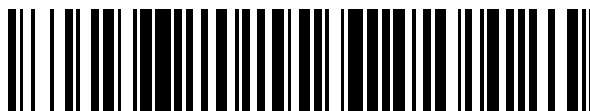


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 575**

51 Int. Cl.:

A61L 26/00 (2006.01)

A61L 27/26 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2004** **E 04796100 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014** **EP 1677846**

54 Título: **Composiciones de hidrogel bioactivo para la regeneración del tejido conjuntivo**

30 Prioridad:

22.10.2003 US 513392 P

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

17.11.2014

73 Titular/es:

**ENCELLE, INC. (100.0%)
1800 N. GREENE STREET
GREENVILLE, NC 27834, US**

72 Inventor/es:

**HILL, RONALD STEWART;
KLANN, RICHARD CHRIS y
LAMBERTI, FRANCIS V.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 522 575 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

Composiciones de hidrogel bioactivo para la regeneración del tejido conjuntivo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones para la regeneración del tejido conjuntivo, tales como hueso, cartílago, ligamento, tendón y similares. En particular, la invención se refiere a composiciones para uso en métodos para la regeneración del tejido conjuntivo mediante la aplicación de una matriz de hidrogel, en el que la matriz está compuesta de un polipéptido, tal como gelatina y un hidrato de carbono de cadena larga, tal como dextrano.

Antecedentes de la invención

Las lesiones en los huesos, tales como la fractura parcial o completa, pueden ser lentas de curar, pero este tipo de lesiones generalmente curan por sí solas con inmovilización externa, según sea necesario, por ejemplo, mediante la aplicación de un yeso en la zona afectada. En casos más graves, puede ser necesaria la inmovilización interna más agresiva, como volver a conectar permanentemente el hueso fracturado con tornillos y/o placas de metal. La regeneración de tejido óseo en las distancias relativamente cortas generalmente presentes en una fractura ósea se produce fácilmente en la mayoría de los pacientes sanos. Sin embargo, las lesiones óseas que son algo más que fracturas simples, presentan mayores desafíos en cuanto al tratamiento. La pérdida ósea diafisaria de un segmento largo, por ejemplo, puede ser el resultado de múltiples causas, entre ellas traumatismos de alta energía, como una lesión por explosión, enfermedad, tales como osteomielitis u osteonecrosis, o una escisión amplia de tumores malignos, como el osteosarcoma. En estos casos, frecuentemente se produce la cavitación del hueso o la pérdida completa de tejido óseo a lo largo de una gran longitud extendida del hueso (es decir, un defecto óseo crítico). La regeneración ósea en estos casos se convierte cada vez en algo más difícil y a veces imposible.

Se han utilizado muchas técnicas en un intento de mejorar el crecimiento del hueso. Más comúnmente, se hace un intento para reemplazar el hueso perdido. Ejemplos de tales técnicas incluyen injertos autólogos vascularizados de hueso, aloinjerto masivo (generalmente de cadáver) y el uso de hueso artificial reabsorbible y no reabsorbible. Otro método para promover la regeneración ósea es a través de la introducción de factores bioactivos osteoinductores, tales como proteínas morfogenéticas óseas (BMP), plasma rico en plaquetas (PRP), péptidos sintéticos, tales como P-15 (Pepgen P-15™, Dentsply International, York, PA) y aspirados de médula ósea. Tales factores bioactivos pueden introducirse en el área de la pérdida de hueso a través de diversos vehículos. Los métodos mecánicos, tales como la osteogénesis por distracción, se emplean también para la promoción de la regeneración ósea. La osteogénesis por distracción es un proceso que implica el desplazamiento gradual y controlado de las fracturas creadas quirúrgicamente que tiene como resultado la expansión simultánea de los tejidos blandos y el volumen óseo.

Una técnica algo menos invasiva que se utiliza más comúnmente para la regeneración de hueso alrededor de los dientes se conoce como "regeneración ósea guiada". Como el tejido que rodea a un hueso casi siempre se cura más rápido que el propio hueso, el tejido de más rápida curación se expande a menudo y llena el espacio donde falta el hueso, lo que dificulta la regeneración ósea. En la regeneración ósea guiada, se coloca una membrana biocompatible entre el tejido y el hueso que actúa como una barrera, lo que impide el crecimiento del tejido en el hueso. A menudo, un injerto de hueso se inserta debajo de la barrera. Las membranas se diseñan normalmente para disolverse después de varias semanas.

Una variante de este procedimiento se conoce como "regeneración ósea protegida" y se basa en la teoría de que se requieren tres requisitos previos para la curación del hueso: 1) suministro de sangre adecuado, 2) células formadoras de hueso abundantes y 3) espacio protegido de curación. Véase, Holmes, R.E., Lemperle, S.M., y Calhoun, C.J, "Protected Bone Regeneration", Serie de datos científicos de fijación reabsorbible, distribuido por Medtronic Sofamor Danek, disponible en línea en <http://www.macropore.com/pdf/ProtectedBone.pdf>.

El suministro de sangre adecuado es un requisito conocido para la regeneración ósea, ya que suministra el oxígeno y los nutrientes necesarios, así como las células madre mesenquimales (las células formadoras de hueso). Como se ha descrito anteriormente, el espacio de curación del hueso también debe ser protegido del crecimiento hacia el interior del tejido circundante. Según la publicación indicada anteriormente, todos los requisitos previos indicados se pueden lograr mediante el uso de un polímero reabsorbible con lámina protectora que ofrece una porosidad fisiológicamente equilibrada para el intercambio celular positivo y la oportunidad de infiltración vascular, a la vez que se previene la interposición de tejidos blandos adyacentes.

El documento WO 03/072157 A1 describe un revestimiento de matriz de hidrogel bioactivo estabilizado para dispositivos médicos que comprende un poliglicano, un polisacárido y un agente potenciador. La matriz de hidrogel bioactivo se puede utilizar en la regeneración de tejidos.

El documento US 5.972.385 describe matrices de colágeno de polisacáridos reticulados que se pueden utilizar en la reparación de tejidos tales como hueso, cartílago y tejido blando.

Si bien en la actualidad se conocen varios métodos, el tratamiento de una lesión asociada a una pérdida ósea importante sigue siendo un problema clínico difícil. Además, aproximadamente el 10 % de todas las fracturas de huesos largos son fracturas no consolidadas que no se curan espontáneamente. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de métodos para la regeneración ósea que sean eficaces en la promoción del crecimiento del tejido óseo y que sean lo menos invasivos posible.

Resumen de la invención

Según un aspecto principal de la presente invención, se proporcionan composiciones regenerativas de tejido conjuntivo según las reivindicaciones 1 y 30 y un método para formar una matriz de hidrogel bioactivo deshidratado según la reivindicación 47.

Se ha descubierto que la matriz descrita en la presente memoria es capaz de promover con éxito la regeneración del tejido conjuntivo. Sorprendentemente, la matriz es incluso útil para efectuar la regeneración ósea en el hueso con defectos que normalmente no se curan de forma espontánea. Se describe un método para la regeneración del tejido conjuntivo que comprende la administración de una matriz de hidrogel bioactivo en el sitio en necesidad de regeneración del tejido conjuntivo. Como se utiliza en la presente memoria, "bioactivo" pretende indicar la capacidad de facilitar una respuesta celular o tisular, tales como, la inducción de la vasculogénesis, la promoción de la unión celular a un material de soporte y la promoción de la regeneración de tejidos.

Se describe un método para regenerar tejido conjuntivo. El método comprende administrar a un sitio en necesidad de regeneración del tejido conjuntivo de una matriz de hidrogel bioactivo que comprende un polipéptido y un hidrato de carbono de cadena larga. El polipéptido se puede seleccionar de polipéptidos derivados de tejido o polipéptidos sintéticos. En una realización, el polipéptido es gelatina derivada de la piel. En otra realización, el polipéptido es gelatina derivada de hueso. Ejemplos de hidratos de carbono de cadena larga incluyen polisacáridos y polisacáridos sulfatados. En una realización, el hidrato de carbono de cadena larga es dextrano.

La matriz de hidrogel bioactivo comprende además uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en aminoácidos polares, quelantes de cationes divalentes, tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o sales de los mismos, y combinaciones de los mismos.

La matriz de hidrogel bioactivo, tal como se utiliza en el método anterior, puede incluir además uno o más agentes estructurantes, medicamentos, u otros agentes útiles para facilitar o mediar en la regeneración del tejido conjuntivo.

En una realización de la invención, la matriz de hidrogel bioactivo puede comprender además al menos un material osteoinductivo u osteoconductor. En esta realización de la invención, la composición es particularmente útil para la regeneración de hueso; por otra parte, el uso de materiales osteoinductivos u osteoconductivos no se limita a la regeneración ósea.

En otra realización más de la invención, la matriz de hidrogel bioactivo comprende además al menos un medicamento. Cualquier medicamento reconocible por un experto en la materia como útil en el tratamiento de lesiones de tejido conjuntivo, particularmente en los métodos de regeneración del tejido conjuntivo, podría ser utilizado. Por ejemplo, los medicamentos pueden incluir antivirales, antibacterianos, antiinflamatorios, inmunosupresores, analgésicos, anticoagulantes o diversos agentes de promoción de la cicatrización de heridas.

En una realización particular de la invención, la matriz de hidrogel bioactivo comprende además células madre o progenitoras, tales como las células madre adultas derivadas de tejido adiposo (ADAS) o células madre mesenquimales. Dichas células son conocidas en la técnica por ser útiles en diversas terapias debido a su capacidad de diferenciarse en diversos tipos de células. Las células ADAS, en particular, son conocidas para diferenciarse en tipos de células incluyendo condrocitos y osteoblastos.

En otra realización más, la matriz de hidrogel bioactivo está al menos parcialmente contenida dentro de un marco estructural tridimensional. Por consiguiente, el marco estructural puede incluirse en la matriz de hidrogel bioactivo antes de la administración de la matriz de hidrogel bioactivo en el sitio en necesidad de regeneración del tejido conjuntivo. Alternativamente, se puede formar el marco estructural alrededor del sitio en necesidad de regeneración del tejido conjuntivo en el momento de administración de la matriz de hidrogel bioactivo (es decir, formado poco antes o poco después de la administración de la matriz de hidrogel bioactivo). El marco estructural tridimensional, por lo tanto, incluye cualquier material capaz de proporcionar soporte estructural que aguante carga o espacio anatómico para la infiltración celular e incluye, por ejemplo, una jaula de metal, un marco cerámico sinterizado, una esponja de colágeno, o hueso alogénico o autólogo. El marco estructural puede incluir además estructuras tridimensionales preparadas a partir de materiales poliméricos, incluyendo biopolímeros.

La matriz de hidrogel bioactivo también se puede utilizar en los métodos descritos en la presente memoria en una forma deshidratada. En dicha forma, la matriz de hidrogel bioactivo conserva sus propiedades beneficiosas y, sin embargo, puede ser almacenada y transportada en una forma sólida, pudiendo rehidratarse para su uso en los métodos descritos en la presente memoria. En una realización, la matriz de hidrogel bioactivo es para uso en la

- administración en una forma deshidratada de tal manera que los fluidos corporales rehidraten la matriz de hidrogel bioactivo. En otra realización, la matriz de hidrogel bioactivo está en forma deshidratada y es para uso en un método que comprende además rehidratar la matriz de hidrogel bioactivo con un fluido de rehidratación antes de la administración de la matriz de hidrogel bioactivo al sitio en necesidad de regeneración del tejido conjuntivo. En la forma deshidratada, la matriz de hidrogel bioactivo puede ser conformada o procesada en diferentes conformaciones y formas. Por ejemplo, la matriz de hidrogel bioactivo deshidratado puede estar en una pieza unitaria capaz de ser conformada para ajustarse con precisión al sitio en necesidad de regeneración del tejido conjuntivo. Alternativamente, la matriz de hidrogel bioactivo deshidratado puede estar en forma de partículas. La matriz de hidrogel bioactivo deshidratado en partículas podría mezclarse en una solución que contiene otros componentes beneficiosos, tales como células madre o progenitoras o medicamentos, combinarse con materiales osteoinductivos u osteoconductivos para formar un material de tipo masilla o pasta para la colocación en el sitio en necesidad de regeneración del tejido conjuntivo o utilizarse en otras preparaciones que podrían ser útiles en los métodos descritos en la presente memoria.
- En otras realizaciones de la invención, puede ser útil para la matriz de hidrogel bioactivo tener estructura o resistencia adicional en ausencia de aditivos. Por consiguiente, la presente invención también incluye realizaciones en las que la matriz de hidrogel bioactivo está en forma reticulada, estando el hidrato de carbono de cadena larga covalentemente reticulado con el polipéptido. En tales realizaciones, la matriz de hidrogel bioactivo puede ser utilizada sólo en los métodos descritos en la presente memoria o puede ser utilizada conjuntamente con otros componentes como se describe en la presente memoria.
- En una realización de la invención, la matriz de hidrogel bioactivo es para usar en la inserción en una superficie de un hueso en necesidad de reparación o regeneración (es decir, un defecto óseo). La cantidad de la matriz de hidrogel bioactivo utilizada en el hueso puede variar dependiendo del tamaño del defecto óseo, la forma de la matriz de hidrogel bioactivo y la presencia o ausencia de aditivos como se describe en la presente memoria. Generalmente, la cantidad total de la matriz de hidrogel bioactivo usada es la cantidad necesaria para llenar el área de la pérdida ósea.
- De acuerdo con otra realización de la presente invención, la matriz de hidrogel es para uso en la reparación de tejido blando ya sea por separado o conjuntamente con la regeneración del tejido duro cercano, tal como hueso. Según esta realización, la matriz de hidrogel bioactivo es para uso en la administración de alrededor de y/o la inyección en el tejido blando.
- De acuerdo con otra realización de la presente invención, la matriz de hidrogel es para uso en la reparación y/o regeneración del tejido conjuntivo no óseo. De acuerdo con esta realización, la matriz de hidrogel bioactivo es para uso en la administración de un área que tiene pérdida de, o daños en el tejido conjuntivo, que incluye tejido derivado de fibroblastos, tales como tendones y ligamentos, o condrocitos, como el cartílago.
- De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporcionan varias composiciones regenerativas de tejido conjuntivo. Las composiciones son particularmente útiles en la regeneración del tejido conjuntivo o para el tratamiento de pacientes que tienen diversas enfermedades degenerativas del tejido conjuntivo. Por consiguiente, las composiciones descritas en la presente memoria son particularmente útiles en los métodos también descritos en la presente memoria.
- En una realización de este aspecto de la invención, la composición regenerativa de tejido conjuntivo comprende un marco estructural tridimensional y una matriz de hidrogel bioactivo al menos parcialmente contenida dentro del marco estructural tridimensional, en la que la matriz de hidrogel bioactivo comprende un polipéptido y un hidrato de carbono de cadena larga. La matriz de hidrogel bioactivo comprende además uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en aminoácidos polares y quelantes de cationes divalentes, tales como EDTA o sus sales. En una realización particular, el marco estructural tridimensional incluye una matriz de hidrogel reticulado. En otra realización preferida, el marco estructural tridimensional incluye una esponja de colágeno.
- En otra realización, la composición regenerativa del tejido conjuntivo comprende al menos un material osteoinductivo u osteoconductivo y una matriz de hidrogel bioactivo que comprende un polipéptido y un hidrato de carbono de cadena larga. El material osteoinductivo u osteoconductivo puede estar dispersado dentro de la matriz de hidrogel bioactivo. En una realización preferida, el material osteoinductivo u osteoconductivo y la matriz de hidrogel bioactivo pueden estar mezclados. La matriz de hidrogel bioactivo puede estar en una forma hidratada o puede estar en una forma deshidratada.
- En otra realización más de la invención, la composición regenerativa de tejido conjuntivo comprende células madre o progenitoras y una matriz de hidrogel bioactivo que comprende un polipéptido y un hidrato de carbono de cadena larga. Una vez más, la matriz de hidrogel bioactivo puede estar en una forma hidratada o puede estar en una forma deshidratada.
- Se describe que la matriz de hidrogel bioactivo se puede utilizar para unir o volver a unir dos o más tejidos conjuntivos. El método comprende: recubrir al menos una parte de al menos uno de un primer y segundo tejido

conjuntivo con una matriz de hidrogel bioactivo que comprende un polipéptido y un hidrato de carbono de cadena larga; poner en contacto el primer tejido conjuntivo con el segundo tejido conjuntivo en un punto de unión; y unir el primer tejido conjuntivo con el segundo tejido conjuntivo usando suturas, grapas u otros medios apropiados. Dicho método es particularmente útil para unir tejido conjuntivo, tales como tendón o ligamento, al hueso. El método es además útil para unir tejido conjuntivo blando con otro tejido conjuntivo blando, tales como tendón con tendón o ligamento con ligamento.

Según otro aspecto de la invención, la matriz de hidrogel bioactivo es para uso en un método para el tratamiento de enfermedades degenerativas de la articulación natural de un paciente en necesidad de tratamiento de las mismas. En una realización, la matriz de hidrogel bioactivo es para uso en un método que comprende aplicar a una articulación afectada por una enfermedad degenerativa, una matriz de hidrogel bioactivo que comprende un polipéptido y un hidrato de carbono de cadena larga. Además, opcionalmente, la matriz de hidrogel bioactivo puede incluir células madre o progenitoras. Preferiblemente, la etapa de administración comprende la inyección de la matriz de hidrogel bioactivo en la articulación afectada. El método es particularmente útil para detener o revertir la progresión de enfermedades degenerativas de las articulaciones, como la osteoartritis.

Las composiciones de la presente invención son particularmente útiles para la reparación de tejido conjuntivo de la rodilla, como el ligamento cruzado anterior, el ligamento cruzado posterior, el tendón rotuliano, el tendón del cuádriceps y el ligamento meniscofemoral anterior.

Las composiciones de la invención son útiles además para el tratamiento de un paciente que tiene una articulación artificial. En particular, las composiciones regenerativas de tejido conjuntivo se pueden administrar alrededor del sitio de la articulación artificial, ya sea durante la colocación de la articulación artificial o después de la cirugía, para facilitar la integración de la articulación artificial en el tejido circundante.

