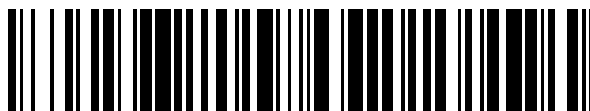


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 929**

51 Int. Cl.:

A61L 27/28 (2006.01)

C07D 487/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2011 E 11756925 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2547373**

54 Título: **Nanotubos y composiciones de los mismos**

30 Prioridad:

16.03.2010 US 314243 P

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

19.10.2016

73 Titular/es:

**BROWN UNIVERSITY (33.3%)
47 George Street, P.O. Box 1949
Providence, RI 02912, US;
NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA
(33.3%) y
THE GOVERNORS OF THE UNIVERSITY OF
ALBERTA (33.3%)**

72 Inventor/es:

**WEBSTER, THOMAS J.;
FENNIRI, HICHAM y
HEMRAZ, USHA DEVI**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 586 929 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

Nanotubos y composiciones de los mismos.

5 **Campo**

La presente invención se refiere al campo de los implantes, y más particularmente a la modificación de la superficie de implantes utilizando nanotubos funcionalizados con polipéptido. La presente invención se refiere además a la modificación de la superficie de un dispositivo de implante utilizando determinados nanotubos funcionalizados con polipéptido para promover selectivamente la adhesión de determinadas células a la superficie del dispositivo de implante. Según un aspecto, la superficie de un implante modificada para incluir nanotubos funcionalizados con polipéptido promueve la adhesión de osteoblastos al implante. La presente invención también se refiere a procedimientos, composiciones y materiales compuestos que incluye nanotubos para reparación y regeneración tisulares.

15 **Antecedentes**

Se conoce la utilización de motivos G^ΛC para reensamblarse dando lugar a nanotubos de roseta helicoidales. Véanse el documento US 6.696.565, Fenniri *et al*, J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 3854-3855 y Moralez *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2005, 127,8307-8309.

L. Zhang *et al.*, Nanotechnology 20 (2009), 175101, 1-12 (XP20152884) dan a conocer nanomaterial compuesto que comprende nanotubos monobase (C^ΛG), HA nanocristalina e hidrogel de pHEMA, que muestra adhesión a osteoblastos potenciada.

Es deseable modificar la superficie de implantes para aumentar la capacidad de las células para adherirse a la superficie de implante y formar tejido sobre la misma. También es deseable proporcionar composiciones útiles en la obtención de implantes que promuevan el crecimiento de tejido sobre y hacia el interior del implante.

Por tanto, un objetivo de la presente invención es crear módulos funcionalizados que pueden ensamblarse para dar subestructuras, que pueden ensamblarse ellas mismas para dar estructuras más complejas en una escala nanométrica, tal como un nanotubo. Otro objetivo de la presente invención es crear módulos funcionalizados que pueden autoensamblarse para dar estructuras de anillo para su utilización en crear nanotubos que pueden utilizarse como recubrimiento para implantes. Todavía otro objetivo es funcionalizar los módulos con uno o más restos que potencian o mejoran la adhesión de células seleccionadas al implante. También es un objetivo de la presente invención modificar la superficie de un implante con nanotubos que presentan restos que aumentan la adhesión de células a la superficie del implante. Todavía un objetivo adicional de la presente invención es adaptar los polipéptidos sobre los nanotubos para promover selectivamente la adhesión de determinadas células que son deseables para la formación de tejido sobre el implante. Todavía otro objetivo adicional de la presente invención es proporcionar composiciones o materiales compuestos que incluyen nanotubos, nanopartículas y materiales de matriz para reparación y regeneración tisulares que pueden colocarse en un sitio dentro del organismo y sobre o hacia el interior de los cuales puede promoverse el crecimiento de tejido. Estos y otros objetivos, características y ventajas de la invención o determinadas formas de realización de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la siguiente divulgación y descripción de formas de realización a modo de ejemplo.

45 **Sumario**

Formas de realización de la presente invención se refieren a procedimientos de alteración de la superficie de un sustrato para mejorar la adhesión, proliferación y/o diferenciación celulares sobre la superficie del sustrato. Los sustratos dentro del alcance de la presente invención incluyen superficies de implante donde se desea adhesión celular y/o crecimiento celular y/o diferenciación celular sobre el propio sustrato o en la ubicación del implante dentro del organismo. Ejemplos de tales implantes son los asociados con aplicaciones ortopédicas. Según este aspecto de la invención, la superficie del implante se modifica para incluir una superficie exterior nanoestructurada. Un implante con una superficie de este tipo según la presente invención proporciona mayor adhesión celular en comparación con un implante sin la superficie exterior nanoestructurada.

Determinadas formas de realización de la presente invención se refieren a recubrimientos sobre la superficie de implantes que promueven selectivamente la adhesión de determinados tipos celulares a la superficie del implante. Según determinados aspectos, los recubrimientos proporcionan un estado o química de superficie deseable que promueve la adhesión, proliferación y/o diferenciación celulares selectivas. Según otros aspectos determinados, el recubrimiento es biomimético. Los recubrimientos según determinadas formas de realización de la presente invención incluyen arquitecturas moleculares de escala nanométrica, tales como nanotubos, que incluyen restos o cadenas laterales que promueven selectivamente la adhesión de determinados tipos celulares a la superficie del implante. Formas de realización adicionales permiten la adhesión selectiva de determinados tipos celulares en comparación con otros tipos celulares determinados. Las arquitecturas moleculares de escala nanométrica pueden utilizarse solas o en combinación con componentes adecuados para crear un recubrimiento sobre la superficie de un

5 sustrato y para hacer proliferar y/o diferenciar células. Según otras formas de realización determinadas, los recubrimientos que incluyen las arquitecturas moleculares de escala nanométrica promueven la adhesión de células seleccionadas y el crecimiento de tejido sobre la superficie del implante. Según todavía otras formas de realización, los recubrimientos que incluyen las arquitecturas moleculares de escala nanométrica son osteogénicos en la medida en que promueven la adhesión de osteoblastos y el crecimiento de los osteoblastos hacia el interior de tejido óseo.

