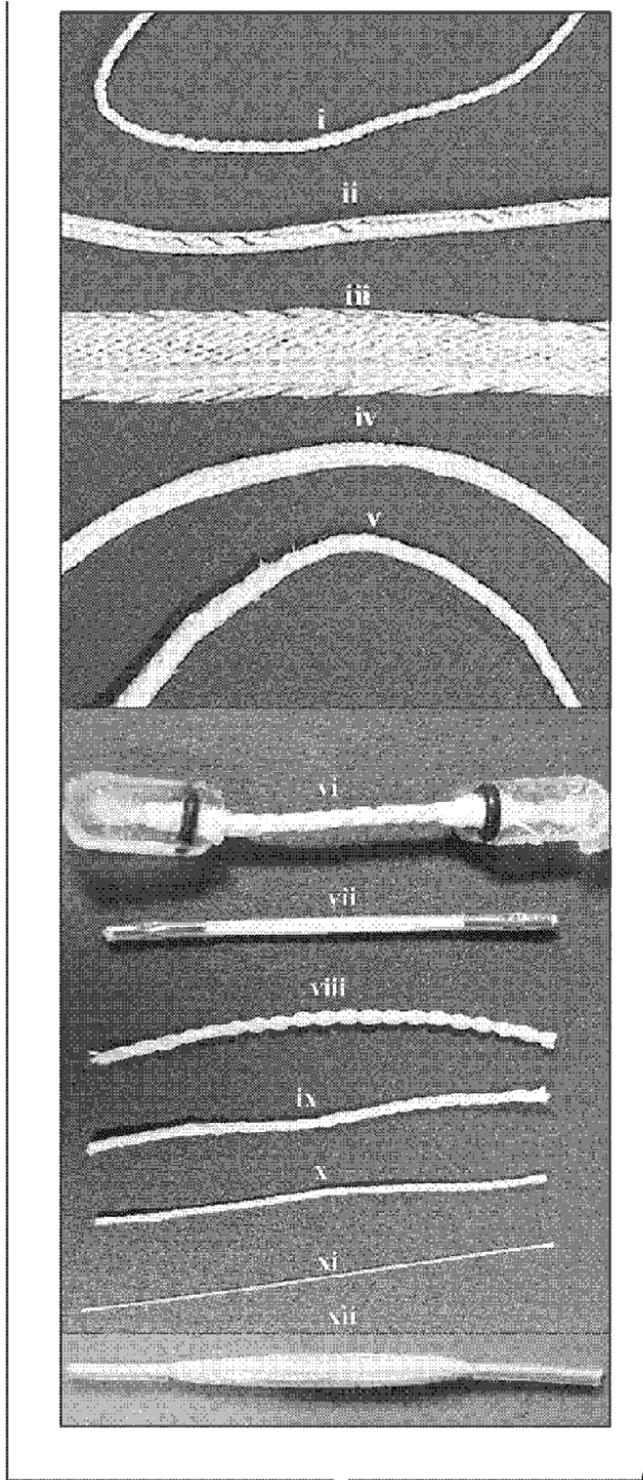


FIG. 4A

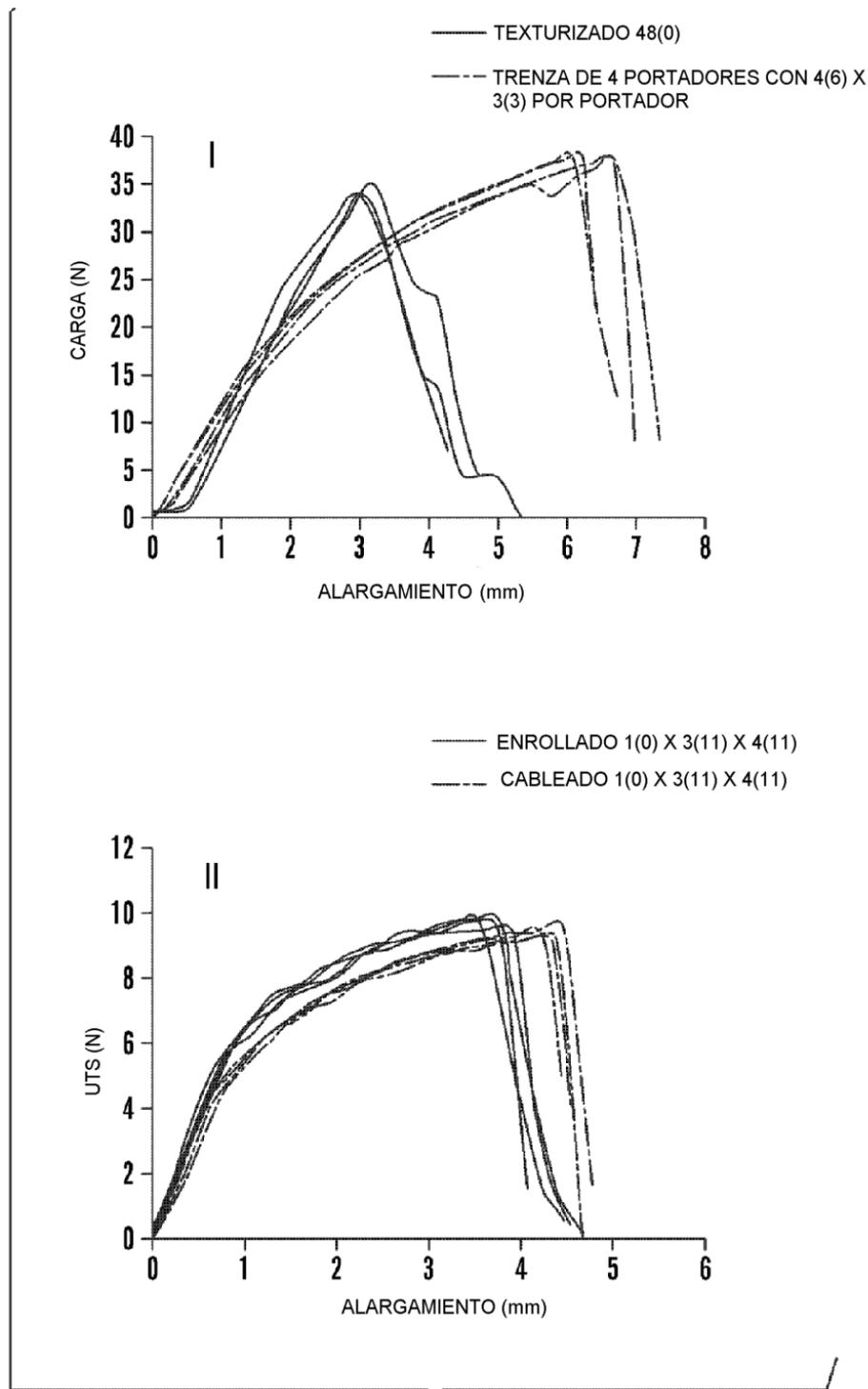


FIG. 4B

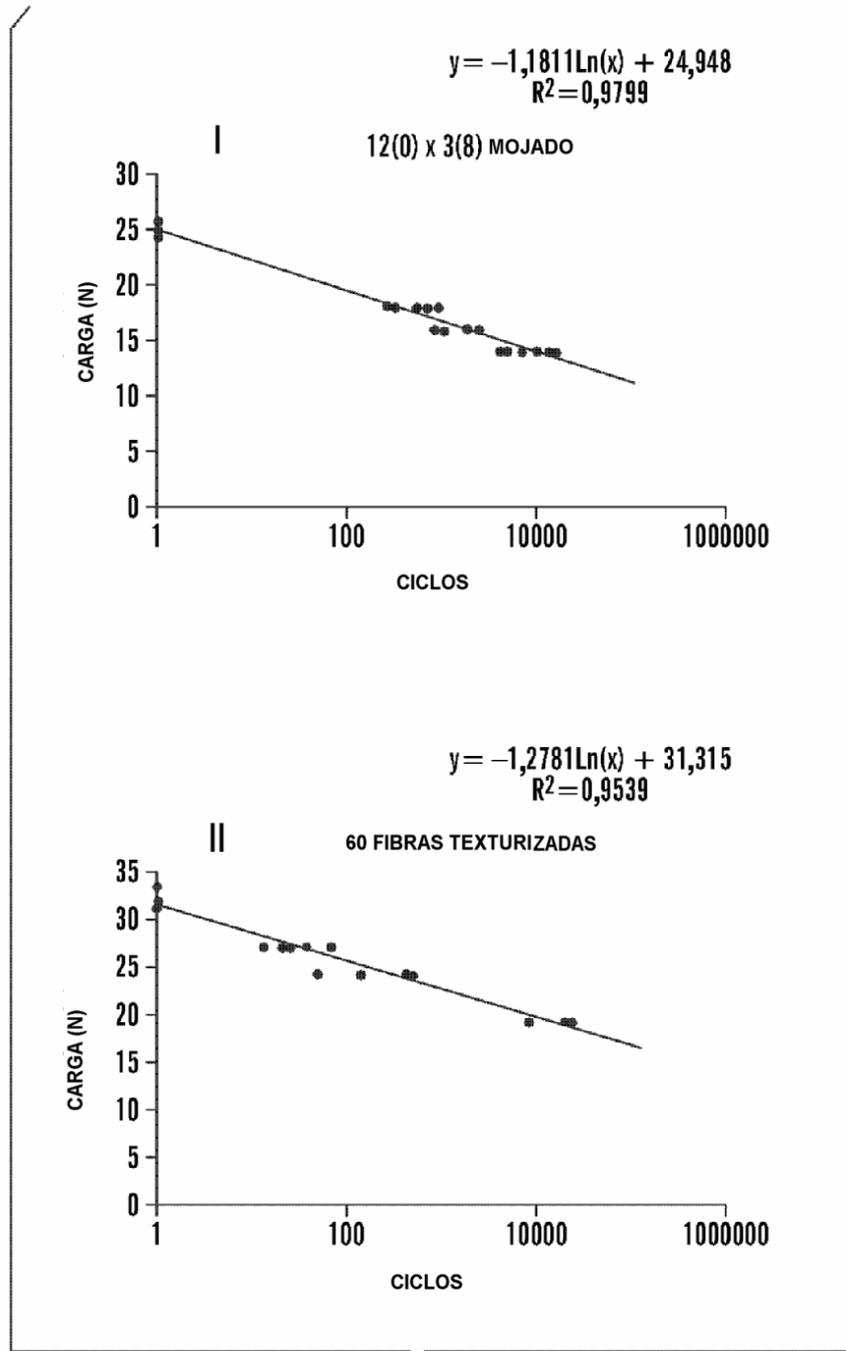


FIG. 4C

(TODO HECHO SOBRE 12(0) x 3(8), EXTRAÍDO Y MOJADO)

VELOCIDAD DE TENSIÓN (mm/min)	UTS (N)	devest (N)	RIGIDEZ (N/mm)	devest (N/mm)
3050	24,9	0,60	3,70	1,04
2700	25,0	0,86	3,47	0,40
900	24,3	0,50	3,02	0,12
36	22,5	0,70	2,74	0,08