Breve descripción de los dibujos

Habiendo descrito así la invención en términos generales, se hará ahora referencia a los dibujos adjuntos, en donde:

- La Figura 1 ilustra la formación de cadenas alfa abiertas derivadas de monómeros de colágeno;
- Las Figuras 2A y 2B ilustran el efecto de la asociación de las cadenas alfa derivadas del colágeno con dextrano;
- La Figura 3 ilustra el efecto de otros aditivos utilizados en la matriz de hidrogel bioactivo de la invención;
- La Figura 4 ilustra gráficamente la agregación celular en varios tipos de células en la presencia de la matriz de hidrogel bioactivo de la presente invención;
- La Figura 5 ilustra el efecto de la matriz de hidrogel bioactivo de la presente invención sobre la expresión del gen de la BMP-2 en comparación con la expresión en células en medio libre de suero (SFM);
- La Figura 6 ilustra el aumento de la expresión del ARN mensajero del factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF) en células de condrosarcoma tratadas con la matriz de hidrogel bioactivo de la invención en comparación con células en SFM;
- La Figura 7 ilustra la expresión del ARN mensajero del agregano en células de condrosarcoma tratadas con la matriz de hidrogel bioactivo de la invención en comparación con las células en SFM;
- La Figura 8 ilustra una matriz de hidrogel bioactivo reticulado de la invención que comprende dextrano y gelatina;
- La Figura 9 ilustra el efecto de la matriz de hidrogel bioactivo de la presente invención en la producción de proteína BMP-2 en comparación con la producción en las células en medio que contenía suero (SCM) y
- La Figura 10 ilustra el efecto de la matriz de hidrogel bioactivo reticulado de la presente invención sobre la expresión del gen de la BMP-2.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá ahora con más detalle a continuación con referencia a los dibujos adjuntos, en los que se muestran realizaciones preferidas de la invención. Esta invención puede, sin embargo, ser realizada de muchas formas diferentes y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones expuestas en la presente memoria; más bien, estas realizaciones se proporcionan para que esta descripción sea minuciosa y completa, y transmita completamente el alcance de la invención a los expertos en la materia.

La formulación de una matriz de hidrogel termorreversible que proporciona un medio de cultivo celular y una composición para preservar la viabilidad celular se enseña en la patente US-6.231.881. Además, en la patente US-6.261.587 se proporciona una matriz de hidrogel útil en la promoción de la vascularización. La matriz de hidrogel termorreversible enseñada en estas referencias es un gel a temperaturas de almacenamiento y una masa fundida a temperaturas fisiológicas, y comprende una combinación de un componente derivado de colágeno, tal como gelatina, un hidrato de carbono de cadena larga, tal como dextrano y cantidades eficaces de otros componentes, tales como aminoácidos polares.

La presente invención proporciona composiciones regenerativas del tejido conjuntivo. También se describen métodos de regeneración del tejido conjuntivo en un sitio en necesidad de la regeneración del tejido conjuntivo. Las composiciones de la invención incluyen una matriz de hidrogel bioactivo que comprende generalmente un polipéptido y un hidrato de carbono de cadena larga.

Un polipéptido, como se utiliza en la presente memoria, se pretende que abarque cualquier polipéptido derivado de tejido o producido sintéticamente, tales como colágenos o gelatinas derivadas del colágeno. Aunque la gelatina derivada de colágeno es el componente de polipéptido preferido, se pueden usar otros componentes similares a la gelatina caracterizados por un esqueleto compuesto por secuencias de aminoácidos que tienen grupos polares que son capaces de interactuar con otras moléculas. Por ejemplo, se podrían utilizar queratina, decorina, agrecano, glicoproteínas (incluyendo proteoglicanos) y similares para proporcionar el componente polipéptido. En una realización, el componente polipéptido es gelatina porcina procedente de colágeno parcialmente hidrolizado derivado de tejido de la piel. Los polipéptidos derivados de otros tipos de tejido también se podrían usar. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, extractos de tejidos de arterias, cuerdas vocales, pleura, tráquea, bronquios, tabiques alveolares pulmonares, ligamentos, cartílago auricular o fascia abdominal, la red reticular del hígado, la membrana basal del riñón o neurilema, aracnoides, duramadre o piamadre del sistema nervioso. También se pueden utilizar polipéptidos purificados incluyendo, entre otros, laminina, nidógeno, fibulina y fibrilina o mezclas de proteínas, tales como los descritos en la patente US-6.264.992 y en la patente US- 4.829.000, extractos de caldo de cultivo celular como se describe en la patente US-6.284.284, tejidos submucosos tales como los descritos en la patente US-6.264.992 o productos génicos, tales como los descritos en la patente US-6.303.765. Otro ejemplo de un polipéptido adecuado es una proteína de fusión obtenida acoplado por ingeniería genética una especie reactiva conocida en una proteína.

El componente polipéptido preferiblemente tiene un intervalo de masa molecular de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 3.000.000 Da, más preferiblemente de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 300.000 Da, más preferiblemente de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 250.000 Da. La masa molecular se puede expresar como una masa molecular promedio en peso (M_w) o como una masa molecular promedio en número (M_n). Ambas expresiones se basan en la caracterización de una solución que contiene soluto macromolecular que tiene un número medio de moléculas (n_i) y una masa molar para cada molécula (M_i). En consecuencia, la masa molecular promedio en número se define por la fórmula 1 siguiente.

$$M_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} \quad (1)$$

La masa molecular promedio en peso (también conocida como masa molecular media) se puede medir directamente usando métodos de dispersión de la luz y se define por la fórmula 2 siguiente.

$$M_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} \quad (2)$$

La masa molecular también se puede expresar como una masa molar promedio Z (M_z), en la que el cálculo pone mayor énfasis en moléculas con grandes masas molares. La masa molar promedio Z se define por la fórmula 3 siguiente.

$$M_z = \frac{\sum n_i M_i^3}{\sum n_i M_i^2} \quad (3)$$

A menos que se indique lo contrario, la masa molecular se expresa en la presente memoria como la masa molecular promedio en peso.

Además de la masa molecular, las soluciones de polímeros también pueden describirse físicamente en términos de polidispersidad, que representa la amplitud de la distribución de la masa molecular dentro de la solución, estando dicha distribución en el intervalo de diferentes masas moleculares de las moléculas de polímero individuales en la solución. La polidispersidad es la relación entre la masa molecular promedio en número y la masa molecular promedio en peso, que se define por la fórmula 4 siguiente.

$$\text{Polidispersidad} = \frac{M_w}{M_n} \quad (4)$$

Si la polidispersidad es igual a 1 (es decir, M_n es igual a M_w), se dice que el polímero es monodisperso. Un polímero verdaderamente monodisperso es aquel en el que todas las moléculas de polímero dentro de la solución tienen una sola masa molecular idéntica. Como la M_n cambia con la M_w , los cambios de polidispersidad siempre son mayores que 1. La polidispersidad de una solución de polímero dado puede afectar a las características físicas del polímero, y, por lo tanto, la interacción entre el polímero con otro polímero. La investigación ha demostrado que, en mezclas acuosas de biopolímeros (incluyendo gelatina y dextrano), un aumento del peso molecular tiene como resultado un sistema menos compatible con una temperatura de separación de fase superior, mientras que una disminución de la concentración da lugar a un sistema más compatible con una temperatura de separación de fase más baja (véase E.H.A. de Hoog y R.H. Tromp, On the phase separation kinetics of an aqueous biopolymer mixture in the presence of gelation: the effect of the quench depth and the effect of the molar mass, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 213 (2-3), páginas 221-234). Preferiblemente, el polipéptido usado de acuerdo con la presente invención tiene una polidispersidad cercana a 1. En una realización preferida, el polipéptido tiene una polidispersidad de 1 a aproximadamente 4, más preferiblemente, aproximadamente 1 a aproximadamente 3, más preferiblemente de aproximadamente 1,1 a aproximadamente 2,4.

El polipéptido utilizado en la matriz de hidrogel bioactivo de la invención es preferiblemente una gelatina, tal como gelatina derivada de colágeno.

El colágeno es un componente proteico principal de la matriz extracelular de los animales. En el desarrollo fetal temprano, una forma más abierta de colágeno (en comparación con el colágeno maduro fuertemente unido) está asociada con grandes moléculas de hidratos de carbono, y sirve como andamiaje del tejido predominante. Se cree que la unión de células diferenciadas o incompletamente diferenciadas de origen mesenquimal a este andamiaje de colágeno de tipo proteoglicano tiene como resultado una respuesta específica en el tejido hospedador. Esta respuesta es guiar la diferenciación del tejido mesenquimal.

El colágeno se ensambla en una organización fibrilar compleja. Las fibrillas se ensamblan en haces que forman las fibras. Las fibrillas están hechas de cinco microfibrillas colocadas en una disposición escalonada. Cada microfibrilla es una colección de varillas de colágeno. Cada varilla de colágeno es una triple hélice enrollada hacia la derecha, siendo cada hebra una hélice enrollada a la izquierda. Las fibrillas de colágeno están reforzadas con enlaces cruzados intramoleculares e intermoleculares covalentes que hacen que los tejidos de los animales maduros sean insolubles en agua fría. Cuando se utilizan los tratamientos adecuados, las varillas de colágeno se extraen y se solubilizan guardando su conformación como triples hélices. Este es el colágeno desnaturalizado y difiere de la forma nativa del colágeno, aunque no ha sido sometido a tratamiento térmico o químico suficiente para romper los enlaces covalentes estabilizadores intramoleculares que existen en el colágeno. Cuando las soluciones de colágeno se calientan suficientemente, o cuando los tejidos que contienen el colágeno nativo se someten a tratamientos químicos y térmicos, los enlaces de hidrógeno y covalentes que estabilizan las hélices de colágeno se rompen, y las moléculas adoptan una conformación desordenada. Al romperse estos enlaces de hidrógeno, los grupos amina y ácido carboxílico polares ya están disponibles para unirse a los grupos polares de otras fuentes o a ellos mismos. Este material es la gelatina y es soluble en agua a 40-45 °C.

Como se señaló anteriormente, la gelatina es una forma de colágeno desnaturalizado y se obtiene mediante la hidrólisis parcial de colágeno derivado de la piel, tejido conjuntivo blanco o de los huesos de animales. La gelatina puede derivarse de un precursor tratado con ácido o de un precursor tratado con álcali. La gelatina derivada de un precursor tratado con ácido se conoce como Tipo A y la gelatina derivada de un precursor tratado con álcali se conoce como Tipo B. Los cambios estructurales macromoleculares asociados con la degradación del colágeno son básicamente los mismos para la hidrólisis química y la hidrólisis térmica parcial. En el caso de la degradación térmica y la catalizada por ácido, la escisión hidrolítica predomina dentro de las cadenas de colágeno individuales. En la hidrólisis alcalina predomina la escisión de enlaces cruzados intermoleculares e intramoleculares.

Preferiblemente, la gelatina utilizada en la presente invención es gelatina derivada de la piel o gelatina derivada del hueso. En una realización preferida, la gelatina tiene una masa molecular de aproximadamente 80.000 Da a aproximadamente 200.000 Da. Además, se prefiere que la gelatina tenga una polidispersidad de 1 a aproximadamente 3. En una realización preferida, la gelatina tiene una polidispersidad de aproximadamente 1,1 a aproximadamente 2,4.

El polipéptido, tal como gelatina, está preferiblemente presente en una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 40 mM, preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 30 mM, más preferiblemente de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 5 mM. Ventajosamente, la concentración de gelatina es de aproximadamente 0,75 mM. Las concentraciones anteriores proporcionan una fase no fluida a la temperatura de almacenamiento (por debajo de aproximadamente 33 °C) y una fase fluida a la temperatura de tratamiento (aproximadamente 35 a aproximadamente 40 °C).

La matriz de hidrogel bioactivo de la presente invención también comprende un hidrato de carbono de cadena larga. La expresión hidrato de carbono de cadena larga se pretende que abarque generalmente cualquier polisacárido o polisacárido sulfatado que conste de más de aproximadamente 10 residuos de monosacárido unidos entre sí por enlaces glicosídicos. La frase también pretende incluir otros hidratos de carbono de cadena larga, incluyendo

heterosacáridos y clases específicas de hidratos de carbono, tales como almidones, azúcares, celulosas y gomas. El hidrato de carbono de cadena larga puede consistir en los mismos residuos de monosacárido o en diversos residuos de monosacárido o derivados de residuos de monosacárido. El dextrano, un polisacárido preferido, comprende únicamente residuos de glucosa.

5 En la presente invención se puede utilizar cualquier polisacárido, incluidos los glicosaminoglicanos (GAG) o glucosaminoglicanos, con viscosidad adecuada, la masa molecular y otras propiedades deseables. Por glicosaminoglicano se entiende cualquier glicano (es decir, polisacárido) que comprende una cadena de polisacárido no ramificada con una unidad repetitiva de disacárido, uno de los cuales es siempre un amino azúcar. Estos compuestos, como clase, tienen una alta carga negativa, son fuertemente hidrófilos y son comúnmente llamados mucopolisacáridos. Este grupo de polisacáridos incluye heparina, sulfato de heparán, condroitín sulfato, dermatán sulfato, queratán sulfato y ácido hialurónico. Estos GAG se encuentran predominantemente en superficies celulares y en la matriz extracelular. Por glucosaminoglicano se entiende cualquier glicano (es decir polisacárido) que contiene predominantemente derivados de monosacárido en los que un grupo hidroxilo alcohólico se ha sustituido por un grupo amino u otro grupo funcional, tal como sulfato o fosfato. Un ejemplo de un glucosaminoglicano es el poli-N-acetil glucosaminoglicano, comúnmente conocido como quitosano. Ejemplos de polisacáridos que pueden ser útiles en la presente invención incluyen dextrano, heparán, heparina, ácido hialurónico, alginato, agarosa, carragenano, amilopectina, amilosa, glicógeno, almidón, celulosa, quitina, quitosano y diversos polisacáridos sulfatados, tales como heparán sulfato, condroitín sulfato, dextrán sulfato, dermatán sulfato o queratán sulfato.

10 El hidrato de carbono de cadena larga tiene preferiblemente una masa molecular de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 8.000.000 Da, más preferiblemente de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 1.000.000 Da, más preferiblemente de aproximadamente 200.000 a aproximadamente 800.000 Da. En una realización, el hidrato de carbono de cadena larga tiene una masa molecular de aproximadamente 500.000 Da.

15 Preferiblemente, el hidrato de carbono de cadena larga cadena utilizado según la presente invención tiene una polidispersidad cercana a 1. En una realización preferida, el polipéptido tiene una polidispersidad de 1 a aproximadamente 3, más preferiblemente, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 2,4.

20 Como se señaló anteriormente, un hidrato de carbono de cadena larga preferido para uso en la presente invención es el dextrano. El dextrano comprende generalmente cadenas lineales de residuos de D-glucosa unidos en $\alpha(1 \rightarrow 6)$, frecuentemente con ramificaciones $\alpha(1 \rightarrow 2)$ o $\alpha(1 \rightarrow 3)$. El dextrano nativo, producido por una serie de especies de bacterias de la familia Lactobacillaceae, es una mezcla polidispersa de componentes. Los dextranos han sido ampliamente utilizados como sustitutos del plasma y extensores de sangre, se consideran totalmente biocompatibles y son metabolizables. Los dextranos están disponibles en una amplia gama de masas moleculares promedio, que varía de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 40.000.000 Da. Preferiblemente, el dextrano usado en la invención tiene una masa molecular de aproximadamente 200.000 a aproximadamente 800.000 Da, más preferiblemente de aproximadamente 300.000 a aproximadamente 600.000 Da. En una realización preferida, el dextrano tiene una masa molecular de aproximadamente 500.000 Da. Los dextranos tienen diferentes tasas de reabsorción in vivo de aproximadamente dos a aproximadamente 20 días dependiendo de su masa molecular.

25 El hidrato de carbono de cadena larga, tal como el dextrano, está preferiblemente presente en una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mM, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 mM, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 mM. En una realización, el dextrano está presente en una concentración de aproximadamente 0,1 mM.

30 Aunque el dextrano nativo se utiliza generalmente en la presente invención, el uso de derivados de dextrano, tales como sulfato de dextrano y fosfato de dextrano también está dentro del alcance de la invención. En una realización, los derivados son derivados polimerizables por radicales libres, preferiblemente derivados fotopolimerizables, tales como acrilatos. De acuerdo con esta realización, la composición se puede inyectar como un líquido viscoso y se polimeriza in situ para formar un material sólido. El dextrano se puede seleccionar también para que se degrade a una velocidad que se aproxime al crecimiento hacia el interior de nuevo hueso o tejido. Esas composiciones que incluyen grupos polimerizables por radicales libres también pueden incluir iniciadores de la polimerización, tales como fotoiniciadores, tales como éteres de benzoína e iniciadores térmicamente activables, tales como azobisisobutironitrilo (AIBN) y éter di-t-butilo. Iniciadores de la polimerización por radicales libres y las condiciones para llevar a cabo las polimerizaciones por radicales libres, son bien conocidas por los expertos en la materia y cualquiera de tales métodos están incluidos en la presente invención.

35 En una realización preferida, la gelatina y el dextrano son componentes de la matriz de hidrogel bioactivo de la presente invención. Para facilitar la descripción de la invención, los términos "gelatina" y "dextrano" se utilizan en todo el documento entendiendo que las diversas alternativas como se describió anteriormente, tales como otros polipéptidos y otros hidratos de carbono de cadena larga, considerados inmediatamente por los expertos en la materia, se contemplan por la presente invención.

40 Aunque no limitada por ninguna teoría particular, la presente invención está destinada a proporcionar un andamiaje de matriz diseñado para maximizar los sitios de unión de hidrógeno de los aminoácidos polares que se encuentran

en las cadenas alfa derivadas del colágeno. Estas cadenas alfa, o gelatina, se derivan preferiblemente de gelatina de cerdo y se estabilizan con dextrano de masa molecular 500.000 Da u otros hidratos de carbono de cadena larga, añadidos mientras se calientan las cadenas alfa. Los grupos polares cargados positivamente de las cadenas alfa derivadas del colágeno pueden entonces asociarse con los grupos OH cargados negativamente de las unidades repetitivas de glucosa que existen en el dextrano. La gelatina y el dextrano forman una estructura de tipo proteoglicano. Las figuras 1-3 ilustran la interacción entre los diversos componentes de la realización preferida de la matriz de la invención y la interacción entre la matriz y el tejido de un paciente.

La Figura 1 ilustra la creación de cadenas alfa polares **15** de tropocolágeno **10** derivado de colágeno maduro. El calentamiento del tropocolágeno **10** altera los puentes de hidrógeno que contienen herméticamente los monómeros de triple hélice en el colágeno maduro. Al romperse estos enlaces de hidrógeno, los grupos amina y ácido carboxílico polares ya están disponibles para unirse a los grupos polares de otras fuentes o a ellos mismos.

Las Figuras 2A-2B ilustran la estabilización del andamiaje monomérico de la matriz mediante la introducción de un hidrato de carbono de cadena larga **20**, tal como el dextrano. Como se muestra en la Figura 2B, sin el hidrato de carbono de cadena larga **20**, la cadena alfa **15** formará enlaces de hidrógeno entre los grupos amino y ácido carboxílico dentro de la parte lineal del monómero y se doblará sobre sí misma, limitando así los sitios disponibles para la unión celular. Como se muestra en la Figura 2A, el hidrato de carbono de cadena larga **20** sirve para mantener la cadena alfa **15** abierta al interferir con este proceso de plegado.

Además del polipéptido y del hidrato de carbono de cadena larga, la matriz de hidrogel bioactivo comprende además uno o más componentes útiles para mejorar la bioadhesividad de la matriz de hidrogel. Tales componentes incluyen aminoácidos polares, quelantes de cationes divalentes y sus combinaciones. En una realización preferida, todos los componentes de la matriz de hidrogel bioactivo se presentan mezclados.

La matriz de hidrogel bioactivo incluye preferiblemente uno o más aminoácidos polares en una cantidad eficaz para aumentar la rigidez de la matriz de hidrogel y permitir la administración directa de la matriz de hidrogel, tal como a través de inyección, a un sitio en necesidad de regeneración del tejido conjuntivo. Como se usa en la presente memoria, los aminoácidos polares se definen comúnmente y se pretende que incluyan tirosina, cisteína, serina, treonina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, lisina e histidina. Preferiblemente, los aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste en cisteína, arginina, lisina, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico. Cuando los aminoácidos polares están presentes en la matriz de hidrogel bioactivo, los aminoácidos polares están preferiblemente presentes en una concentración de aproximadamente 3 a aproximadamente 150 mM, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 65 mM, y más preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 mM.

Ventajosamente, los aminoácidos polares añadidos comprenden ácido L-glutámico, L-lisina y L-arginina. La concentración final de ácido L-glutámico es generalmente de aproximadamente 2 a aproximadamente 60 mM, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 mM, más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 mM. En una realización, la concentración de ácido L-glutámico es de aproximadamente 20 mM. La concentración final de L-lisina es generalmente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 30 mM, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 mM, más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mM. En una realización, la concentración de L-lisina es de aproximadamente 5,0 mM. La concentración final de L-arginina es generalmente de aproximadamente 1 a aproximadamente 40 mM, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 mM, más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mM. En una realización, la concentración final de arginina es de aproximadamente 15 mM.

Por aminoácido se entiende todos los alfa aminoácidos de origen natural, tanto en su formas estereoisómera D como L y sus análogos y derivados. Un análogo se define como una sustitución de un átomo o grupo funcional en el aminoácido con un átomo o grupo funcional diferente que normalmente tiene propiedades similares. Un derivado se define como un aminoácido que tiene otra molécula o átomo unido a él. Derivados incluirían, por ejemplo, la acetilación de un grupo amino, la aminación de un grupo carboxilo o la oxidación de los residuos azufre de dos moléculas de cisteína para formar la cistina. Como se señaló anteriormente, la matriz de hidrogel bioactivo de la invención puede incluir uno o más aminoácidos polares.

Los aminoácidos utilizados en la matriz de hidrogel bioactivo de la presente invención también pueden estar presentes como dipéptidos, los cuales son especialmente beneficiosos para la obtención de aminoácidos que tienen una solubilidad en agua reducida, tales como L-glutamina. En consecuencia, los aminoácidos añadidos a la matriz de hidrogel pueden incluir dipéptidos, tales como L-alanil-L-glutamina. Cuando está presente en la matriz de hidrogel, el intervalo de concentración de la L-alanil-L-glutamina es preferiblemente de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1 mM, más preferiblemente de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,5 mM, más preferiblemente de aproximadamente 0,008 a aproximadamente 0,1 mM. En una realización particular, la concentración final de la L-alanil-L-glutamina es de aproximadamente 0,01 mM.

Los aminoácidos añadidos también pueden incluir L-cisteína, que es ventajosa en muchos aspectos. La cisteína es útil para proporcionar puentes disulfuro, además de añadir soporte y estructura a la matriz de hidrogel bioactivo y

5 aumentar su resistencia a la fuerza. La concentración final de cisteína es generalmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 5.000 μM , preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 μM , más preferiblemente de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 μM . En una realización, la concentración final de cisteína es de aproximadamente 700 μM . La L-cisteína también actúa como un eliminador u inhibidor del óxido nítrico. Los inhibidores de óxido nítrico incluyen cualquier composición o agente que inhibe la producción de óxido nítrico o neutraliza o elimina el óxido nítrico existente. El óxido nítrico, un mediador de la inflamación pleiotrópico, es un gas soluble producido por las células endoteliales, macrófagos y neuronas específicas del cerebro, y es activo en la inducción de una respuesta inflamatoria. El óxido nítrico y sus metabolitos son conocidos por causar la muerte celular, la destrucción nuclear y otros daños relacionados.

10 En consecuencia, la matriz de hidrogel bioactivo puede incluir opcionalmente uno o más inhibidores del óxido nítrico adicionales, tales como aminoguanidina, N-monometil-L-arginina, N-nitro-L-arginina, cisteína, heparina y mezclas de los mismos. Cuando está presente en la matriz de hidrogel, la concentración final de inhibidores del óxido nítrico es generalmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 μM , preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 μM , más preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 μM . En una realización, la concentración final es de aproximadamente 20 μM .

15 Ventajosamente, el colágeno intacto puede ser opcionalmente añadido a la matriz de hidrogel bioactivo para proporcionar una red de unión adicional y proporcionar soporte adicional a la matriz. La concentración final de colágeno intacto presente en la matriz de hidrogel es de aproximadamente 0 a aproximadamente 5 mM, preferiblemente de aproximadamente 0 a aproximadamente 2 mM, más preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 mM.

20 Además, la matriz de hidrogel bioactivo puede incluir opcionalmente uno o más quelantes de cationes divalentes, los cuales aumentan la rigidez de la matriz mediante la formación de complejos de coordinación con cualesquiera de los iones metálicos divalentes presentes. La formación de tales complejos conduce a una mayor rigidez de la matriz mediante la eliminación de la inhibición de los enlaces de hidrógeno entre $-\text{NH}_2$ y $-\text{COOH}$ causada por la presencia de los iones metálicos divalentes. Un ejemplo preferido de un quelante de cationes divalentes que es útil en la presente invención es el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o una sal del mismo. El intervalo de concentración para el quelante de cationes divalentes, tal como EDTA, es generalmente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mM, preferiblemente de 1 a aproximadamente 8 mM, más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 mM. En una realización, el EDTA está presente a una concentración de aproximadamente 4 mM.

25 El EDTA es también un ejemplo de otro grupo de compuestos útiles como aditivos, inhibidores de superóxido, para la matriz de hidrogel bioactivo. El superóxido es una especie de oxígeno reactiva altamente tóxica, cuya formación es catalizada por metales de transición divalentes, tales como hierro, manganeso, cobalto y algunas veces calcio. Las especies de oxígeno altamente reactivas, tales como el superóxido (O_2^-) se pueden convertir además en el radical hidroxilo (OH^\cdot) altamente tóxico en presencia de hierro. Mediante la quelación de estos catalizadores metálicos, el EDTA actúa como un antioxidante. En consecuencia, la matriz de hidrogel bioactivo puede incluir uno o más inhibidores de superóxido.

30 Opcionalmente, se pueden añadir a la matriz de hidrogel bioactivo nutrientes minerales traza y sus sales, tales como sulfato de zinc. El zinc tiene efectos beneficiosos de curación de heridas que son particularmente útiles en la presente invención. Cuando está presente en la matriz de hidrogel, el intervalo de concentración para el zinc es generalmente de aproximadamente 0,005 mM a aproximadamente 3 mM, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2 mM, más preferiblemente de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 1 mM. En una realización particular, la concentración final de zinc es de aproximadamente 0,03 mM.

35 La matriz de hidrogel bioactivo está basada preferiblemente en un tampón fisiológicamente compatible, siendo una forma de realización el Medio 199, una solución de nutrientes común utilizada para los cultivos *in vitro* de diversos tipos de células de mamífero (disponible comercialmente de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). El tampón puede complementarse adicionalmente con aditivos y cantidades adicionales de algunos componentes del medio, tales como cantidades suplementarias de aminoácidos polares como se describió anteriormente.

40 La matriz de hidrogel bioactivo también se puede formular en otras soluciones tamponadas, incluyendo soluciones tamponadas consideradas como simplificadas en relación con Medio 199. Por ejemplo, se puede preparar un tampón fosfato formulado para producir presiones osmóticas fisiológicas después de la composición de la matriz de hidrogel utilizando KH_2PO_4 1,80 mM y Na_2HPO_4 63 mM.

45 La matriz de hidrogel bioactivo de la presente invención es particularmente útil para la reparación y la regeneración del tejido conjuntivo debido a la estructura abierta de la matriz de hidrogel y a la capacidad inherente de la matriz de hidrogel para interactuar con el material fisiológico. La Figura 3 ilustra el efecto de los aminoácidos polares y/o la L-cisteína añadida para estabilizar las unidades de monómero/carbohidrato **25** mediante la unión de los sitios polares de monómero expuestos a, por ejemplo, los grupos amina de la arginina o los grupos ácido carboxílico del ácido glutámico. Además, los enlaces disulfuro pueden formarse entre moléculas de L-cisteína (formando de esta manera

cistina), que a su vez forman enlaces de hidrógeno con las cadenas alfa monoméricos **15**. La estabilidad impartida por los aminoácidos polares, análogos de aminoácidos polares y derivados, y el colágeno intacto es particularmente ventajosa para mantener la estructura abierta de la gelatina y mantener los sitios activos disponibles para el beneficio terapéutico.

5 Los enlaces de hidrógeno formados entre estos aminoácidos adicionales y las unidades de monómero/carbohidrato **25** se rompen cuando la matriz es licuada por calentamiento y los grupos polares son liberados para conectar las unidades de monómero/dextrano a las superficies del tejido del paciente expuestas. En realizaciones preferidas, también está presente EDTA o una sal del mismo para quelar cationes divalentes y de ese modo evitar que los
10 cationes divalentes sean preferiblemente atraídos por los grupos polares expuestos de las unidades de monómero/carbohidrato **25** con exclusión de los aminoácidos polares.

Normalmente, el desgarro del tejido secundario a un traumatismo estimula la producción y liberación de óxido nítrico, iniciando el reclutamiento de células inmunitarias e inflamatorias que fagocitan o liberan productos químicos para destruir sustancias extrañas. Al proporcionar la inhibición local y temporal de la liberación y producción de óxido
15 nítrico y superóxido, los inhibidores del óxido nítrico, tales como la aminoguanidina y la cisteína y los inhibidores de superóxido, tales como EDTA, permiten que las unidades de cadena alfa derivadas de colágeno/dextrano **25** se unan y se integren en la superficie del tejido expuesta. Las unidades de la cadena alfa/ dextrano **25** sirven entonces como el andamiaje sobre el cual las células del hospedador anteriormente diferenciadas se desdiferencian en la morfología "mesenquimoide". Este proceso de desdiferenciación es seguido por la integración de estas células
20 incompletamente diferenciadas en el tejido del hospedador. Estas células mesenquimoides son capaces de promover áreas de su genoma que conduce a la diferenciación en tipos celulares requeridos para la curación y regeneración de tejidos.

Al proporcionar un andamiaje de tipo proteoglicano similar al encontrado en las primeras etapas del desarrollo fetal y mediante el uso de estabilizadores estructurales que tienen como finalidad secundaria reforzar la respuesta del
25 hospedador al andamiaje tras la exposición a los tejidos del hospedador, la matriz sirve como un dispositivo biocompatible capaz de aumentar la vascularización y la promoción de la cicatrización de heridas y la regeneración del tejido local, incluso en el caso de grandes áreas de pérdida de hueso. Debido a que la matriz promueve la
30 regeneración específica de tejido, como la producida durante la embriogénesis y fetogénesis, donde están presentes tipos similares de andamiajes, ahora se ha descubierto que la matriz de la invención puede ser utilizada con éxito para tratar lesiones óseas que generalmente no responden a los tratamientos convencionales, como la pérdida en segmentos largos de hueso diafisario, cavidades y fracturas simples en los pacientes que tienen una capacidad anormalmente baja para regenerar el tejido óseo. Además, se ha descubierto que la matriz de hidrogel bioactivo de
35 la presente invención puede ser utilizada con éxito para tratar otros tipos de lesiones que se sabe que suelen ser difíciles de tratar o de curación lenta, tales como las lesiones de los tejidos conjuntivos no óseos, tales como tendón, ligamento y cartílago.

En los ensayos in vitro se ha demostrado que la matriz de hidrogel bioactivo de la invención presenta una notable
40 capacidad para unirse a y por lo tanto promover la agregación de células a través de múltiples tipos de células. El tratamiento de osteoblastos cultivados (línea celular de osteosarcoma humano SAOS-2) con la matriz de hidrogel bioactivo dio lugar a aproximadamente un 80 % de agregación celular. En un estudio comparativo, se trataron las células con la matriz de hidrogel bioactivo de la invención y las células (control) fueron tratadas con gelatina solo. Los tipos celulares ensayados fueron fibroblastos, osteoblastos, condrocitos y adipocitos. Las células se tiñeron con
45 azul tripano y se inspeccionaron visualmente. Las células tratadas con la matriz de hidrogel bioactivo se mostraban como grupos grandes (es decir, agregados), mientras que las células de control (aquellas tratadas con gelatina solo) se evidenciaron como células individuales y no agregados. Esto ilustra cómo la matriz de hidrogel bioactivo intacto se une a y agrega células importantes en la cicatrización de heridas, la reparación del hueso y la reparación de tejido conectivo no óseo. Esta unión y posterior interacción no se produce cuando sólo está presente la gelatina. Por otra
50 parte, estudios similares previos con fibroblastos indicaban que la unión y la agregación tampoco se producía después del tratamiento con dextrano solo.

La Figura 4 proporciona la cuantificación de la agregación de las células en el estudio descrito anteriormente. Como se muestra en la Figura 4, después del tratamiento con la matriz de hidrogel bioactivo de la invención, los cuatro
55 tipos de células demostraron aproximadamente el 80 % de la agregación. Comparativamente, las células tratadas con gelatina sola demostraron menos del 30 % de agregación. La unión de la matriz de hidrogel bioactivo a las células como se evidencia por la agregación se cree que es el primer paso clave en la acción de la matriz de hidrogel bioactivo sobre la actividad celular. La agregación es un resultado de la interacción de las células con la estructura copolímero polar abierta de la matriz de hidrogel bioactivo.

60 La matriz de hidrogel bioactivo de la invención también exhibe una acción adicional necesaria para la regeneración ósea. En un estudio, el tratamiento de los osteoblastos cultivados con la matriz de hidrogel bioactivo de la invención tuvo como resultado un incremento de más de 20 veces de ARN mensajero de la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2). La BMP-2 es un miembro de la superfamilia de factores de crecimiento transformante (TGF) beta y un regulador clave de la diferenciación de osteoblastos. Se sabe que la BMP estimula la cicatrización de heridas e
65 incluye diversas proteínas morfogenéticas óseas, además de BMP-2. Esta alteración y aumento de la actividad

génica es indicativa de la capacidad de la matriz para producir la curación de fracturas óseas. Esta actividad de la matriz de hidrogel bioactivo de estimulación de la producción de BMP-2 se ilustra en la Figura 5, en la que se demuestra un aumento agudo y drástico de la expresión génica de BMP-2 después de un tratamiento de 40 minutos con la matriz de hidrogel bioactivo en comparación con un control.

La actividad útil de la matriz de hidrogel bioactivo se demuestra además en las figuras 6 y 7, las cuales ilustran los efectos del tratamiento de condrocitos cultivados (células que conducen a la producción de tendón, ligamento y cartílago) con la matriz de hidrogel bioactivo de la invención en causar un aumento de más de 3 veces en la expresión génica del factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF) y el agregano. El CTGF es una proteína profibrótica inducida por el TGF beta y es un regulador clave de la proliferación y la diferenciación de condrocitos. Es un marcador precoz de la condrogénesis expresado en su máximo nivel in vivo durante el crecimiento de los condrocitos. El agregano es un importante componente de la matriz extracelular del cartílago (ECM) y un marcador del fenotipo de los condrocitos. La Figura 6 ilustra una vez más un aumento agudo y marcado en la expresión génica del CTGF en presencia de la matriz de hidrogel bioactivo. La Figura 7 ilustra un aumento similar en la expresión génica del agregano y también ilustra un efecto más prolongado de dicho aumento.

Además de estar en su forma habitual, la forma hidratada (como se describe generalmente más arriba), la matriz de hidrogel bioactivo de la presente invención también puede estar en una forma deshidratada. Esta es una forma particularmente ventajosa de aumentar la utilidad práctica de la matriz de hidrogel bioactivo, facilitando así el almacenamiento y transporte y preservando la vida útil de la matriz de hidrogel y de las composiciones fabricadas usando la matriz de hidrogel. El método de deshidratación de la matriz de hidrogel bioactivo es la liofilización. Otros métodos de preparación de biopolímeros deshidratados, tales como secado por pulverización o Speed-Vac, son conocidos por los expertos en la materia.

La liofilización comprende generalmente la eliminación de agua u otro disolvente de un producto congelado por sublimación, que es la transición directa de un material (por ejemplo, agua) de un estado sólido a un estado gaseoso sin pasar por la fase líquida. La liofilización permite la preparación de un producto estable que es fácilmente rehidratable, fácil de usar y estético en cuanto apariencia. El proceso de liofilización consta de tres etapas: 1) pre-congelación, 2) secado primario y 3) secado secundario.

Dado que la liofilización implica un cambio de fase de sólido a gaseoso, el material a liofilizar debe ser primero pre-congelado adecuadamente. Tanto el método de pre-congelación como la temperatura final del producto congelado pueden afectar a la capacidad de liofilizar con éxito el material. El enfriamiento rápido forma pequeños cristales de hielo. Aunque los cristales pequeños son útiles en el mantenimiento de la estructura, estos dan como resultado un producto que es más difícil de liofilizar. Un enfriamiento lento da lugar a cristales de hielo más grandes y produce canales menos restrictivos en la matriz durante el proceso de secado. La pre-congelación a temperaturas inferiores a la temperatura eutéctica o a la temperatura de transición vítrea, es necesaria para el secado completo de los hidrogeles. Una congelación inadecuada puede producir pequeñas bolsas de material no congelado que quedan en el producto, el cual puede expandirse y comprometer la estabilidad estructural del producto liofilizado.

Después de la pre-congelación del producto, deben establecerse unas condiciones en las cuales el hielo (es decir, disolvente congelado) puede ser eliminado del producto congelado por sublimación, obteniéndose un producto seco, estructuralmente intacto. Esto requiere un control cuidadoso de los dos parámetros, la temperatura y la presión, que intervienen en el sistema de liofilización. Es importante que la temperatura a la que un producto se liofiliza esté equilibrada entre la temperatura que mantiene la integridad congelada del producto y la temperatura que maximiza la presión de vapor del disolvente.

Después de completada la liofilización primaria y una vez sublimado todo el hielo, en el producto todavía existe humedad. El producto aparece seco, pero el contenido de humedad residual puede ser de hasta el 7-8 %. Es necesario un secado continuo a una temperatura más caliente para reducir el contenido de humedad residual hasta valores óptimos. Este proceso se llama desorción isotérmica, ya que el agua ligada se desorbe del producto. El secado secundario normalmente continúa a una temperatura de producto superior a la ambiente pero compatible con la sensibilidad del producto. El resto de las condiciones, tales como la presión y la temperatura del colector, siguen siendo las mismas. Debido a que el proceso es desorbente, el vacío debe ser lo más bajo posible (sin presión elevada) y la temperatura alcanzada en el colector frío debe ser la más fría posible. El secado secundario se lleva a cabo generalmente durante aproximadamente 1/3 a 1/2 el tiempo requerido para el secado primario.