FIG. 5A

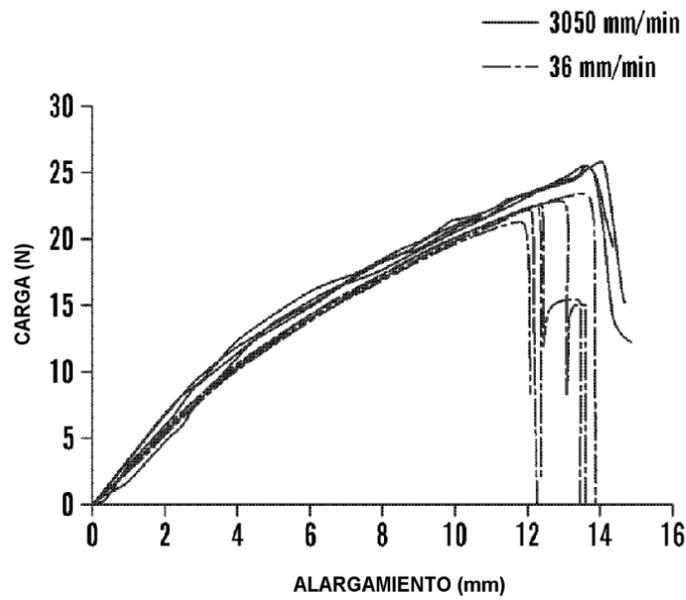


FIG. 5B

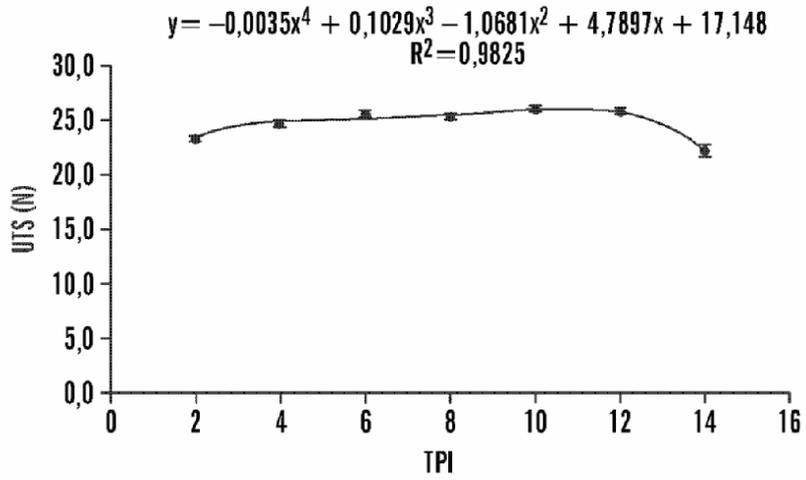


FIG. 6A

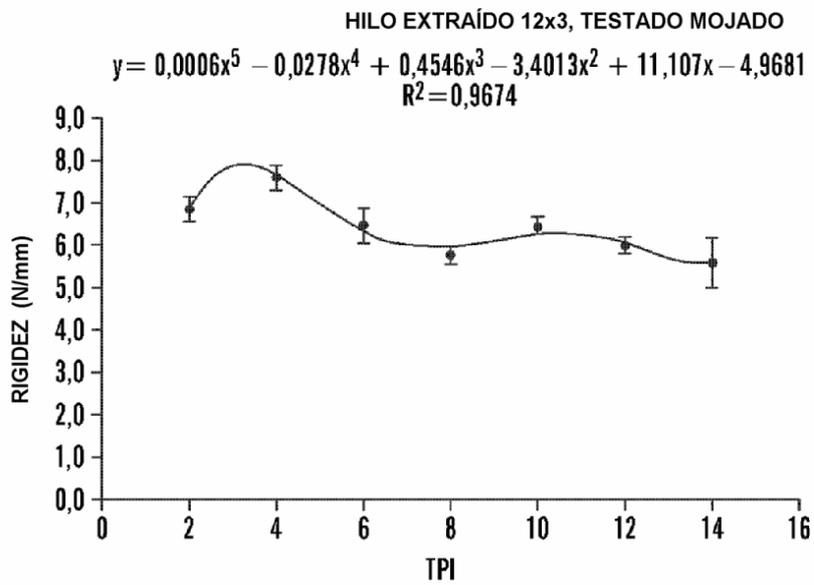


FIG. 6B

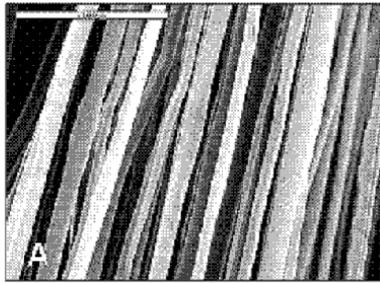


FIG. 7A

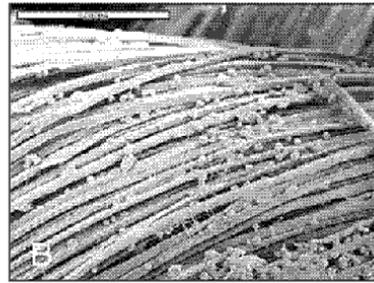


FIG. 7B

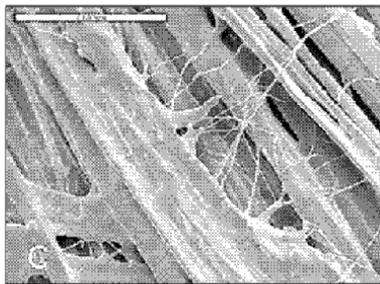