Un ejemplo de equipos útiles para preparar hidrogeles liofilizados es el sistema FreeZone 12 Liter Freeze Dry System con secador de bandeja con cierre automático (Labconco Kansas City, MO). Con este sistema, los tubos con tapas porosas que contienen hidrogeles se congelan a -30 °C a una velocidad de enfriamiento de 0,05 °C/min utilizando la unidad de plataforma de enfriamiento del liofilizador y se mantienen a -30 °C durante 12 horas. Se aplica un vacío al hidrogel congelado a -30 °C durante 24 horas antes de que la temperatura aumente de forma incremental a -10 °C a una velocidad de 0,25 °C/min. El hidrogel se mantiene a vacío a -10 °C durante al menos 12 horas antes de que la temperatura se incremente adicionalmente a 20 °C a una velocidad de 0,05 °C/minuto.

La matriz de hidrogel bioactivo deshidratado puede comprender la matriz de hidrogel bioactivo en cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria. Además, la matriz de hidrogel bioactivo se puede utilizar en la preparación de cualquiera de las composiciones regenerativas del tejido conjuntivo descritas en la presente memoria antes de ser deshidratada. Por lo tanto, la presente invención también incluye composiciones regenerativas del tejido conjuntivo deshidratadas.

En una realización de la invención, la matriz de hidrogel bioactivo se puede preparar como se describe en la presente memoria y luego deshidratarse para formar una única masa. La masa sólo puede ser modificada para los usos específicos. Por ejemplo, la matriz de hidrogel deshidratado podría ser cortada en rodajas a modo de oblea de dimensiones variables. La matriz de hidrogel deshidratado también podría ser molida en forma de partículas. La matriz de hidrogel deshidratado también podría ser cortada en diferentes formas y dimensiones para usos específicos, tales como tapones preformados para uso en cavidades óseas. Además, ventajosamente, la matriz de hidrogel bioactivo deshidratado se podría conformar en una forma y tamaño normalizado y envasarse para diversos usos. La matriz de hidrogel bioactivo deshidratado pre-ensvasada podría entonces personalizarse en una forma y tamaño deseados en el momento de uso. En una realización adicional, la matriz de hidrogel deshidratado puede ser conformada alrededor de un mandril central para formar tubos porosos útiles para conductos de guía para la regeneración de tejido. Estos pueden ser envueltos alrededor de los sitios específicos que pueden requerir o beneficiarse de la regeneración tisular guiada. Los hidrogeles deshidratados también se pueden rehidratar parcialmente para formar masillas y pastas apropiadas para rellenar huecos óseos causados por cirugía o traumatismo.

La matriz de hidrogel deshidratado, cuando se rehidratada, retiene sus propiedades regenerativas del tejido conjuntivo tal como se describe en la presente memoria y se puede usar de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria tan eficazmente como una matriz de hidrogel bioactivo recién preparada de la invención. La rehidratación de la matriz de hidrogel se puede realizar de acuerdo con diversos métodos. En una realización, la matriz de hidrogel bioactivo deshidratado se rehidrata inmediatamente antes del uso, tal como por contacto con agua o una solución tampón fisiológicamente compatible, tal como Medio 199. La matriz de hidrogel bioactivo deshidratado podría ser colocada en el sitio con necesidad de regeneración del tejido conjuntivo y a continuación ponerse en contacto con los fluidos de rehidratación, tales como agua o una solución tampón fisiológicamente compatible. La matriz de hidrogel deshidratado puede ser colocada en el sitio en necesidad de regeneración del tejido conjuntivo y a continuación rehidratarse a través del contacto con fluidos corporales naturales.

Se entiende, por supuesto, que cualquiera de las realizaciones anteriores descritas en relación con la matriz de hidrogel deshidratado también están destinadas a incluir realizaciones similares o idénticas utilizando las composiciones regenerativas del tejido conjuntivo de la presente invención que comprende la matriz de hidrogel bioactivo.

Aunque la matriz de hidrogel bioactivo de la presente invención es útil en múltiples tipos de reparación de tejidos, es particularmente ventajosa en las zonas donde es especialmente difícil la reparación o regeneración de tejidos. Como se describió previamente, suele ser lo que sucede con la regeneración ósea y la reparación del tejido conjuntivo no óseo. Tejido conjuntivo es un término generalizado para el tejido derivado del mesodermo que puede ser más o menos especializado. Hay muchos tipos de tejido que pueden incluirse en este término, tal como hueso, cartílago, duramadre, tendón y ligamento. El término también se puede utilizar para tejido menos especializado que es rico en componentes tales como colágeno y proteoglicanos y que rodea a otros tejidos y órganos más ordenados.

La matriz de hidrogel bioactivo es especialmente útil en la regeneración de hueso, particularmente en situaciones en las que la reparación del hueso no se produce o donde sería beneficioso para un paciente una curación más rápida de un defecto óseo. En situaciones donde hay pérdida de hueso en un área relativamente grande del hueso, se puede insertar la matriz de hidrogel bioactivo en el área de la pérdida de hueso y dejar que permanezca en su lugar para facilitar la curación de la herida y la regeneración de hueso en la zona de la pérdida. La matriz proporciona múltiples funciones regenerativas como se ha descrito anteriormente. La matriz interactúa con los osteocitos dando lugar a una formación más rápida del tejido óseo. La matriz también promueve la expresión génica de los osteoblastos como se demuestra por el aumento de la producción de BMP-2. La presencia de la matriz en el sitio de la herida también inhibe el crecimiento hacia el interior de tejido no óseo en la herida inhibiendo la formación de nuevo tejido óseo. La presencia de la matriz también promueve la vascularización, que es necesaria para el rápido crecimiento de nuevo tejido óseo al suministrar nutrientes, factores de crecimiento, oxígeno y otros componentes necesarios para la regeneración ósea.

Estrechamente relacionada con la capacidad de la matriz para promover la regeneración del hueso es la función de la matriz en relación con las células madre o progenitoras. Este es un aspecto importante de la capacidad de la matriz para apoyar la regeneración de tejidos por múltiples razones. En primer lugar, las células madre se encuentran en la médula ósea y estas células madre adultas pueden ser inducidas para diferenciarse en tejido óseo o en otros tipos de tejido conjuntivo, incluyendo el cartílago y los tejidos adyacentes importantes, tales como las neuronas y el músculo esquelético. Además, las células progenitoras, que son precursoras dando lugar a células de un tipo particular de célula, también son útiles para inducir el crecimiento de tejido óseo, u otro crecimiento de tejido conjuntivo, en su caso. Por lo tanto, la interacción con estas células en las áreas circundantes a la lesión ósea, por

ejemplo, podrían estimular las células madre o progenitoras en el área lesionada para diferenciarse en células óseas, acelerando aún más la regeneración del hueso. Esto también es significativo en el sentido de que frecuentemente, la reparación de tejido duro, tal como el hueso, está acompañada por la necesidad de reparación de tejido blando también. Un ejemplo es en el campo periodontal donde sería ventajoso la presencia de un material que promueva la curación de las encías así como el hueso subyacente. Un paciente que tiene enfermedad periodontal grave con pérdida ósea significativa puede ser tratado usando la matriz de hidrogel bioactivo de la presente invención. La matriz de hidrogel bioactivo podría ser insertada en el área de la pérdida de hueso y ser sustituido el tejido de las encías en el área. La matriz de hidrogel bioactivo, a través de su interacción con las células madre o progenitoras y los cambios posteriores en la expresión génica, así como las otras actividades descritas anteriormente, no sólo facilitaría la regeneración del hueso, sino también aceleraría la reparación del tejido de la encía que recubre el hueso lesionado. El mismo tipo de acción se esperaría que tuviese lugar en otros tipos de lesión que tengan como resultado daños en el hueso, así como en el tejido circundante.

La presente invención, en un aspecto, es una composición para la regeneración del tejido conjuntivo que comprende administrar una matriz de hidrogel bioactivo que comprende un polipéptido y un hidrato de carbono de cadena larga, tal como se describe en la presente memoria, a un sitio en necesidad de regeneración del tejido conjuntivo. Preferiblemente, el polipéptido es una gelatina y el hidrato de carbono de cadena larga es dextrano.

La matriz de hidrogel bioactivo tal como se utiliza en los métodos descritos en la presente memoria puede incluir uno o más de los componentes adicionales anteriormente indicados en la presente memoria. Además, la matriz de hidrogel bioactivo puede incorporar componentes adicionales que facilitan la regeneración del tejido conjuntivo de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria.

Según otro aspecto, la presente invención proporciona diversas composiciones regenerativas de tejido conjuntivo. Generalmente, las composiciones comprenden una matriz de hidrogel bioactivo como se describe en la presente memoria y al menos un componente adicional útil para llevar a cabo los métodos descritos en la presente memoria. Por consiguiente, cualquiera de las composiciones descritas en la presente memoria pueden ser utilizadas en los diversos métodos descritos en la presente memoria.

En una realización de la invención, la matriz de hidrogel bioactivo comprende además al menos un material osteoinductivo u osteoconductor. Por "osteoinductivo" se entiende materiales que llevan a una mitogénesis de células mesenquimales perivasculares indiferenciadas que conducen a la formación de células osteoprogenitoras (es decir, las células con la capacidad de formar hueso nuevo). Por "osteoconductor" se entiende materiales que facilitan la incursión de los vasos sanguíneos y la formación de hueso nuevo en una estructura de enrejado pasivo definida. Se sabe que diversos compuestos, minerales, proteínas y similares presentan actividad osteoinductiva u osteoconductor. Por consiguiente, cualquiera de tales materiales sería útil según la presente invención.

En particular, cualquiera de los siguientes podrían ser utilizados por su capacidad osteoinductiva u osteoconductor según la presente invención: la matriz ósea desmineralizada (DBM), proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factores de crecimiento transformante (TGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factores de permeabilidad vascular (VPF), moléculas de adhesión celular (CAM), aluminato de calcio, hidroxiapatita, hidroxiapatita coralina, alúmina, óxido de circonio, silicatos de aluminio, fosfato de calcio, fosfato tricálcico, sulfato de calcio, fumarato de polipropileno, vidrio bioactivo, titanio poroso, aleación de níquel-titanio poroso, tantalito poroso, perlas de cobalto-cromo sinterizadas, cerámica, colágeno, hueso autólogo, hueso alogénico, hueso xenogénico, coralina y derivados o combinaciones de los mismos, u otros materiales compuestos biológicamente producidos que contienen calcio o elementos estructurales de hidroxiapatita.

Por "alúmina" se entiende la definición comúnmente aceptada de materiales compuestos de óxido de aluminio natural o sintético, que puede ejemplificarse en diversas formas, tales como corindón. Los vidrios bioactivos contienen por lo general dióxido de silicio (SiO_2) como un formador de red y se caracterizan por su capacidad para adherirse firmemente al tejido vivo. Ejemplos de vidrios bioactivos disponibles comercialmente y sus fabricantes incluyen Bioglass® (American Biomaterials Corp., EE.UU., 45 % de sílice, 24 % de óxido de calcio (CaO), 24,5 % de óxido disódico (Na_2O) y 6 % de pirofosfato (P_2O_5)), Consil® (Xeipon Ltd., Reino Unido), NovaBone® (American Biomaterials Corp.), Biogran® (Orthovita, EE.UU.), PerioGlass® (Block Drug Co., EE.UU.) y Ceravital® (E.Pfeil & H. Bromer, Alemania). Corglaes® (Giltech Ltd., Ayr, Reino Unido) representa otra familia de vidrios bioactivos que contienen pirofosfato en lugar de dióxido de silicio como formador de red. Estos vidrios contienen 42-49 % en moles de P_2O_5 , el resto como 10-40 % en moles como CaO y Na_2O .

Cuando está presente en la matriz de hidrogel bioactivo de la presente invención, el material osteoinductivo u osteoconductor está presente preferiblemente a una concentración en volumen de aproximadamente 0,01 por ciento a aproximadamente 90 por ciento basado en el volumen total de la composición regenerativa de tejido conjuntivo. Dicha concentración depende además de la capacidad para formar composiciones que tienen propiedades de masilla o de tipo pasta adecuadas. Preferiblemente, el material osteoinductivo u osteoconductor está presente en una concentración en volumen de aproximadamente 50 por ciento a aproximadamente 80 por

ciento, basado en el volumen total de la composición regenerativa de tejido conjuntivo. En una realización particular, una composición de acuerdo con la invención comprende una mezcla volumen/volumen de 75 % de material osteoinductivo u osteoconductor, tal como sulfato de calcio y la matriz de hidrogel bioactivo (por ejemplo, 12 ml de sulfato de calcio por 4 ml de matriz de hidrogel).

5 Como una composición regenerativa de tejido conjuntivo, la matriz de hidrogel bioactivo y los materiales osteoinductivo u osteoconductor se pueden combinar de diversas maneras. Preferiblemente, los materiales osteoinductivo u osteoconductor y la matriz de hidrogel están en mezcla, lo cual puede estar de acuerdo con cualquier medio generalmente conocido por un experto en la materia. Por ejemplo, la matriz de hidrogel bioactivo
10 podría ser preparada y el material osteoinductivo o osteoconductor (por ejemplo, fosfato de calcio en polvo) podría ser vertido y mezclarse en la matriz de hidrogel mediante mezcla mecánica. La mezcla podría ser fluida o podría ser espesada sustancialmente para dar una consistencia de masilla o de tipo pastoso. Según otra forma de realización, la matriz de hidrogel bioactivo podría ser deshidratada y, preferiblemente, en forma de partículas o granulado. La matriz de hidrogel bioactivo deshidratada en partículas puede ser mezclada con un material osteoinductivo u
15 osteoconductor para formar una mezcla sustancialmente uniforme. En particular, el material osteoinductivo u osteoconductor podría estar en forma de una masilla o pasta, y la matriz de hidrogel bioactivo deshidratado en forma de partículas podría ser amasada o mezclada de otro modo en el mismo.

20 En otra realización más de la invención, la matriz de hidrogel bioactivo de la invención puede comprender además al menos un medicamento útil para el tratamiento de pacientes que tienen daño en el tejido conjuntivo o en necesidad de regeneración del tejido conjuntivo. El medicamento puede ser cualquier medicamento útil para facilitar la curación y el proceso regenerativo. Tales medicamentos útiles según la invención incluyen, pero no se limitan a, antivirales, antibacterianos, antiinflamatorios, inmunosupresores, analgésicos, anticoagulantes y agentes que promueven la curación de heridas.

25 De acuerdo con otra realización de la invención, la matriz de hidrogel bioactivo puede comprender además células madre o progenitoras, tales como células ADAS, las cuales se sabe que son capaces de diferenciarse en los linajes adipogénico, osteogénico, condrogénico y miogénico. Por consiguiente, la presencia de células madre o progenitoras puede ser beneficiosa para estimular y aumentar el crecimiento de nuevo tejido conjuntivo,
30 particularmente hueso y cartílago. Además, la presencia de las células madre o progenitoras puede ser beneficiosa para estimular y aumentar el crecimiento del tejido circundante, proporcionando soporte para el tejido conjuntivo dañado. Preferiblemente, las células madre o progenitoras están presentes a una concentración de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 1.000.000 de células por ml de matriz de hidrogel, más preferiblemente de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 750.000 células por ml de matriz de hidrogel, más
35 preferiblemente de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 500.000 células por ml de hidrogel matriz. En una realización particular, la concentración final es de aproximadamente 250.000 células por ml de matriz de hidrogel. En una realización adicional de la invención, la matriz de hidrogel bioactivo incluye células madre y progenitoras. En una realización particularmente preferida, las células progenitoras son células osteoprogenitoras.

40 En una realización particular, la matriz de hidrogel bioactivo podría ser en un material en forma deshidratada en partículas y las partículas podrían estar mezcladas en una solución que contiene células madre o progenitoras, tales como ADAS o células madre mesenquimales.

45 En otra realización de la invención, la matriz de hidrogel bioactivo incluye un marco estructural tridimensional. Como se señaló anteriormente, la matriz de hidrogel bioactivo de la presente invención se convierte en fluida a temperaturas fisiológicas. Como tal, es beneficioso, en ciertas realizaciones, para la matriz de hidrogel bioactivo incluir componentes estructurales. Preferiblemente, la matriz de hidrogel bioactivo está al menos parcialmente contenida dentro del marco estructural tridimensional. Por consiguiente, el marco estructural puede adoptar diversas formas de realización.

50 En una realización particular, el marco estructural tridimensional incluye una estructura de andamio o en forma de jaula que contiene al menos parcialmente la matriz de hidrogel bioactivo. Tal realización es particularmente útil en áreas de pérdida de hueso diafisario en un segmento largo o en cavidades óseas o en la columna vertebral. La estructura en forma de andamio o jaula se extiende por la zona de la pérdida ósea y encierra la matriz de hidrogel
55 bioactivo dentro de la zona de pérdida ósea. Por ejemplo, el marco estructural tridimensional podría ser una malla cilíndrica de metal, tal como una malla de titanio. En consecuencia, el marco estructural tridimensional puede incluir materiales que no son biorreabsorbibles (es decir, persisten en el cuerpo en un estado prácticamente sin cambios o deben extraerse después). Ventajosamente, el marco estructural tridimensional incluye un material biorreabsorbible que persiste en el cuerpo el tiempo suficiente para realizar su función de proporcionar estructura que posteriormente se descompone a través de procesos naturales del cuerpo o se incorpora en el hueso de nueva formación. En una
60 realización particular, el marco estructural tridimensional incluye materiales que contienen calcio o calcificados que se incorporan fácilmente en el hueso recién formado.

65 En otra realización, el marco estructural tridimensional es al menos parcialmente interno a la matriz de hidrogel bioactivo. En tales realizaciones, el marco estructural tridimensional comprende preferiblemente un material capaz de interactuar física o químicamente con la matriz de hidrogel. Preferiblemente, el marco estructural tridimensional

proporciona una gran variedad de formaciones estructurales para proporcionar soporte y estructura a la matriz de hidrogel bioactivo.

Es particularmente ventajoso que el marco estructural tridimensional sea una estructura que proporcione apoyo y al mismo tiempo proporcione un espacio, o red de espacios, para la infiltración celular. Es particularmente beneficioso que el marco estructural tridimensional incluya una estructura porosa, tal como una esponja de colágeno o gelatina. Cualquier esponja de colágeno disponible comercialmente sería útil generalmente en la presente invención. Los ejemplos de esponjas de colágeno comercialmente disponibles incluyen Avitene Ultrafoam™ esponja de colágeno (disponible en Davol, Inc., una subsidiaria de C.R. Bard, Inc., Murray Hill, NJ - disponible en línea en <http://www.davol.com>), DuraGen® esponja de colágeno (disponible en Integra LifeSciences Corp, Plainsboro, NJ) y Gelfoam® una esponja a base de gelatina (disponible en Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, MI). También podrían utilizarse espumas cerámicas tales como las producidas por Hi-Por Ceramics (Sheffield, Reino Unido).