FIG. 7C

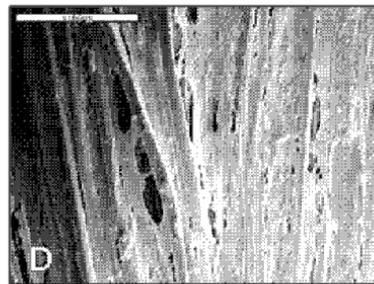


FIG. 7D

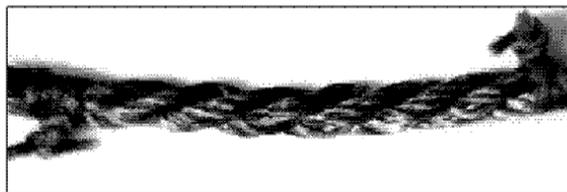


FIG. 8A

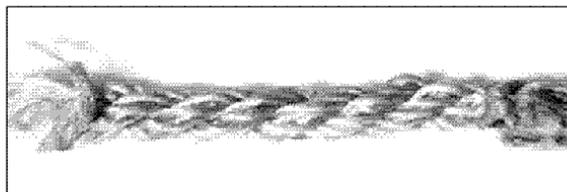


FIG. 8B

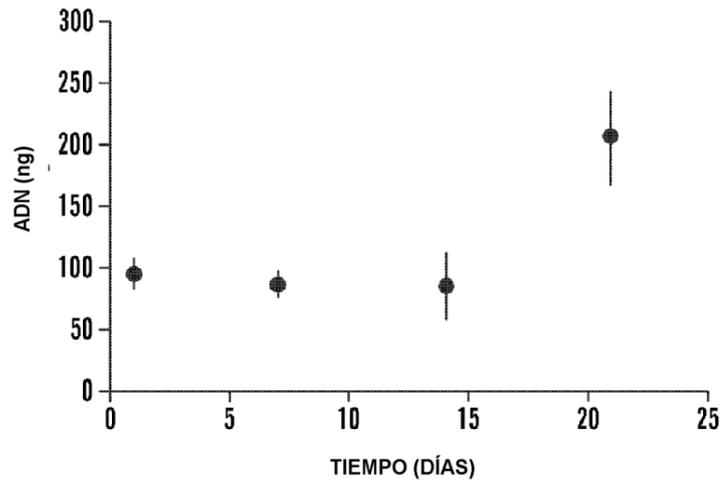


FIG. 9A

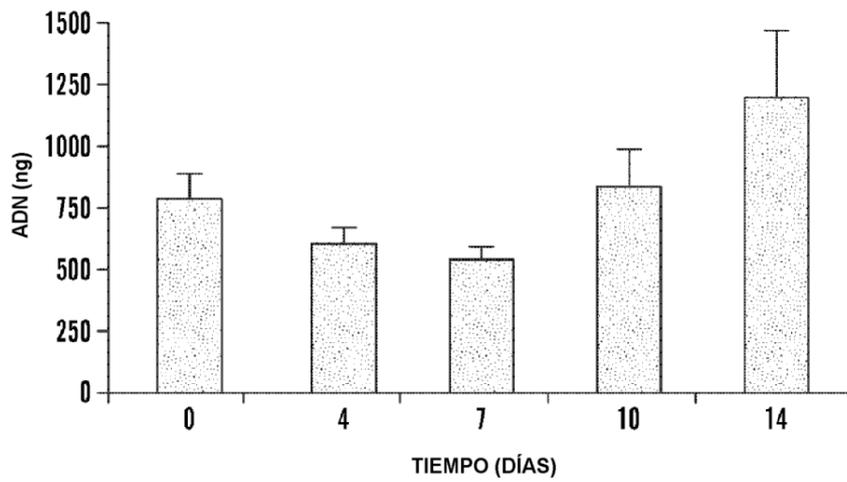


FIG. 9B

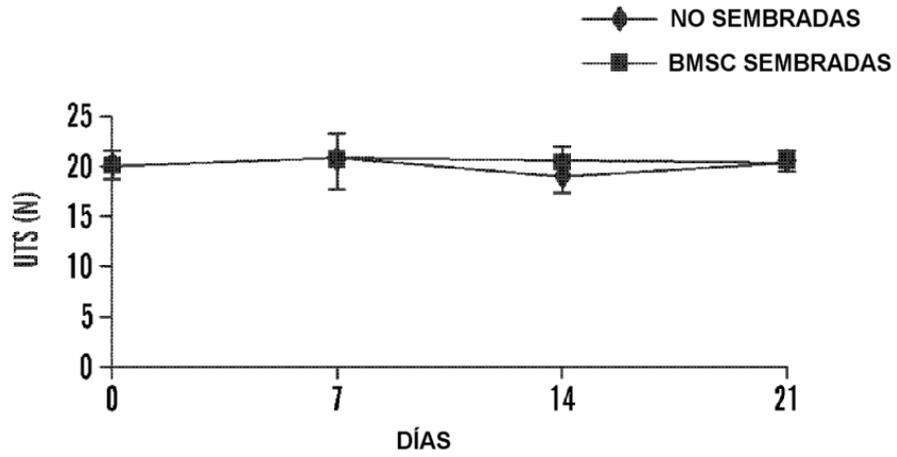