El marco estructural tridimensional puede ser una sola unidad que tiene una estructura tridimensional inherente. Como tal, el marco estructural puede tener la forma deseada para adaptarse con exactitud al sitio en necesidad de regeneración del tejido conjuntivo. Esto es particularmente beneficioso en los casos de pérdida de hueso diafisario en un segmento largo o en cavidades óseas. En tales casos, el marco estructural puede adaptarse y dimensionarse con exactitud al segmento de la pérdida ósea o la cavidad para llenar el espacio. La matriz de hidrogel bioactivo se retiene en el segmento de la pérdida ósea o la cavidad durante un período de tiempo prolongado para facilitar la regeneración ósea al estar al menos parcialmente contenida dentro del marco estructural. Para promover la colocación de la matriz de hidrogel bioactivo, el marco estructural, con la matriz de hidrogel contenida en el mismo, opcionalmente, puede ser suturado en su lugar.

El marco estructural tridimensional puede comprender diversos materiales útiles para proporcionar estructura y soporte y tener una estructura tridimensional inherente. El marco estructural tridimensional puede ser una estructura con una forma sustancialmente igual a la que se encuentra en la naturaleza, tales como coralina o una esponja natural. Además, el marco estructural tridimensional puede ser una estructura fabricada a partir de materiales que no presentan naturalmente una estructura tridimensional pero que siguen siendo formados en una estructura de este tipo, tales como, por ejemplo, fosfato de calcio sinterizado. Del mismo modo, el marco estructural tridimensional puede comprender uno o más materiales poliméricos producidos mediante procesamiento (tales como fundición, moldeo, o sinterización) en una estructura tridimensional, en particular que tiene una serie o una red de poros o cavidades a lo largo de toda la estructura para permitir la infiltración celular. Ejemplos de diversos materiales útiles como, o en la preparación de, un marco estructural tridimensional incluyen, pero no se limitan a, metales, sales de calcio, coralina, vidrio bioactivo, esponjas, cerámica, colágeno, queratina, fibrinógeno, alginato, quitosano, ácido hialurónico y otros polímeros de origen biológico. El marco estructural tridimensional también puede comprender polímeros degradables y no degradables, tales como los utilizados comúnmente en aplicaciones de ingeniería de tejidos. Ejemplos de polímeros no degradables incluyen polietileno, poli(fluoruro de vinilideno), poli(tetrafluoroetileno), poli(alcohol vinílico), poli(hidroxialcanoato), poli(tereftalato de etileno), poli(tereftalato de butileno), poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de hidroxietilo), poli(N-isopropilacrilamida), poli(dimetil siloxano), polidioxanona y polipirrol. Ejemplos de polímeros degradables incluyen poli(ácido glicólico), poli(ácidos lácticos), poli(óxidos de etileno), poli(lactida-co-glicólidos), poli(s-caprolactona), polianhídridos, polifosfacenos, poli(ortoésteres) y poliimidas.

En una realización particularmente preferida, el marco estructural tridimensional comprende una matriz de hidrogel reticulado. Particularmente preferida es una matriz de hidrogel bioactivo reticulado que comprende un polipéptido, tal como gelatina y un hidrato de carbono de cadena larga, tal como dextrano. La solicitud de patente publicada de los EE.UU. N° 2003/0232746 describe una matriz de hidrogel bioactivo reticulado, en la que la matriz de hidrogel de la presente invención está más estabilizada y a la que se le ha impartido una estructura de tipo tridimensional mediante la reticulación de los componentes de la matriz. Tal matriz de hidrogel bioactivo reticulado también se describe en la Publicación PCT N° WO 03/072155. Además, la solicitud de patente publicada de los EE.UU. N° 2003/0232198 y la Publicación PCT N° WO 03/072157, describe una matriz de hidrogel bioactivo estabilizado como un revestimiento de superficie. Tales matrices de hidrogel reticuladas también son útiles en las diversas realizaciones adicionales de la presente invención como se describe en la presente memoria.

Un ejemplo de una matriz de hidrogel bioactivo reticulado que comprende dextrano y gelatina se proporciona en la Figura 8, en donde el dextrano **20** está covalentemente reticulado con la gelatina **15** por enlaces **70**, formando así una red reticulada **50**. Los enlaces **70** son el resultado de la reacción de grupos funcionales en la gelatina **15** con grupos funcionales en el dextrano **20**, o el resultado de la reacción de una molécula reticulante bifuncional tanto con el dextrano **20** como con la gelatina **15**. Como se explica en mayor detalle a continuación, un método de reticulación de la gelatina y del dextrano es modificar las moléculas de dextrano **20**, tal como por oxidación, con el fin de formar grupos funcionales adecuados para la unión covalente a la gelatina **15**. Esta red bioactiva reticulada estabilizada **50** produce geles y pastas terapéuticamente útiles que son insolubles en fluidos fisiológicos a temperaturas fisiológicas.

Las matrices de hidrogel reticulado como útiles de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por diversos métodos. En una realización particular, uno de los polipéptidos e hidratos de carbono de cadena larga se modifica para formar grupos reactivos adecuados para la reticulación. Por ejemplo, el dextrano u otro componente

hidrato de carbono de cadena larga se pueden modificar, como por oxidación, con el fin de reticular con el componente polipéptido. Una reacción conocida de oxidación de polisacáridos oxidante es la oxidación con peryodato. El proceso de reacción básica utilizando la química del peryodato es bien conocido y apreciado por los expertos en la materia. La oxidación del peryodato se describe en general en Affinity Chromatography: A Practical Approach, Dean y otros, IRL Press, 1985 ISBN0-904147-71-1. La oxidación del dextrano mediante el uso de la química basada en peryodato se describe en la patente US-6.011.008.

En la oxidación con peryodato, los polisacáridos se pueden activar mediante la oxidación de grupos diol vecinos. Con los hidratos de carbono de cadena larga, tales como dextrano, esto se logra generalmente mediante el tratamiento con una solución acuosa de una sal de ácido peryódico, tal como peryodato de sodio (NaIO_4), que oxida los dioles del azúcar para generar grupos aldehído reactivos (por ejemplo, residuos dialdehído). Este método es una alternativa rápida, cómoda con respecto a otros procedimientos de oxidación conocidos, tales como los que usan bromuro de cianógeno. El dextrano activado por oxidación con peryodato se puede almacenar a 4 °C durante varios días sin pérdida apreciable de actividad.

Materiales hidratos de carbono de cadena larga, tales como dextrano, activados de esta forma reaccionan fácilmente con materiales que contienen grupos amino, tales como polipéptidos, en particular gelatina, produciendo un material reticulado mediante la formación de enlaces de base de Schiff. Una base de Schiff es un nombre usado comúnmente para referirse a la imina formada por la reacción de una amina primaria con un aldehído o cetona. Los grupos aldehído formados en la superficie celulósica reaccionan con la mayoría de las aminas primarias entre valores de pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 6. Los enlaces de la base de Schiff se forman entre los residuos dialdehído del dextrano y los grupos amino libres de la gelatina. El producto reticulado puede posteriormente estabilizarse (es decir, formación de enlaces amina estables) por reducción con un borohidruro, tal como borohidruro de sodio (NaBH_4) o cianoborohidruro de sodio (NaBH_3CN). Los grupos aldehído residuales se pueden consumir con etanolamina u otra especie que contiene amina para modificar adicionalmente la matriz reticulada. Otros métodos conocidos por los expertos en la materia se pueden utilizar para proporcionar grupos reactivos en uno o ambos del polipéptido e hidratos de carbono de cadena larga.

En la preparación de matrices de hidrogel bioactivo reticulado para su uso en la presente invención, la química del peryodato se usa preferiblemente con dextrano para formar un polímero multifuncional que puede reaccionar con gelatina y otros componentes, tales como aminoácidos polares, presentes durante el proceso de fabricación. La reacción con peryodato lleva a la formación de polialdehído poliglicanos que son reactivos con aminas primarias. Por ejemplo, los polipéptidos e hidratos de carbono de cadena larga pueden formar complejos covalentes de hidrogel que son geles coloidales o covalentemente reticulados. El enlace covalente se produce entre los grupos reactivos del dextrano y los grupos reactivos del componente gelatina. Los sitios reactivos de la gelatina incluyen los grupos amino proporcionados por la arginina, asparagina, glutamina y lisina. Estos grupos amina reaccionan con los grupos aldehído o cetona en el dextrano para formar un enlace covalente. Estos hidrogeles pueden prepararse fácilmente a temperaturas de aproximadamente 34 °C a aproximadamente 90 °C. Además, los hidrogeles se pueden preparar a un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, preferiblemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 8 y más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,6.

Controlando el grado de activación del dextrano y el tiempo de reacción, se pueden producir materiales de andamiaje biomiméticos estabilizados de diferente viscosidad y rigidez. Por "biomiméticos" se entienden composiciones o métodos que imitan o simulan un proceso o producto biológico. Algunos procesos biomiméticos han estado en uso durante varios años, tales como la síntesis artificial de vitaminas y antibióticos. Más recientemente, se han propuesto aplicaciones biomiméticas adicionales, incluyendo anticuerpos nanorobots que buscan y destruyen bacterias causantes de enfermedades, órganos artificiales, brazos artificiales, piernas, manos y pies y varios dispositivos electrónicos. Los materiales de andamiaje biomiméticos de la presente invención producen geles y pastas terapéuticamente útiles que son estables a aproximadamente 37 °C o a la temperatura corporal. Estos geles son capaces de expansionarse y/o contraerse, pero no se disuelven en solución acuosa. Por consiguiente, dichas matrices de hidrogel reticulado biomimético son particularmente útiles como un marco estructural tridimensional como se describe en la presente memoria. La matriz de hidrogel reticulado proporciona la estructura y el soporte necesarios, permanece estable y mantiene su estructura tridimensional a temperaturas fisiológicas y puede proporcionar beneficiosamente muchas de las mismas propiedades regenerativas del tejido conjuntivo de la matriz de hidrogel bioactivo no reticulado de la invención.

Como un método alternativo para formar la red de dextrano/gelatina reticulada, se puede utilizar un agente de reticulación multifuncional como un resto reactivo que une covalentemente las cadenas de gelatina y dextrano. Tales agentes reticulantes bifuncionales pueden incluir glutaraldehído, epóxidos (por ejemplo, bis-oxiranos), dextrano oxidado, hidrazida de p-azidobenzoílo, éster de N[- α -maleimidoacetoxi]succinimida, p-azidofenil glioxal monohidrato, bis-[- β -(4-azidosalicilamido)etil]disulfuro, bis[sulfosuccinimidil]suberato, ditiobis[succinimidil]propionato, disuccinimidil suberato, 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida clorhidrato y otros reactivos de reticulación bifuncionales conocidos por los expertos en la técnica.

En otra realización que utiliza un agente de reticulación, se pueden usar materiales poliacrilados, tales como triacrilato de trimetilolpropano etoxilado (20) como un agente de reticulación fotoactivado no específico.

Componentes de una mezcla de reacción ilustrativa podrían incluir un hidrogel termorreversible mantenido a 39 °C, monómeros de poli(acrilato), tales como triacrilato de trimetilolpropano etoxilado (20), un fotoiniciador, tal como eosina Y, agentes catalíticos, tales como 1-vinil-2-pirrolidinona y trietanolamina. La exposición continua de esta mezcla reactiva a la luz de onda larga (> 498 nm) produciría una red de hidrogel reticulado.

Al igual que sucede con la matriz de hidrogel bioactivo no reticulado de la invención, la matriz de hidrogel reticulado puede comprender además diversos componentes adicionales (además del polipéptido y del hidrato de carbono de cadena larga) para reforzar la matriz reticulada al proporcionar más estabilidad o ventajas funcionales. Tales componentes adicionales pueden incluir cualquier compuesto, especialmente compuestos polares, que, cuando se incorpora en la matriz de hidrogel reticulado, refuerza la matriz de hidrogel proporcionando más estabilidad o ventajas funcionales.

Componentes adicionales preferidos para uso con la matriz de hidrogel reticulado estabilizado incluyen ácidos aminoácidos polares, análogos y derivados de aminoácidos polares, colágeno intacto y quelantes de cationes divalentes. Las concentraciones adecuadas de cada componente adicional preferido particular son las mismas que las indicadas anteriormente en relación con la matriz de hidrogel bioactivo de la presente invención. Se prefieren particularmente los aminoácidos polares, EDTA y sus mezclas. Los componentes adicionales pueden ser añadidos a la composición de la matriz de hidrogel antes o durante la reticulación del polipéptido y del hidrato de carbono de cadena larga.

En una realización de la invención, la matriz de hidrogel bioactivo de la invención está en una forma reticulada, siendo el marco estructural tridimensional, por lo tanto, inherente a la propia matriz de hidrogel. En otra realización de la invención, la matriz de hidrogel bioactivo de la invención se prepara primero, y el marco estructural tridimensional, en forma de una matriz de hidrogel reticulado separada, como se ha descrito antes, se añade a la matriz de hidrogel no reticulado. Tal adición puede incluir una mezcla física de los dos hidrogeles para formar una composición que comprende una matriz de hidrogel bioactivo de la invención y un marco estructural tridimensional, en forma de una matriz de hidrogel reticulado. En una realización particular, las formulaciones de la matriz de hidrogel bioactivo reticulado deshidratado, se pueden utilizar con la matriz de hidrogel no reticulado o para proporcionar soporte estructural general. En esta realización, la matriz de hidrogel no reticulado se puede mezclar con la matriz de hidrogel reticulado deshidratado en forma de discos, barras, cilindros, gránulos u otras formas geométricas adecuadas. Dichas composiciones proporcionan apoyo adicional al tejido circundante, y aumentan el tiempo de residencia localizada de la matriz de hidrogel no reticulado.

También se pueden combinar diversas realizaciones de la invención, en particular en la preparación de las diversas composiciones regenerativas del tejido conjuntivo de la invención. Por ejemplo, en una realización particular, la matriz/composición de hidrogel bioactivo del marco estructural tridimensional podría también incluir materiales osteoinductivos u osteoconductivos, células madre o progenitoras (tales como células ADAS o células madre mesenquimales) o medicamentos como se describe en la presente memoria. Además, cualquiera de estas combinaciones se podría utilizar de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria.

Los métodos descritos en la presente memoria en los que la matriz de hidrogel bioactivo incluye un marco estructural tridimensional pretenden incluir situaciones en las que el marco estructural tridimensional se incluye en la matriz de hidrogel bioactivo antes de la administración de la composición. Además, los métodos abarcan situaciones en las que el marco estructural tridimensional se incluye con la matriz de hidrogel bioactivo después de la administración de la matriz de hidrogel bioactivo.

Las composiciones de la invención como se describe en la presente memoria son útiles en la reparación y regeneración del tejido conjuntivo, especialmente hueso, cartílago, ligamento, y similares. Como tal, las composiciones de la invención son particularmente útiles en varios tratamientos que implican partes del cuerpo humano particularmente susceptibles al daño o degeneración del tejido conjuntivo.

De acuerdo con una realización de la invención, la matriz de hidrogel bioactivo es para su uso en la fijación quirúrgica o reinserción de uno o más tejidos conjuntivos. Debido a la disminución de la vascularización general de los tipos de tejidos conjuntivos, los tiempos de curación relacionados con la reparación de lesiones son normalmente de larga duración. La administración de la matriz de hidrogel bioactivo al sitio lesionado durante la reparación del daño en el tejido conjuntivo puede mejorar la integración de los tejidos dando lugar a una reparación mucho más fuerte y un menor tiempo de curación. Esto es particularmente cierto en el reacomplamiento del tendón o del ligamento al hueso. Se esperarían efectos similares en la reparación de roturas de ligamentos o de tendones.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición para uso en un método para reacompliar tejidos conjuntivos entre sí. El método generalmente comprende recubrir al menos una parte de al menos uno de los tejidos conjuntivos con la matriz de hidrogel bioactivo de acuerdo con cualquiera de las diversas realizaciones de la presente invención, poner en contacto los tejidos conjuntivos y, opcionalmente, la sutura de los tejidos conjuntivos entre sí. Generalmente, la sutura (o el uso de otras ayudas de fijación, tales como grapas, colas y tiras adhesivas) es aconsejable cuando se utiliza la matriz de hidrogel bioactivo para mantener la conexión entre los tejidos conjuntivos durante la curación y reducir la ocurrencia de separación de los tejidos antes de un recrecimiento y reacomplamiento.

suficiente de los tejidos conjuntivos. En una realización particular, al menos una porción de la matriz de hidrogel bioactivo puede estar en forma reticulada.

5 La mejora en la reparación/regeneración proporcionada por la matriz de hidrogel bioactivo sería beneficiosa para un gran número de pacientes. Aunque la cifra de pacientes que sufren grandes áreas de pérdida ósea es relativamente moderada, la matriz también se podría utilizar para tratar lesiones que son muy comunes en ocurrencia, tales como una rotura del ligamento cruzado anterior (ACL), lesiones del manguito de los rotadores, cartílago dañado en rodillas y otras articulaciones y otras lesiones que serían fácilmente obvias para un experto ordinario en la materia.

10 Se esperaría que la matriz de hidrogel bioactivo de la invención fuese además beneficiosa para mejorar el rendimiento de cualquier ancla de tejido biorreabsorbible. Por consiguiente, en una realización adicional de la invención, la matriz de hidrogel bioactivo, según cualquiera de las diversas composiciones descritas en la presente memoria, es para su uso en una terapia de combinación con otros dispositivos de reacomplamiento conocidos. Por ejemplo, un desgarro del tejido conjuntivo, tales como un tendón, se podría volver a recolocar utilizando suturas, grapas, adhesivos, o similares, recubriendo al menos una pieza de tejido conjuntivo desgarrado en la zona del desgarro con una matriz de hidrogel bioactivo de la presente invención para facilitar el re-crecimiento de tejido conjuntivo en el sitio de la lesión y acelerar la reinserción del tejido conectivo en cuestión.

20 De acuerdo con otra realización de la invención, la matriz es para uso en el tratamiento de enfermedades degenerativas, tales como la artrosis de la articulación natural de un paciente. La artrosis se caracteriza por la degeneración del cartílago articular, hipertrofia del hueso en los márgenes y cambios en la membrana sinovial de la articulación afectada. El tratamiento de la articulación afectada con la matriz de hidrogel bioactivo de la invención, especialmente antes de completar la pérdida de cartílago en la articulación, puede estabilizar la progresión de la degeneración e incluso promover la reparación / regeneración del cartílago dentro de la articulación y la regeneración de la estructura ósea marginal. Además, la matriz de hidrogel bioactivo de la invención proporciona un tratamiento efectivo, mínimamente invasivo, pudiéndose inyectar directamente en la articulación afectada la matriz de hidrogel.

30 En esta forma de realización de la invención, la matriz de hidrogel bioactivo puede estar en muchas de las varias composiciones como se describe en la presente memoria. Ventajosamente, la matriz de hidrogel bioactivo comprende además uno o más medicamentos, materiales osteoinductivos u osteoconductivos, o células madre o progenitoras.

35 En otra realización más de la invención, la matriz de hidrogel bioactivo es para uso en la promoción de la curación y la eficacia de las sustituciones de articulaciones artificiales. Según esta realización, la matriz es para su uso en la inserción en el área que rodea la articulación artificial, en particular donde la articulación artificial está en contacto con el tejido natural del paciente. La matriz de hidrogel facilita la integración de la articulación artificial en el tejido circundante promoviendo una curación más rápida del sitio quirúrgico y una mayor duración de la eficacia de la articulación artificial.

40 Preferiblemente, una cantidad terapéutica de la matriz de la invención se administra a un paciente que sufre una lesión del tejido conjuntivo, en particular una lesión de hueso, cartílago, tendón o ligamento. El paciente puede ser cualquier animal, incluyendo mamíferos tales como perros, gatos y seres humanos. El término "cantidad terapéutica" se refiere a la cantidad requerida para promover reparación/regeneración del tejido como se demuestra, por ejemplo, por la formación de nuevo tejido óseo a través de una zona que carece previamente de tejido óseo. La cantidad terapéutica será determinada principalmente por el tamaño y el tipo de lesión que se está tratando. Generalmente, el volumen de matriz de hidrogel bioactivo aplicado es aproximadamente 1 a aproximadamente 60 ml, pero podría ser mayor, especialmente en las grandes lesiones, tales como, por ejemplo, un área de gran pérdida de hueso en un hueso grande, tal como un fémur. Preferiblemente, la cantidad terapéutica es suficiente para proporcionar un andamiaje uniforme para la unión celular y la diferenciación en el área donde se necesita la regeneración de tejidos. La versión no reticulada de la matriz de hidrogel se calienta generalmente a una temperatura de aproximadamente 35 a aproximadamente 40 °C antes de la administración con el fin de licuar la matriz.

55 La matriz de hidrogel bioactivo usada de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria para la regeneración del tejido conjuntivo puede estar compuesta del polipéptido y del hidrato de carbono de cadena larga descritos en el presente documento. La matriz de hidrogel incorpora componentes adicionales, seleccionados del grupo que consiste en aminoácidos polares y quelantes de cationes y combinaciones de los mismos como se describió anteriormente. La siguiente Tabla 1 enumera componentes particularmente preferidos de la matriz de la presente invención junto con las concentraciones adecuadas, así como las concentraciones preferidas de cada componente. Hay que tener en cuenta que las concentraciones que se indican en la Tabla 1 para la gelatina y el dextrano serían también adecuadas para el polipéptido alternativo y los componentes hidratos de carbono de cadena larga. Las matrices de hidrogel bioactivo preparadas con los componentes y concentraciones preferidos proporcionados en la Tabla 1 también serían particularmente adecuados para uso en la preparación de cualquiera de las composiciones regenerativas de tejido conjuntivo tal como se describe en la presente memoria.

65

Tabla 1

| Componente | Intervalo de concentración | Concentración preferida |
|----------------------|----------------------------|-------------------------|
| Ácido L-glutámico | 2 a 60 mM | 20 mM |
| L-lisina | 0,5 a 30 mM | 5,0 mM |
| Arginina | 1 a 40 mM | 15 mM |
| Gelatina | 0,01 a 40 mM | 0,75 mM |
| L-cisteína | 5 a 5000 mM | 700 mM |
| L-alanil-L-glutamina | 0,001 a 1 mM | 0,01 mM |
| EDTA | 0,01 a 10 mM | 4 mM |
| Dextrano | 0,01 a 10 mM | 0,1 mM |
| Zinc | 0,005 a 3 mM | 0,03 mM |

Parte experimental

- 5 La presente invención se ilustra más completamente mediante los siguientes ejemplos, que se exponen para ilustrar la presente invención y no deben interpretarse como limitantes de la misma.

Ejemplo 1

10 Preparación de la matriz

En una realización, la matriz de hidrogel bioactivo se combinó para producir una formulación final tal como se ha descrito anteriormente en la Tabla 1. Se añadió Medio 199 modificado (2,282 l) a un vaso de precipitados agitado. Se añadieron al vaso de precipitados L-cisteína, ácido L-glutámico, L-lisina, L-alanil-L-glutamina y EDTA. Mientras se agitaba, la solución se calentó a 50 °C. A continuación, se añadió dextrano, seguido de la adición de gelatina. Se utilizó NaOH (10 %) para ajustar el pH de la solución de la matriz hasta un pH final de $7,50 \pm 0,05$. Por último, se añadió más ácido L-glutámico, L-arginina y L-cisteína seguido por la adición de sulfato de zinc. Las cantidades de cada componente utilizadas fueron las cantidades necesarias para llevar la concentración final de cada componente hasta la concentración preferida proporcionada en la Tabla 1.

20

Ejemplo 2

Efecto de la matriz de hidrogel bioactivo sobre el defecto del tamaño crítico en el hueso

25 El efecto in vivo de la matriz sobre la reparación ósea se examinó utilizando el modelo de defecto de tamaño crítico en el cúbito de conejo. Se ocasionó un defecto en el cúbito de un conejo en el que la longitud del defecto se hizo a propósito para que fuese tres veces el diámetro del hueso, es decir, se ocasionó un defecto de 15 mm en cada cúbito (el diámetro del hueso fue de aproximadamente 4 mm). Está bien documentado en la literatura que los defectos de este tamaño no se curan de forma espontánea (es decir, un defecto de tamaño crítico). Siete conejos tenían defectos de 15 mm creados quirúrgicamente en el cúbito de cada extremidad anterior. Además, se raspó el periostio del radio paralelo al defecto. En cada conejo, se trató el defecto en una extremidad anterior con la matriz de hidrogel bioactivo y el otro se trató con una esponja de colágeno empapada con la matriz de hidrogel bioactivo. El músculo que rodea al defecto óseo se cerró con sutura y la extremidad se envolvió firmemente.

30

35 Se hizo una radiografía de las extremidades anteriores del conejo para documentar el tamaño del defecto, tomándose las radiografías de seguimiento a intervalos de dos semanas hasta 10 semanas de la prueba total. También se obtuvieron imágenes de micro TC y se hicieron exámenes histológicos a las 10 semanas. Las radiografías de los sitios con defectos se calificaron en una escala de 0 a 4. La mineralización dentro del defecto tratado con la matriz de hidrogel bioactivo sola o en combinación con la esponja de colágeno se observó tan solo dos semanas después del procedimiento y a las seis semanas, ya era evidente una clara y drástica mineralización en el área de hueso eliminado. La matriz de hidrogel bioactivo en la esponja de colágeno tendió a aumentar en comparación con la calcificación de la matriz de hidrogel solo, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La formación de hueso nuevo dentro de los defectos fue confirmada tanto por las imágenes de micro TC como por la histopatología realizadas a las 10 semanas.

40

45

Ejemplo 3

Efecto de la matriz de hidrogel bioactivo en el recrecimiento y resistencia del tejido

50 En cuatro ovejas se eliminó una longitud de 4 mm de la parte central del tendón rotuliano desde el punto de unión de la tibia a la rótula de una pata. También se eliminó un pequeño bloque de la rótula con el tendón rotuliano unido. La pata contralateral sirvió como control no operado. Se rellenaron dos defectos con una esponja de colágeno

(DuraGen[®], Integra LifeSciences) infiltrada con la matriz de hidrogel bioactivo de la invención y dos defectos se rellenaron con una esponja de colágeno DuraGeno[®] infiltrada con solución salina. Los implantes fueron suturados en el defecto del tendón rotuliano y el sitio quirúrgico se cerró con sutura. Después de 12 semanas, los tendones de la rótula se eliminaron para observación macroscópica y para el ensayo mecánico de rigidez. Los tendones tratados con la matriz de hidrogel bioactivo aparecieron más gruesos que los tendones control. Además, los tendones tratados con la matriz de hidrogel bioactivo tuvieron un aumento medio de la rigidez respecto a los tendones de control de alrededor el 17,2 % en comparación con una disminución del 4,5 % en la rigidez de los 2 tendones tratados con la esponja de colágeno empapada con solución salina.

10 Ejemplo 4

Expresión de los genes de BMP-2 en presencia de matriz de hidrogel bioactivo

15 Se sembraron células de osteosarcoma humano en matraces T75, se dejó crecer hasta la confluencia y posteriormente se cambiaron a medio libre de suero (SFM) durante tres días. En este momento, los cultivos se trataron durante 40 minutos a 37 °C, con la matriz de hidrogel bioactivo de la invención o con medio libre de suero como control. Los cultivos se enjuagaron y se realimentaron con medio libre de suero y se tomaron muestras durante un periodo de 24 horas después de la extracción de los ácidos nucleicos. Se utilizó ARN mensajero de estas preparaciones para crear ADN complementario usando transcripción inversa y las secuencias específicas de ADN se amplificaron y se cuantificaron usando métodos de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

20 En varios experimentos repetidos, la inducción de ARN mensajero de la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2) se indujo hasta 44 veces, observándose un pico de respuesta visto 2 horas después del tratamiento con la matriz de hidrogel bioactivo con un retorno a los niveles basales al cabo de 9 horas. Los controles retuvieron la expresión basal del mensaje de BMP-2 durante todo el período de muestreo de 24 horas.

30 La expresión de la proteína BMP-2 también se midió en estos cultivos celulares después de aplicar métodos idénticos de cultivo y tratamiento de la matriz de hidrogel, con la excepción de que se usó medio que contenía suero (SCM) para evitar la pérdida de analito por adsorción a las superficies de cultivo. Para estos cultivos de los estudios se tomaron muestras de los cultivos durante un período de 3 días después de 40 o 120 minutos de tratamiento por eliminación del medio y congelando inmediatamente el cultivo para liberar la proteína asociada a las células para su análisis. Las muestras resultantes se analizaron mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) utilizando un kit comercial de detección de BMP-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN). En estudios de replicados, el tratamiento con la matriz de hidrogel bioactivo aumentó los niveles de proteína BMP-2 respecto a los controles en las 24 horas post-tratamiento y proporcionó un aumento de hasta 3 veces respecto a los controles el día 3. Estos datos se presentan gráficamente en la Figura 9. Estos datos demuestran que el rápido aumento de la expresión génica descrito anteriormente (Figura 5) conduce a un aumento sostenido de la producción de proteína BMP-2.

40 Ejemplo 5

Expresión de los genes de BMP-2 en presencia de matriz de hidrogel bioactivo reticulado

45 Las muestras de matriz de hidrogel bioactivo reticulado preparadas con 1 % de dextrano oxidado fueron vaciadas en discos para encajar en placas de 24 pocillos. Los discos fueron esterilizadas en alcohol y se equilibraron con medio de cultivo y se sembraron células de osteosarcoma humano SAOS-2 a razón de aproximadamente 330.000 por disco. Después de dejar tiempo para la unión de las células, los discos se transfirieron a pocillos nuevos y se tomaron muestras en los días 1, 2, 3 y 6 para la extracción de ácidos nucleicos y la medición cuantitativa por PCR de los transcritos de BMP-2. Los controles eran células sembradas que se asentaron después de los discos y que se unieron y crecieron en el fondo de los pocillos originales utilizados para la siembra del disco. Estos estudios mostraron un aumento del ARNm de BMP-2 que alcanzó un máximo de casi 3,5 veces mayor que los niveles iniciales el día 3 y que se mantuvo elevado en el día 6. Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 10.

55 Ejemplo 6

Preparación de composiciones que incluyen matriz de hidrogel bioactivo y materiales ortopédicos

60 Se preparó una masilla que contiene 2,4 g de sulfato de calcio y 1,5 g de matriz ósea desmineralizada (DBM) y se utilizó para incorporar matriz de hidrogel bioactivo deshidratado en partículas. Después de amasar a mano brevemente el material, se incorporó a la masilla aproximadamente 0,5 g de matriz de hidrogel bioactivo deshidratado en partículas (equivalente a aproximadamente 3 ml de matriz de hidrogel completamente hidratado). La masilla se mezcló y se amasó hasta la uniformidad y la masilla conservó la capacidad de rellenar un defecto óseo creado en un hueso sintético.

65 En una segunda composición, se preparó una formulación de sulfato de calcio inyectable usando la matriz de hidrogel bioactivo de la invención en lugar de la base convencional de agua (12 g de polvo de sulfato de calcio y 4 ml de la matriz de hidrogel bioactivo). El material tenía un tiempo de asentamiento prolongado (más de 2 horas para

solidificar) y durante las primeras etapas de asentamiento se consideró adecuado para rellenar un defecto óseo.

En una tercera composición, la matriz de hidrogel bioactivo se mezcló con un fosfato tricálcico granulado de cerámica para formar una masilla moldeable fácil de empaquetar en un defecto óseo.

5 Muchas modificaciones y otras realizaciones de la invención serán evidentes para un experto en la materia a la que pertenece esta invención teniendo el beneficio de las enseñanzas presentadas en las descripciones anteriores y los dibujos asociados. Por lo tanto, se debe entender que la invención no está limitada a las realizaciones específicas descritas y que las modificaciones y otras realizaciones están destinadas a ser incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Aunque en la presente memoria se emplean términos específicos, estos se usan sólo en un sentido genérico y descriptivo y no con fines de limitación.

10

REIVINDICACIONES

1. Una composición regenerativa de tejido conjuntivo que comprende:
 - 5 a) una matriz de hidrogel bioactivo que es fluida a temperaturas fisiológicas y que comprende:
 - i. un polipéptido,
 - ii. un hidrato de carbono de cadena larga,
 - 10 iii. uno o más componentes seleccionados de entre el grupo que consiste en aminoácidos polares, quelantes de cationes divalentes y sus combinaciones, y
 - b) un marco estructural tridimensional que contiene al menos parcialmente la matriz de hidrogel bioactivo fluido.
- 15 2. La composición de la reivindicación 1, en la que el polipéptido es un polipéptido derivado de tejido o sintético.
3. La composición de la reivindicación 2, en la que el polipéptido es un polipéptido derivado de tejido derivado de un tejido seleccionado del grupo que consiste en colágenos, gelatinas, queratina, decorina, agregano y glicoproteínas.
- 20 4. La composición de una cualquiera de la reivindicación 1, en la que el polipéptido tiene una masa molecular de 3.000 a 3.000.000 Da.
5. La composición de una cualquiera de la reivindicación 1, en la que el hidrato de carbono de cadena larga es un polisacárido o un polisacárido sulfatado.
- 25 6. La composición de la reivindicación 5, en la que el polisacárido se selecciona de entre el grupo que consiste en glicosaminoglicanos y glucosaminoglicanos.
7. La composición de la reivindicación 5, en la que el polisacárido se selecciona del grupo que consiste en dextrano, sulfato de dextrano, heparano, heparina, ácido hialurónico, alginato, agarosa, carragenano, amilopectina, amilosa, glicógeno, almidón, celulosa, quitina y quitosano.
- 30 8. La composición de una cualquiera de la reivindicación 1, en la que el hidrato de carbono de cadena larga tiene una masa molecular de 2.000 a 8.000.000 Da.
- 35 9. La composición de la reivindicación 1, en la que el polipéptido es gelatina y el hidrato de carbono de cadena larga es dextrano.
10. La composición de la reivindicación 9, en la que la gelatina está presente a una concentración de 0,01 a 40 mM.
- 40 11. La composición de la reivindicación 9, en la que el dextrano o el sulfato de dextrano están presentes a una concentración de 0,01 a 10 mM.
12. La composición de la reivindicación 1, en la que la matriz de hidrogel bioactivo comprende al menos un aminoácido polar seleccionado del grupo constituido por tirosina, cisteína, serina, treonina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, lisina, histidina y mezclas de los mismos.
- 45 13. La composición de la reivindicación 12, en la que los aminoácidos polares están presentes a una concentración de 3 a 150 mM.
- 50 14. La composición de la reivindicación 12, en la que los aminoácidos polares están presentes a una concentración de 10 a 65 mM.
15. La composición de la reivindicación 12, en la que los aminoácidos polares se seleccionan del grupo que consiste en L-cisteína, ácido L-glutámico, L-lisina, L-arginina y mezclas de los mismos.
- 55 16. La composición de la reivindicación 1, en la que la matriz de hidrogel bioactivo comprende ácido etilendiaminotetraacético o una sal del mismo.
17. La composición de la reivindicación 16, en la que el ácido etilendiaminotetraacético o una sal del mismo están presentes a una concentración de 0,01 a 10 mM.
- 60 18. La composición de la reivindicación 1, en la que el marco estructural tridimensional incluye un material seleccionado del grupo que consiste en coralina, metales, esponja, vidrio bioactivo, cerámica, sales de calcio, colágeno, queratina, fibrinógeno, alginato, quitosano, ácido hialurónico, hueso alogénico, hueso autólogo, polietileno, poli(fluoruro de vinilideno), poli(tetrafluoroetileno), poli(alcohol vinílico), poli(hidroxicanoato), poli(tereftalato de etileno), poli(tereftalato de butileno), poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de hidroxietilo),
- 65

poli(N-isopropilacrilamida), poli(dimetil siloxano), polidioxanona y polipirrol, poli(ácido glicólico), poli(ácidos lácticos), poli(óxidos de etileno), poli(lactida-co-glicólidos), poli(s-caprolactona), polianhídridos, polifosfacenos, poli(orto-ésteres), poliimidaz y combinaciones de los mismos.