FIG. 10

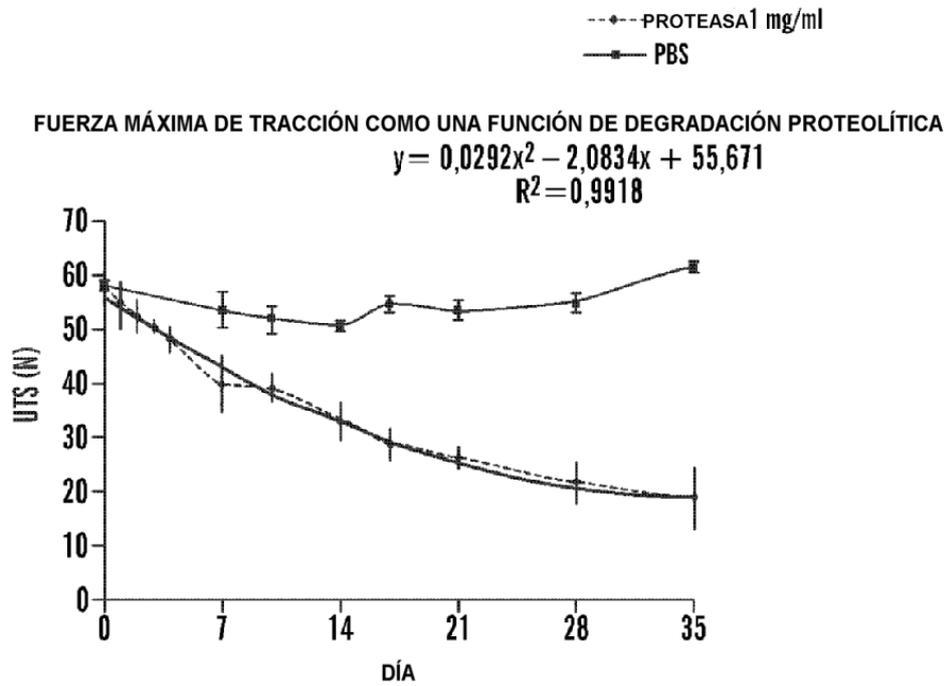


FIG. 11A

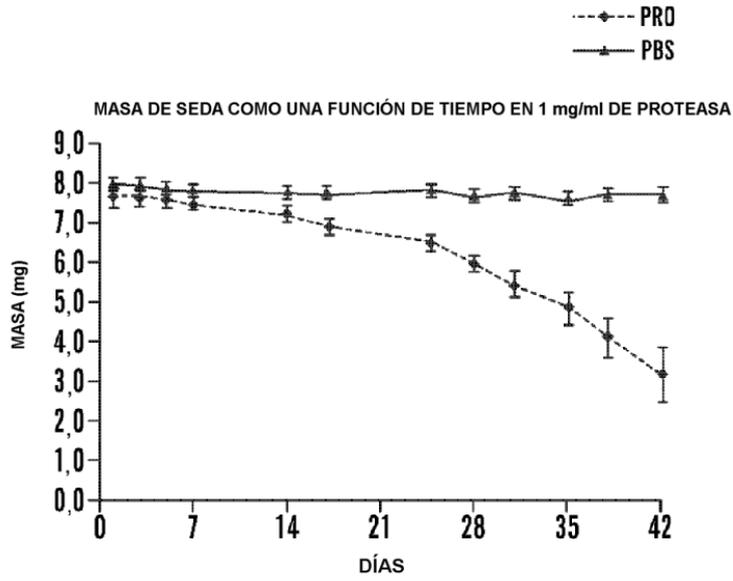


FIG. 11B

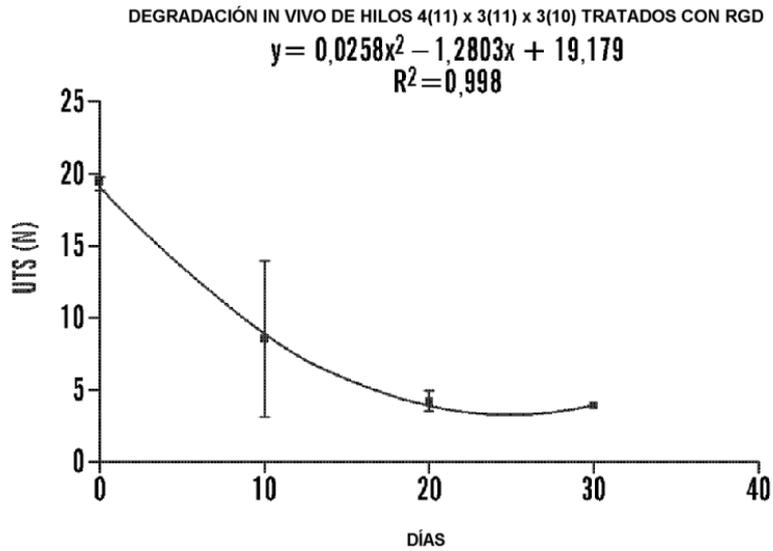


FIG. 12

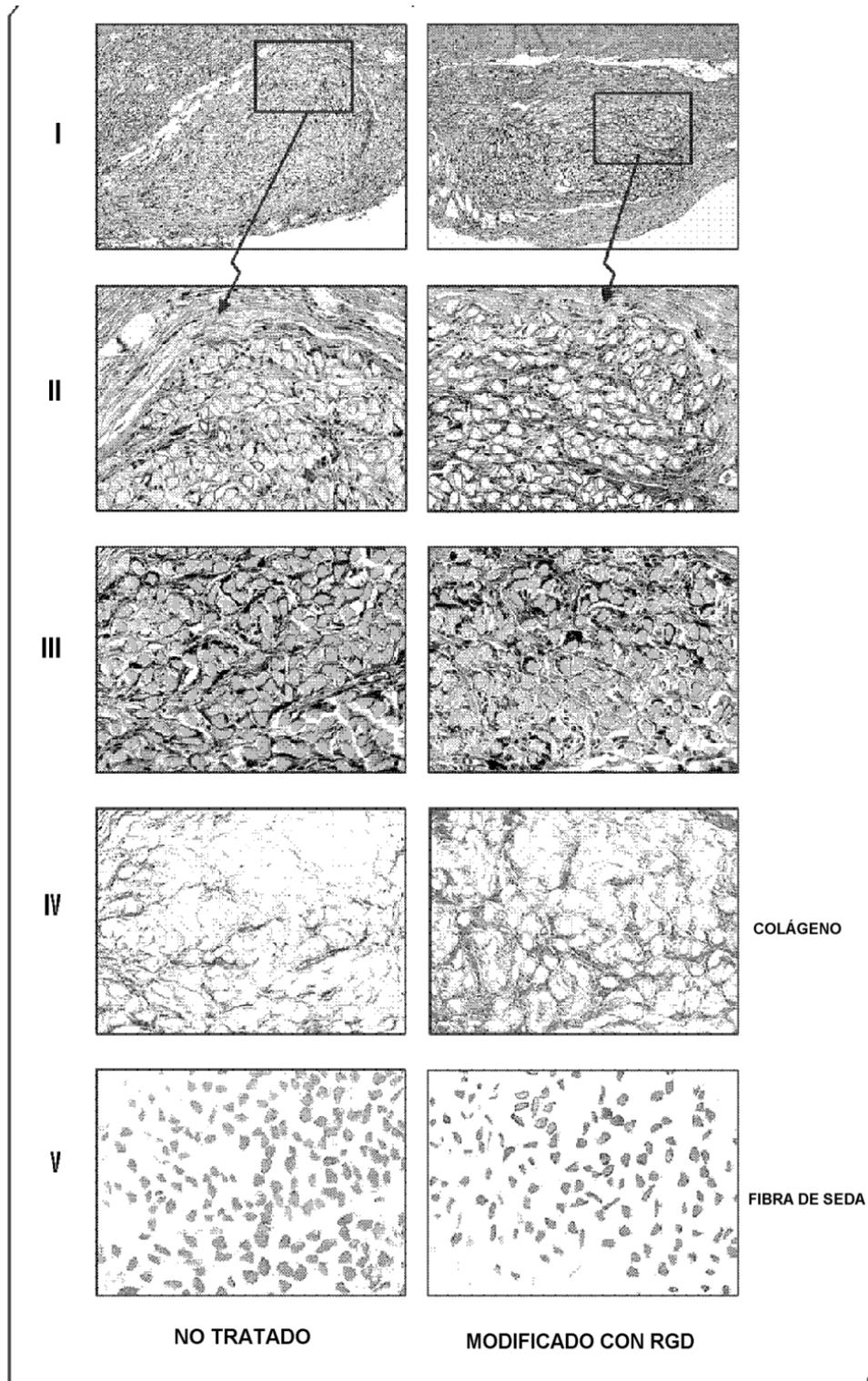


FIG. 13A

MEDIDAS DE ÁREA EN SECCIÓN TRANSVERSAL DE FIBRA DE SEDA DESPUÉS