- 5 19. La composición de la reivindicación 1, en la que el marco estructural tridimensional incluye una jaula de metal.
20. La composición de la reivindicación 1, en la que el marco estructural tridimensional incluye una esponja de colágeno.
- 10 21. La composición de la reivindicación 1, en la que al menos una porción de la matriz de hidrogel bioactivo está en forma reticulada, estando el polipéptido covalentemente reticulado con un hidrato de carbono de cadena larga.
22. La composición de la reivindicación 1, que comprende además al menos un material osteoinductivo u osteoconductor.
- 15 23. La composición de la reivindicación 22, en la que el material osteoinductivo u osteoconductor se selecciona del grupo que consiste en matriz ósea desmineralizada (DBM), proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), factores de crecimiento transformante (TGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factores de permeabilidad vascular (VPF), moléculas de adhesión celular (CAMs), aluminato de calcio, hidroxiapatita, hidroxiapatita coralina, alúmina, óxido de circonio, silicatos de aluminio, fosfato de calcio, fosfato tricálcico, sulfato de calcio, fumarato de polipropileno, vidrio bioactivo, titanio poroso, aleación de níquel-titanio porosa, tantalio poroso, perlas de cobalto-cromo sinterizadas, cerámica, colágeno, hueso autólogo, hueso alogénico, hueso xenogénico, coralina y derivados o combinaciones de los mismos.
- 20 24. La composición de la reivindicación 22, en la que el al menos un material osteoinductivo u osteoconductor está presente a una concentración del 0,01 por ciento en volumen al 90 por ciento en volumen, basado en el volumen total de la composición.
- 30 25. La composición de la reivindicación 24, en la que el al menos un material osteoinductivo u osteoconductor está presente a una concentración del 50 por ciento en volumen al 80 por ciento en volumen, basado en el volumen total de la composición.
- 35 26. La composición de la reivindicación 1, que comprende además células seleccionadas del grupo que consiste en células madre, células progenitoras y mezclas de las mismas.
27. La composición de la reivindicación 26, en la que las células son células madre adultas derivadas de tejido adiposo (ADAS).
- 40 28. La composición de la reivindicación 26, en la que las células son células madre mesenquimales.
29. La composición de la reivindicación 26, en la que las células están presentes a una concentración de 10.000 a 1.000.000 de células por ml de matriz de hidrogel bioactivo.
- 45 30. Una composición regenerativa de tejido conjuntivo que comprende una matriz de hidrogel bioactivo que comprende un polipéptido, un hidrato de carbono de cadena larga y uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en aminoácidos polares, quelantes de cationes divalentes y sus combinaciones, en la que la matriz de hidrogel bioactivo es deshidratada utilizando un método que mantiene las propiedades regenerativas del tejido conjuntivo de la matriz de hidrogel bioactivo, comprendiendo dicho método una primera etapa en la que la matriz de hidrogel se congela a una temperatura por debajo del punto eutéctico del hidrogel y comprendiendo dicho método una etapa de secado primaria y una etapa de secado secundaria.
- 50 31. La composición de la reivindicación 30, en la que, en la primera etapa, la congelación se lleva a cabo por enfriamiento de la composición a una temperatura de -30 °C.
- 55 32. La composición de la reivindicación 30, en la que la etapa de secado primaria se lleva a cabo a una temperatura mayor que la utilizada en la primera etapa.
- 60 33. La composición de la reivindicación 30, que comprende además al menos un material osteoinductivo u osteoconductor.
- 65 34. La composición de la reivindicación 33, en la que el material osteoinductivo u osteoconductor se selecciona del grupo que consiste en matriz ósea desmineralizada (DBM), proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), factores de crecimiento transformante (TGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF),

- factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factores de permeabilidad vascular (VPF), moléculas de adhesión celular (CAMs), aluminato de calcio, hidroxiapatita, hidroxiapatita coralina, alúmina, óxido de circonio, silicatos de aluminio, fosfato de calcio, fosfato tricálcico, sulfato de calcio, fumarato de polipropileno, vidrio bioactivo, titanio poroso, aleación de níquel-titanio porosa, tantalio poroso, perlas de cobalto-cromo sinterizadas, cerámica, colágeno, hueso autólogo, hueso alogénico, hueso xenogénico, coralina y derivados o combinaciones de los mismos.
- 5
35. La composición de la reivindicación 33, en la que el al menos un material osteoinductivo u osteoconductor está presente a una concentración del 0,01 por ciento en volumen al 90 por ciento en volumen, basado en el volumen total de la composición.
- 10
36. La composición de la reivindicación 35, en la que el al menos un material osteoinductivo u osteoconductor está presente a una concentración del 50 por ciento en volumen al 80 por ciento en volumen, basado en el volumen total de la composición.
- 15
37. La composición de la reivindicación 30, en la que el polipéptido es gelatina y el hidrato de carbono de cadena larga es dextrano.
- 20
38. La composición de la reivindicación 33, en la que la composición está deshidratada.
39. La composición de la reivindicación 30, en la que la matriz de hidrogel bioactivo está deshidratada en forma de partículas.
- 25
40. La composición de la reivindicación 33, en la que el al menos un material osteoinductivo u osteoconductor está en la forma de una masilla o pasta.
41. La composición de la reivindicación 30, en la que al menos una porción de la matriz de hidrogel bioactivo está en forma reticulada, estando el polipéptido covalentemente reticulado con el hidrato de carbono de cadena larga.
- 30
42. La composición de la reivindicación 30, que comprende además células seleccionadas del grupo que consiste en células madre, células progenitoras y mezclas de las mismas.
43. La composición de la reivindicación 42, en la que las células son células madre adultas derivadas de tejido adiposo (ADAS).
- 35
44. La composición de la reivindicación 42, en la que las células son células madre mesenquimales.
45. La composición de la reivindicación 42, en la que las células están presentes a una concentración de 10.000 a 1.000.000 de células por ml de matriz de hidrogel bioactivo.
- 40
46. La composición de la reivindicación 42, en la que la composición está deshidratada.
47. Un método para formar una matriz de hidrogel bioactivo deshidratado que mantiene las propiedades regenerativas del tejido conjuntivo de la matriz de hidrogel bioactivo, comprendiendo dicho método una primera etapa en la que la matriz de hidrogel se congela a una temperatura por debajo del punto eutéctico del hidrogel y que comprende una etapa de secado primaria y una etapa de secado secundaria, en la que la matriz de hidrogel bioactivo comprende un polipéptido, un hidrato de carbono de cadena larga y uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en aminoácidos polares, quelantes de cationes divalentes y combinaciones de los mismos.
- 50

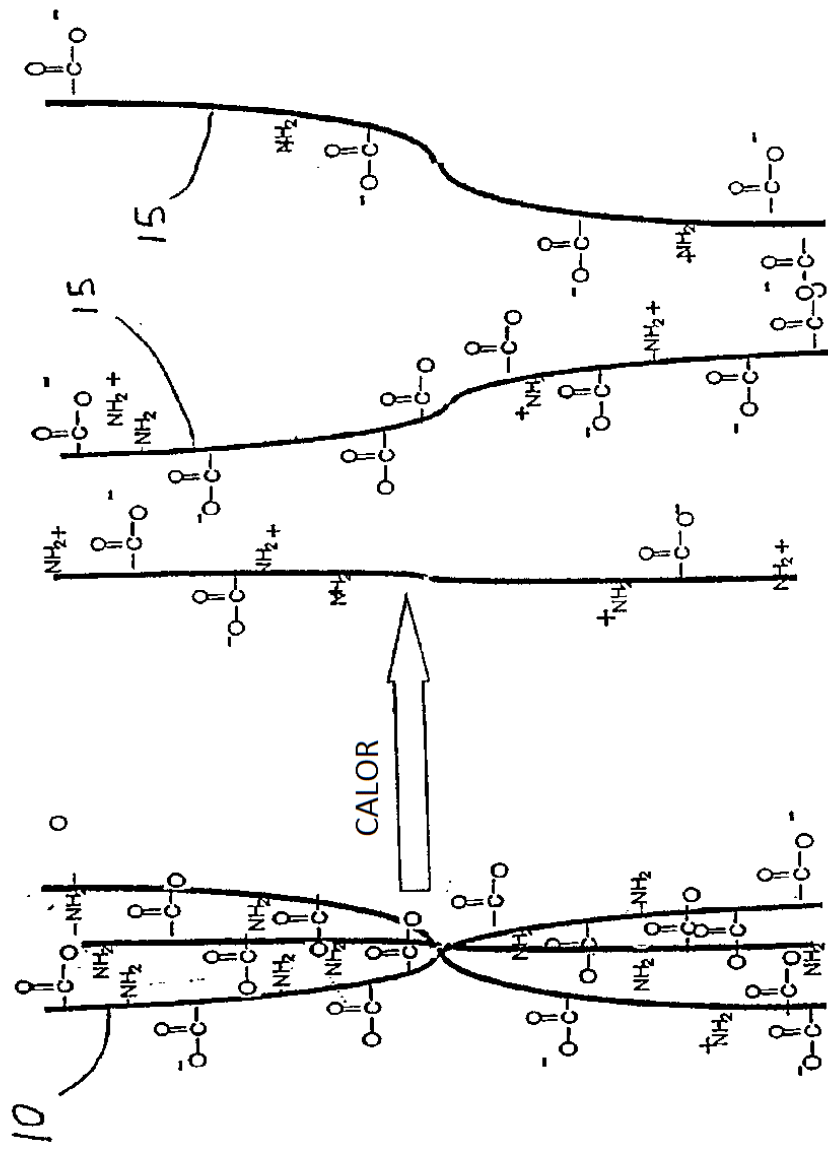
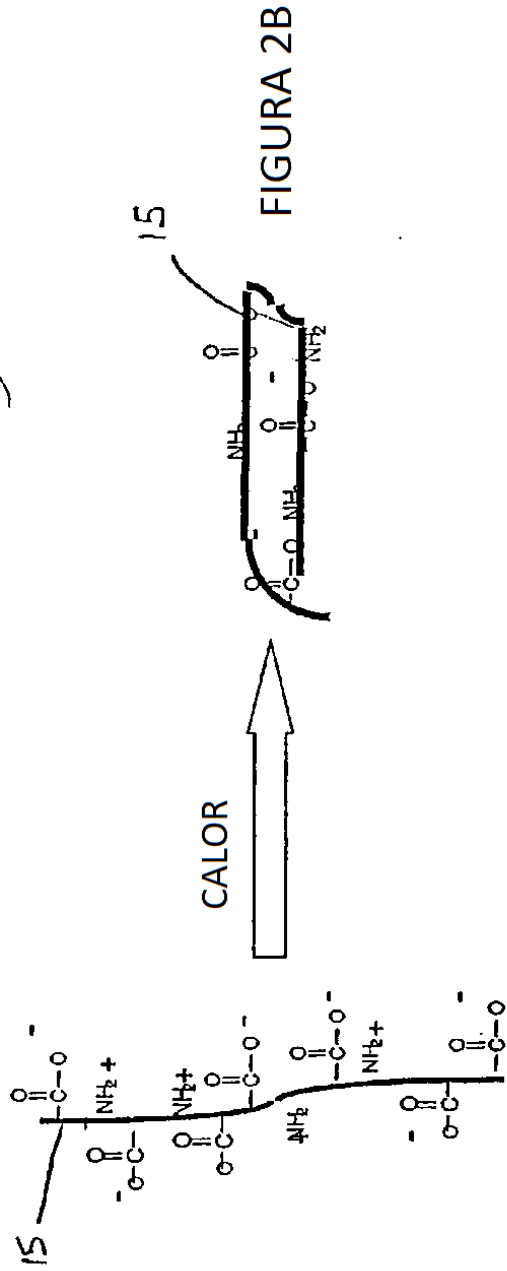
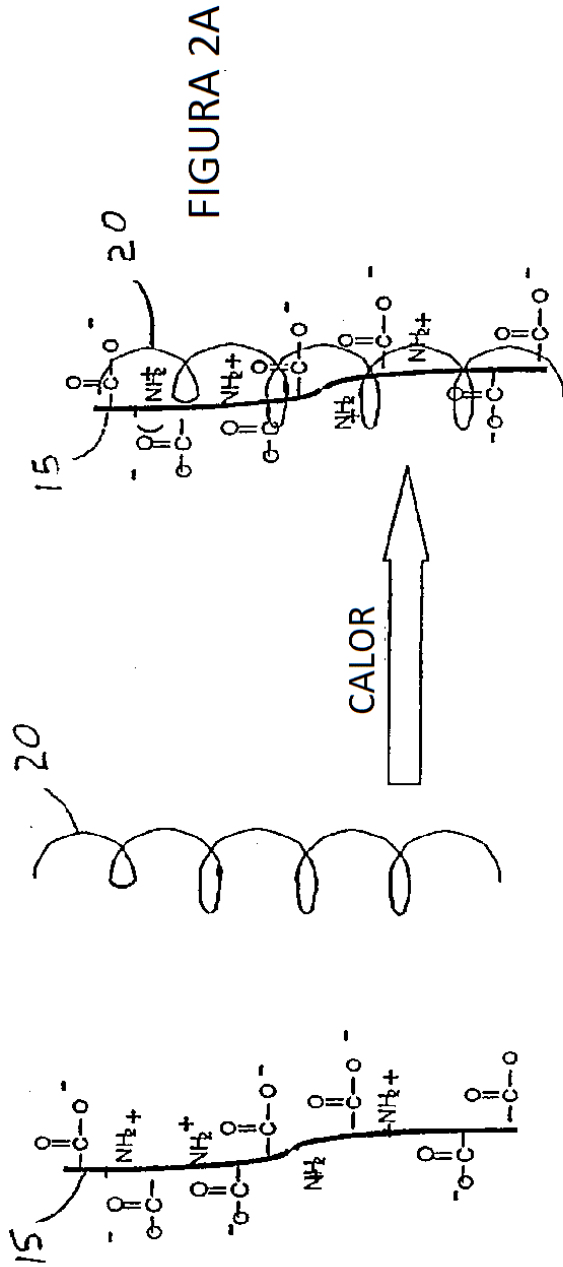