DE 30 DÍAS DE IMPLANTACIÓN SUBCUTÁNEA EN UNA RATA

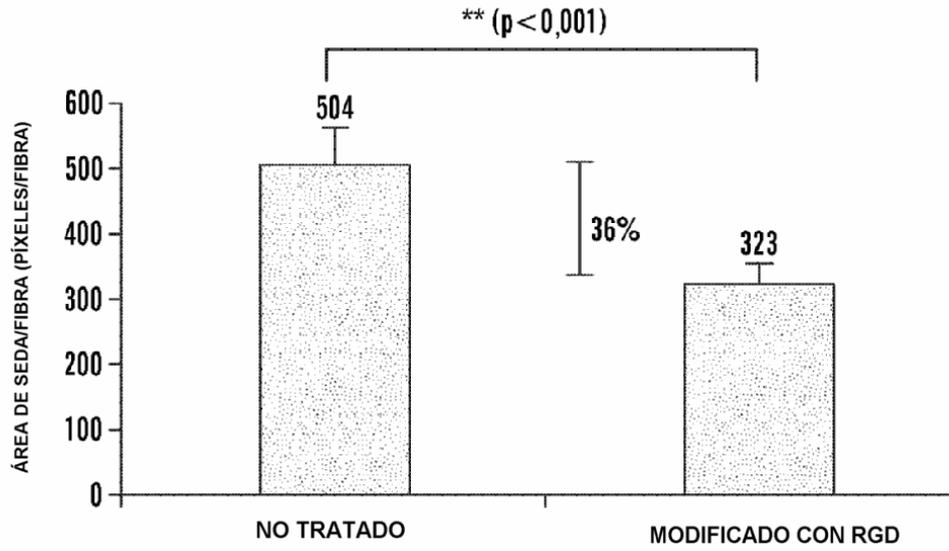


FIG. 13B

COMPOSICIÓN DE COLÁGENO DENTRO DE HILO DE 36 FIBRAS DESPUÉS DE 30 DÍAS *IN VIVO*

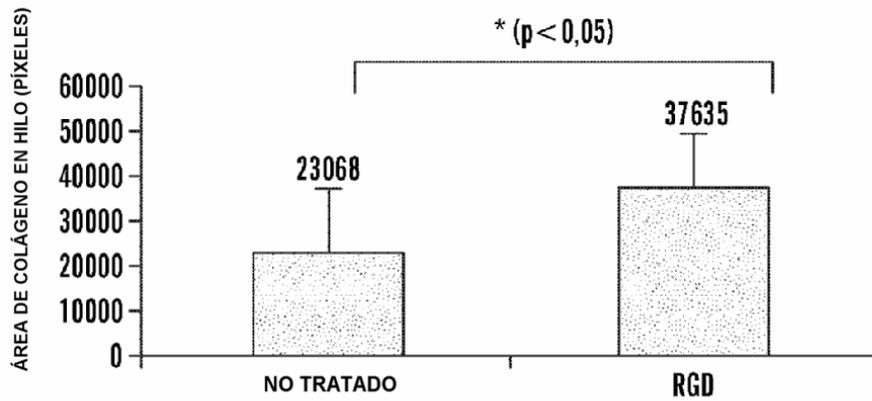


FIG. 13C

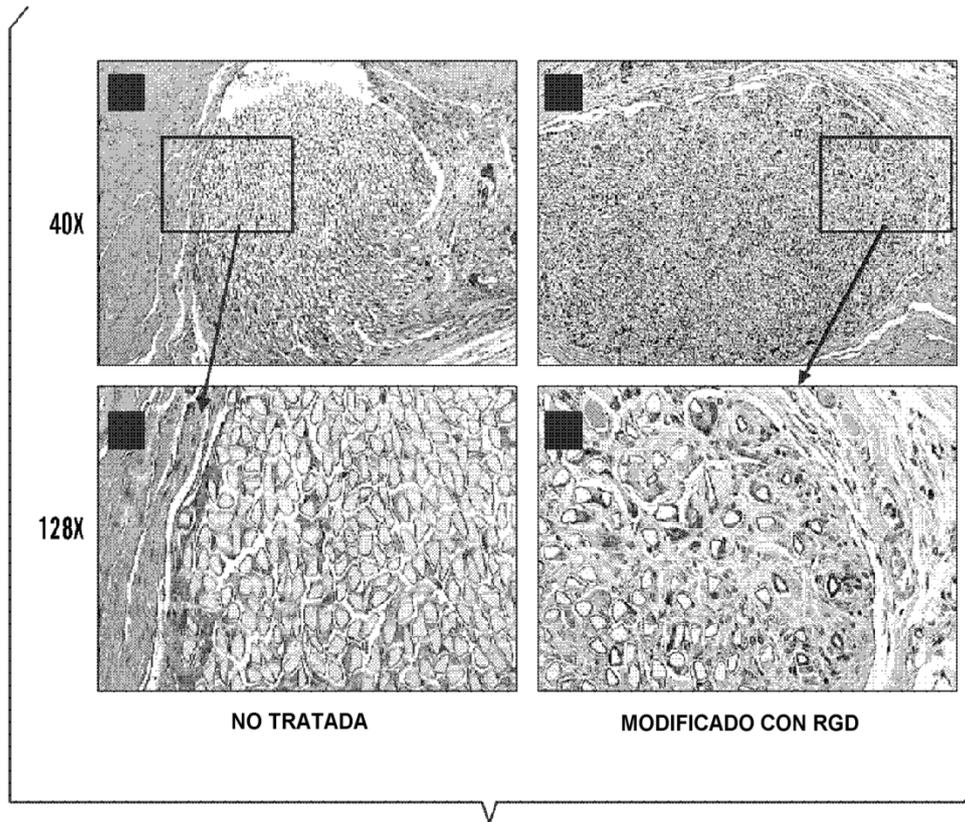


FIG. 13D

TRATAMIENTO DE SUPERFICIE	ÁREA EN SECCIÓN TRANSVERSAL DE SEDA (mm ²)		CAMBIO DEL DÍA 10 AL DÍA 90 (%)
	10 DÍAS	90 DÍAS	
NO TRATADA	0,000118	0,000115	2,5
N ₂ PLASMA	0,000129	0,000096	25,6
RGD	0,000129	0,000082	36,4

FIG. 13E

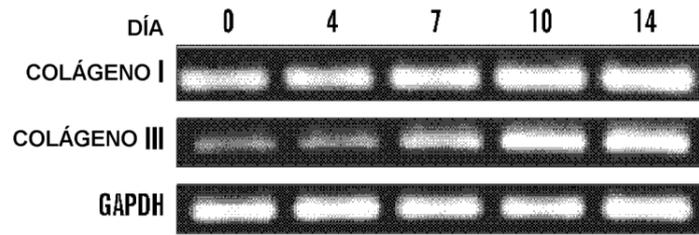
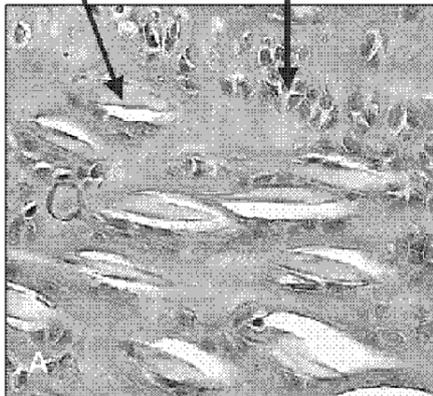