FIGURA 1



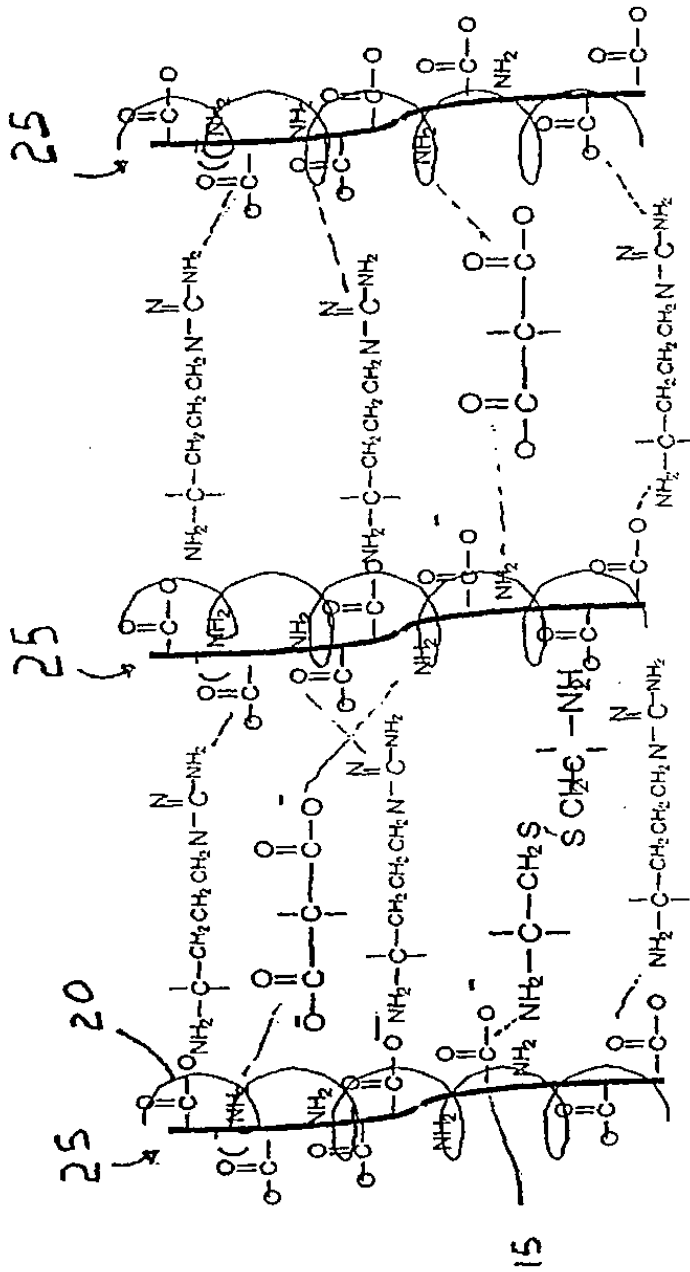


FIGURA 3

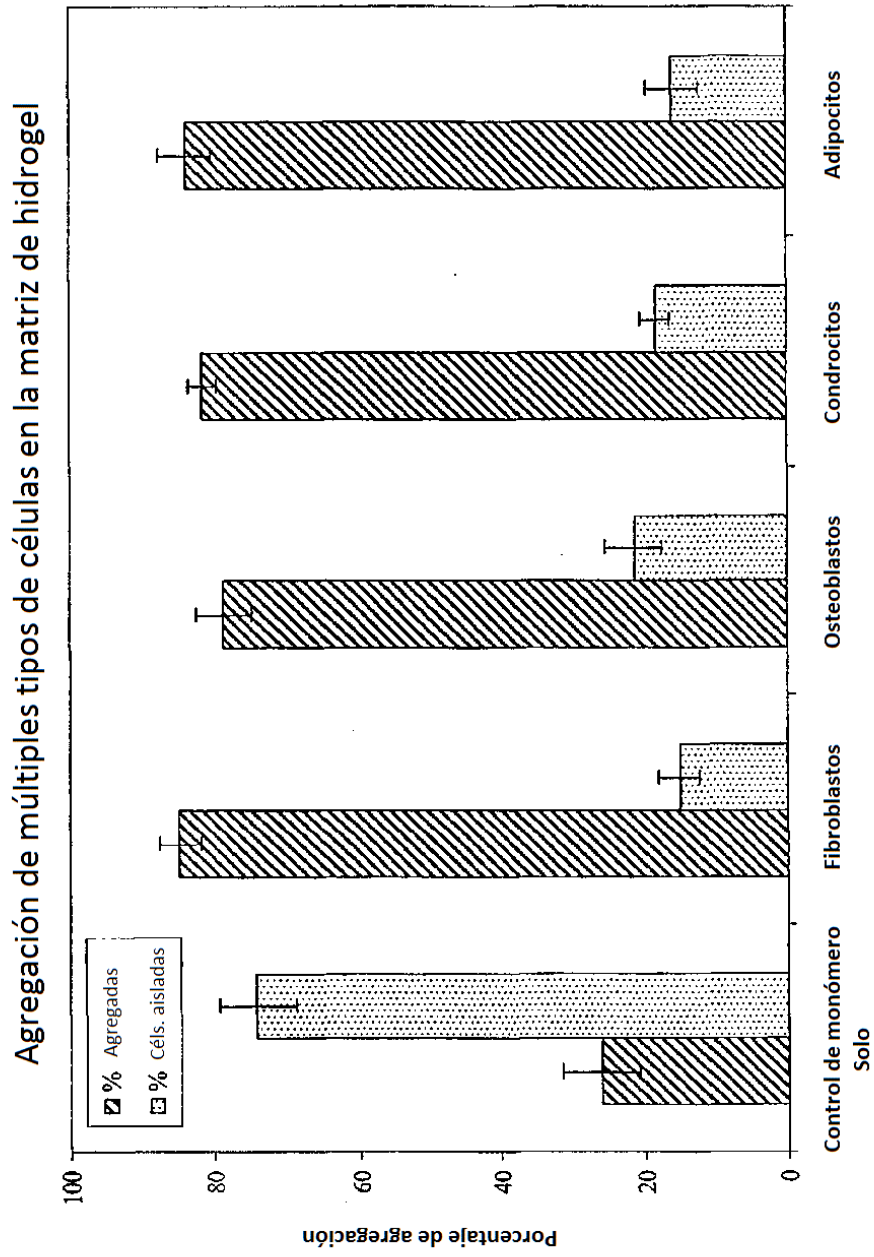


FIGURA 4

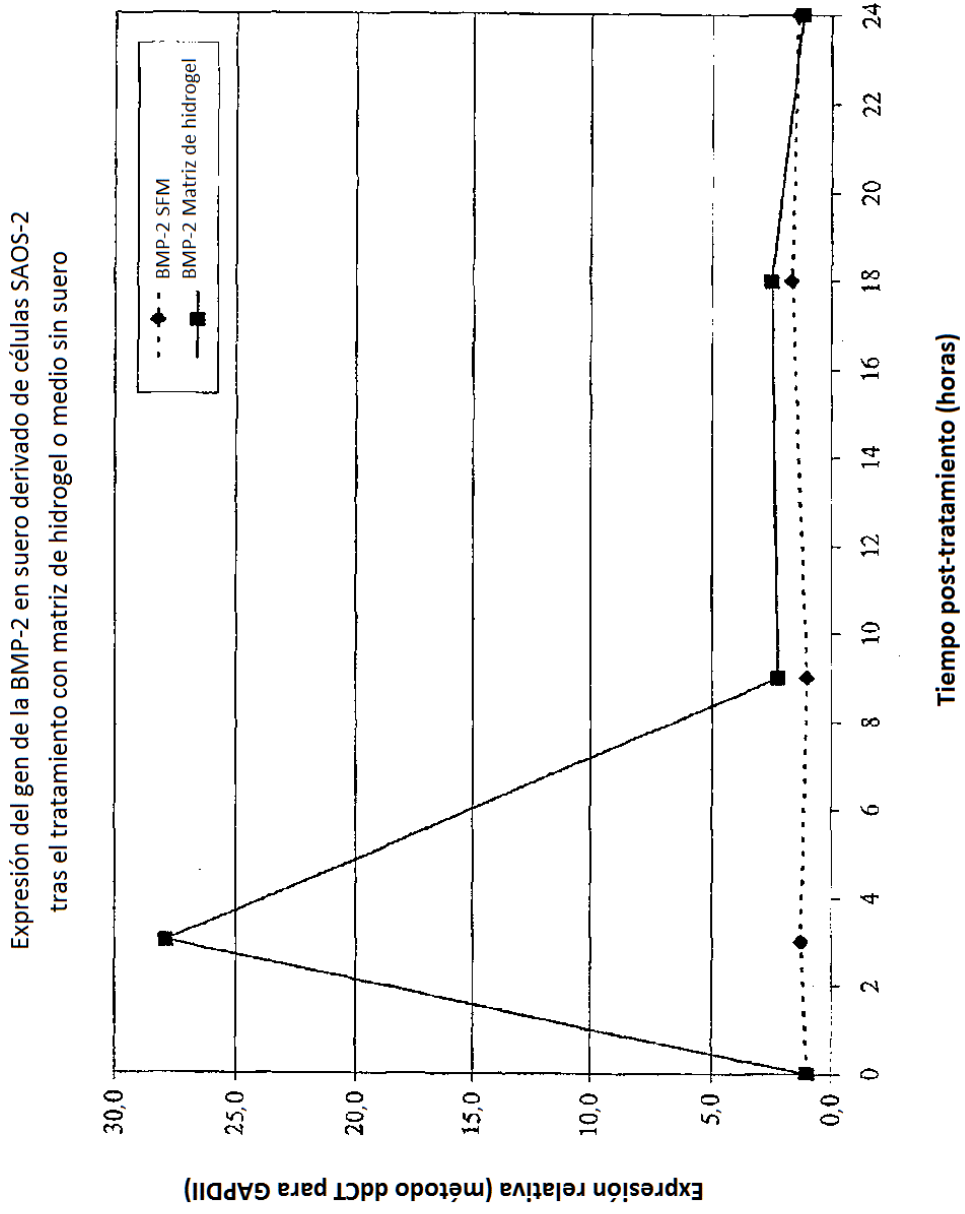


FIGURA 5

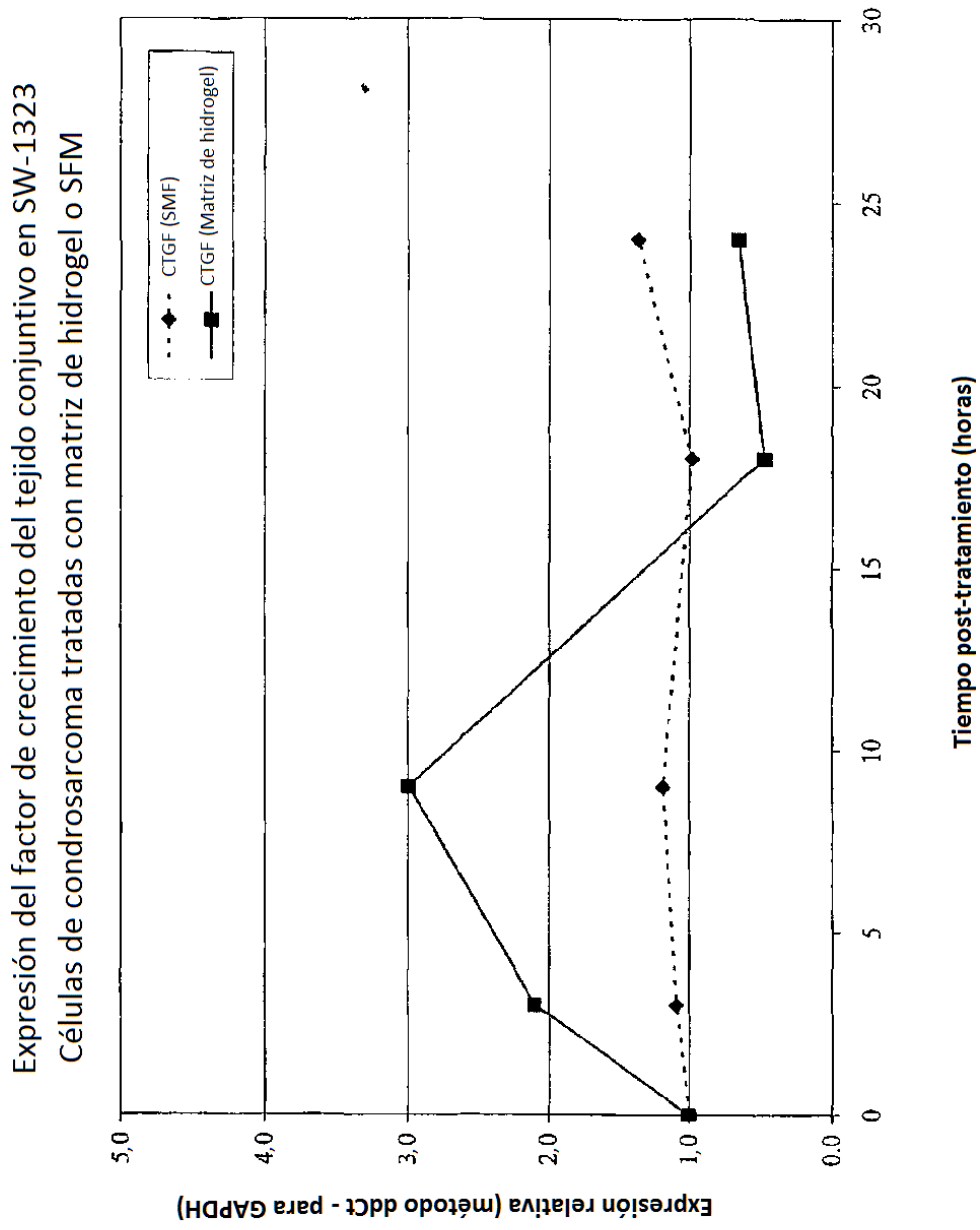


FIGURA 6

Expresión de agrecano en células de condrosarcoma SW-1323 tratadas con matriz de hidrogel o SFM

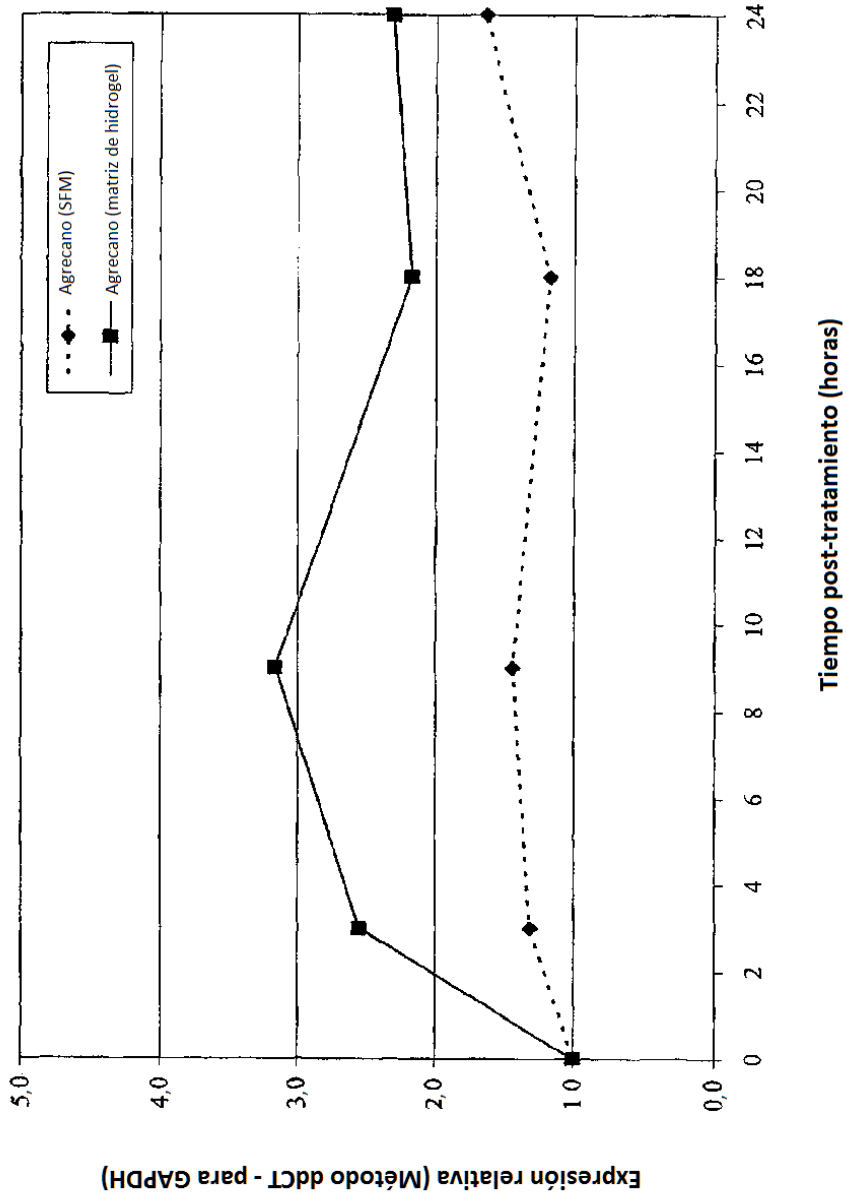


FIGURA 7

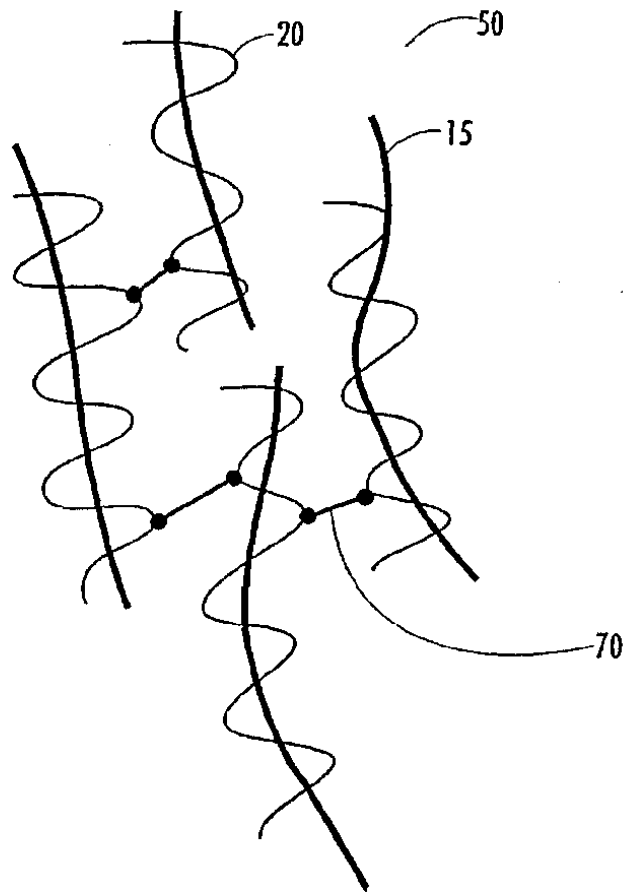


FIGURA 8

Producción de proteína BMP-2 durante 72 horas en células SAOS-2 tratadas con matriz de hidrogel

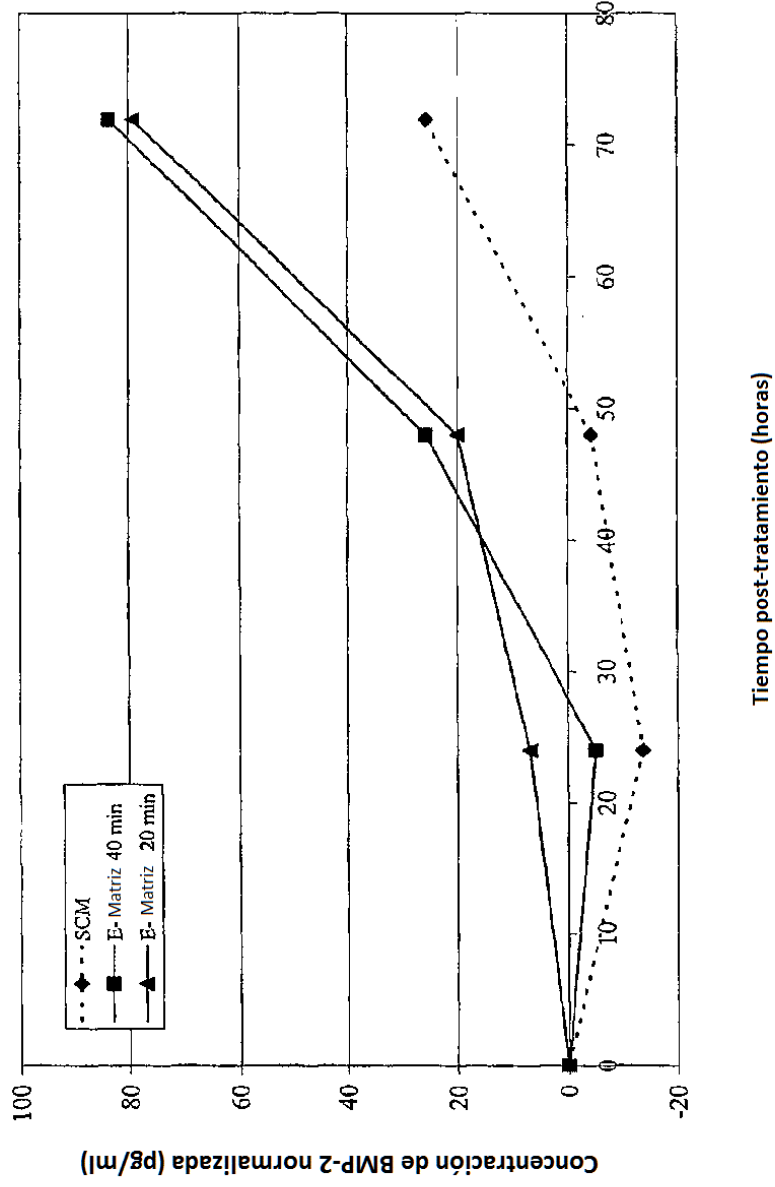
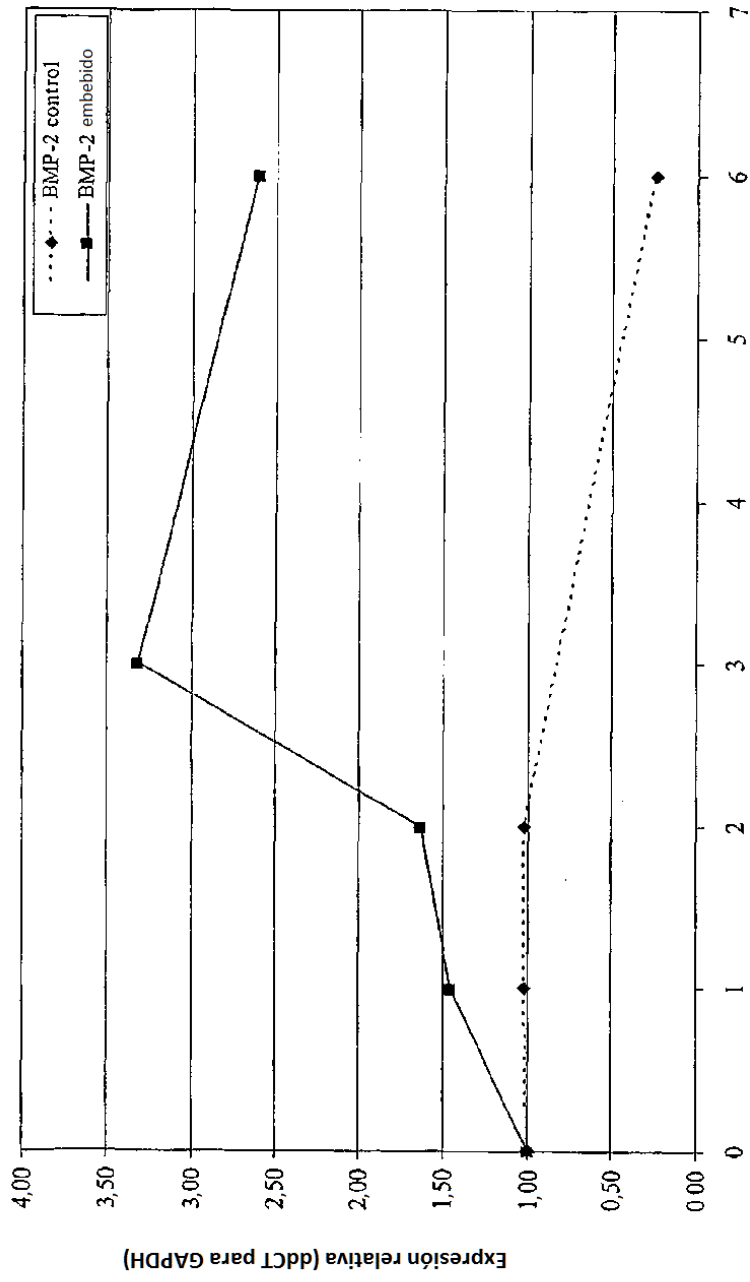


FIGURA 9

Expresión de BMP-2 en células SAOS-2
embebidas en matriz de hidrogel reticulada



Tiempo post-exposición (días)

FIGURA 10