FIG. 14

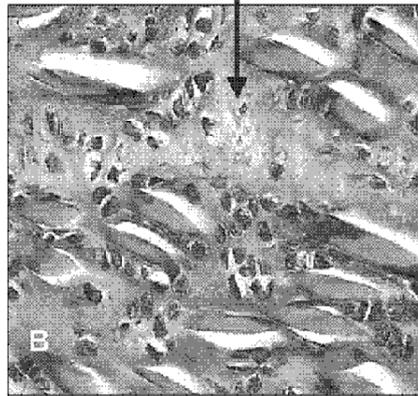
CÉLULAS HUÉSPEDAS DEL PROGENITOR
FIBRAS DE FIBROÍNA DE MATRIZ 1



TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA DE LCM DE CONEJO RECONSTRUIDO DESPUÉS DE 6 SEMANAS

FIG. 15A

CRECIMIENTO INTERNO DE COLÁGENO



TRICROMO

FIG. 15B

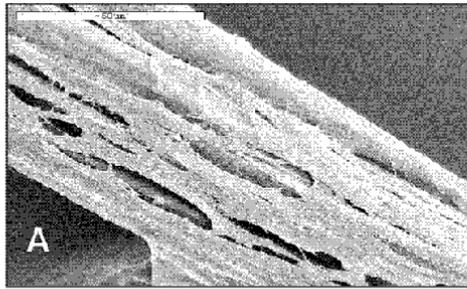


FIG. 16A

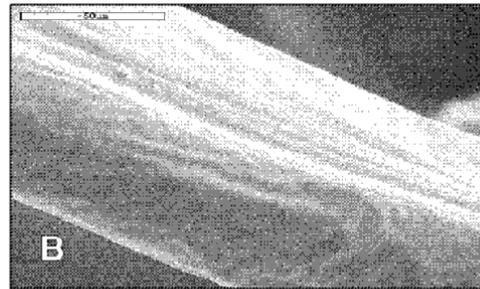


FIG. 16B

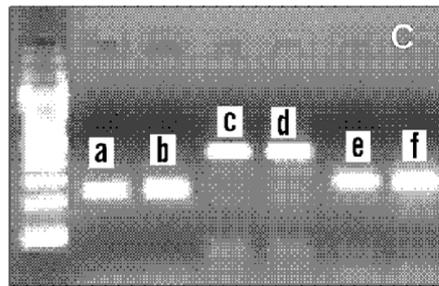


FIG. 16C

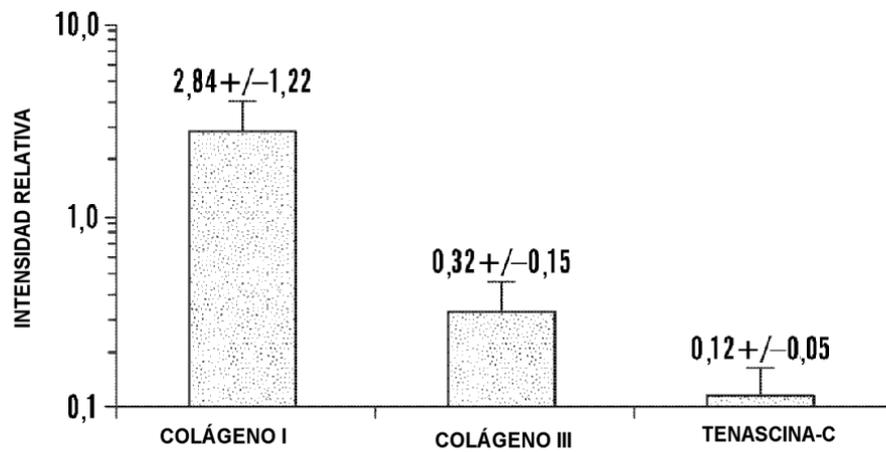
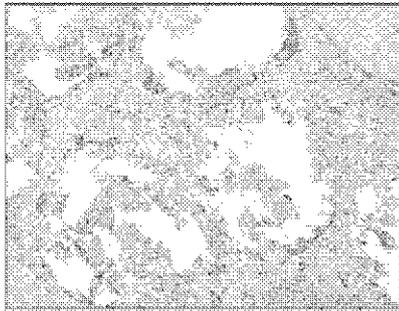


FIG. 17



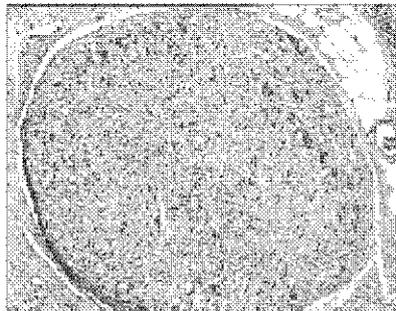
SUTURA DE SEDA

FIG. 18A



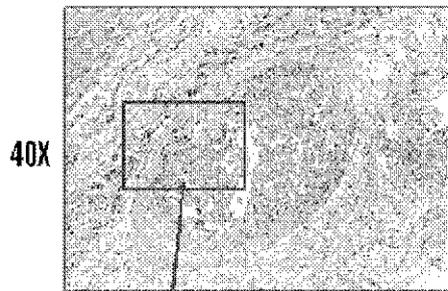
SEDA CON SUPERFICIE MODIFICADA CON RGO

FIG. 18B



SEDA SEMBRADA EN CÉLULA

FIG. 18C

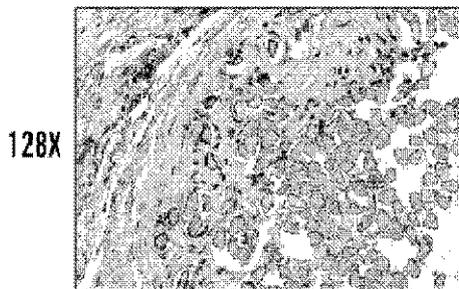


40X

19C—**FIG. 19A**



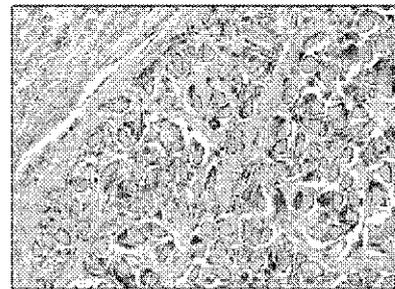
19D—**FIG. 19B**



128X

4x3x3

FIG. 19C



12x3

FIG. 19D

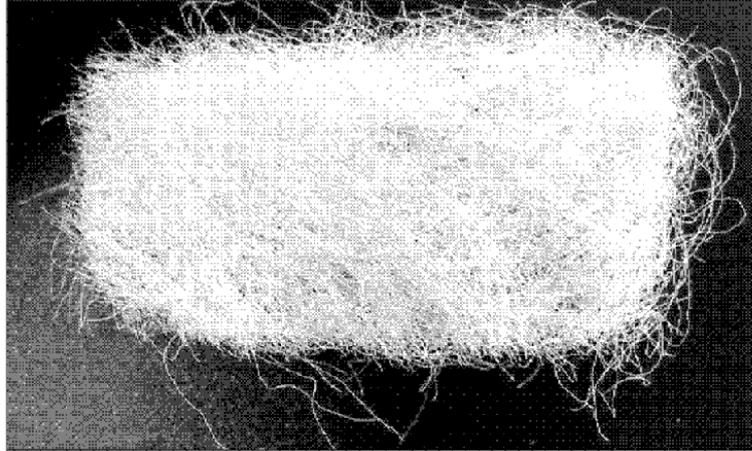


FIG. 20A

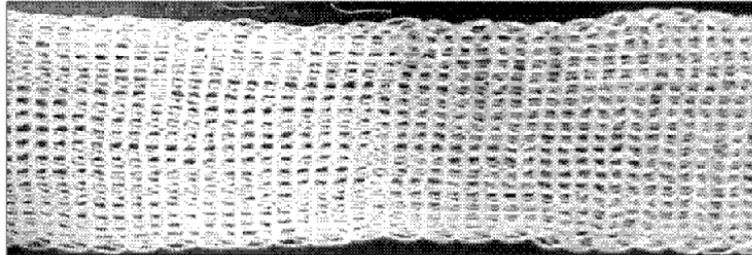


FIG. 20B



FIG. 20C

FIG. 21