10 Determinadas formas de realización de la presente invención se refieren a una composición o material compuesto para reparación y regeneración tisulares. Los términos composición y material compuesto pueden utilizarse de manera intercambiable en la presente memoria. Las composiciones pueden estar en forma de masillas moldeables, estructuras endurecidas o líquidos inyectables. Las estructuras endurecidas pueden ser rígidas, semirrígidas o flexibles. Las estructuras endurecidas pueden ser porosas o no porosas. Según un aspecto, los líquidos inyectables y las masillas moldeables pueden endurecerse cuando se colocan dentro del entorno del organismo. Por ejemplo, pueden inyectarse materiales compuestos dentro de la presente divulgación como un líquido y solidificarse *in situ* simplemente a través de exposición a temperaturas corporales. Ha de entenderse que puede hacerse referencia a las masillas moldeables, las estructuras endurecidas o los líquidos inyectables como implantes.

15 Según una forma de realización, la composición incluye las arquitecturas moleculares de escala nanométrica, un compuesto que proporciona resistencia mecánica y un material de matriz. La composición puede colocarse en un sitio dentro del organismo donde se desea soporte estructural. La composición puede colocarse dentro del organismo donde se desea crecimiento o regeneración de tejido. La composición puede colocarse dentro del organismo donde se desea una combinación de soporte estructural y crecimiento o regeneración de tejido. La composición puede ser permanente o biodegradable o biorreabsorbible. También puede fabricarse la composición para dar diversas conformaciones de implante para ocupar un sitio donde se ha retirado tejido tal como una astilla o fractura ósea. También puede fabricarse la composición para dar dispositivos útiles en reconstruir sitios de tejido dañado tales como placas, varillas, tornillos, cajas, estructuras de soporte, películas y recubrimientos. El tamaño, la conformación y la fabricación de tales dispositivos incluyendo las composiciones descritas en la presente memoria y su utilización se conocen bien por los expertos en la materia y resultará fácilmente evidente basándose en la presente divulgación.

20 La composición o material compuesto promueve selectivamente la adhesión de determinados tipos celulares a la superficie de la composición o material compuesto. Según determinados aspectos, la composición proporciona un estado o geometría de superficie de escala nanométrica o química de superficie deseable que promueve la adhesión, proliferación y/o diferenciación celulares selectivas. Según otros aspectos determinados, la composición es biomimética. La composición de la presente divulgación incluye arquitecturas moleculares de escala nanométrica, tales como nanotubos, que en algunas formas de realización incluyen restos o cadenas laterales que promueven selectivamente la adhesión de determinados tipos celulares a la superficie del implante. Formas de realización adicionales incluyen nanopartículas además de los nanotubos para proporcionar una geometría de superficie de escala nanométrica destinada a promover la adhesión, proliferación y/o diferenciación celulares. Formas de realización adicionales permiten la adhesión selectiva de determinados tipos celulares en comparación con otros tipos celulares determinados.

25 Formas de realización de la presente invención también se refieren a módulos, incluyendo módulos funcionalizados que se autoensamblan para dar estructuras más complejas en una escala nanométrica, tal como un nanotubo. Los módulos funcionalizados incluyen uno o más restos que promueven la adhesión de células cuando están presentes en un recubrimiento sobre la superficie de un sustrato, tal como la superficie de un implante. Según determinadas formas de realización de la presente invención, la estructura de escala nanométrica puede incluir varios restos diferentes, es decir dos o más restos o una pluralidad de restos, que promueven selectivamente la adhesión de determinados tipos celulares. Según otras formas de realización determinadas, los determinados tipos celulares incluyen aquellos útiles en promover la expansión y el crecimiento de células hacia el interior del tejido. Según una realización particular, los determinados tipos celulares incluyen osteoblastos, fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, miocitos cardiacos, condrocitos, sinoviocitos, células madre mesenquimatosas, células madre neurales, células de islote, hepatocitos, células del músculo liso, células uroteliales, neuronas, células de Schwann y similares.

30 Formas de realización de la presente invención también se refieren a procedimientos de adaptar selectivamente la adhesión celular a la superficie de un implante. Según este aspecto de la presente invención, se selecciona un resto que promoverá la adhesión de un tipo celular particular. La adhesión puede ser *in vitro*, es decir antes de implantar el implante, o *in vivo*, es decir tras implantar el implante. El resto se incluye en un módulo que entonces se ensambla para dar una subestructura. La subestructura se ensambla entonces para dar arquitectura molecular de escala nanométrica, tal como un nanotubo. Según una realización, el ensamblaje es un autoensamblaje en la medida en que los módulos se colocan en el interior de un medio acuoso donde se autoensamblan para dar una subestructura tal como una estructura de anillo, tal como una roseta, y las estructuras de anillo se autoensamblan entonces apilando una sobre la otra para formar una estructura tubular, denominada comúnmente nanotubo. Tales módulos, subestructuras y estructuras moleculares de escala nanométrica y su autoensamblaje se describen en los documentos US 6.696.565, Fenniri *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 3854-3855, Moralez *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2005, 127, 8307-8309, y Fine *et al.*, International Journal of Nanomedicine 2009:4 91-97.

Según determinados aspectos de la presente invención, un ejemplo de arquitectura molecular de escala nanométrica es un nanotubo que presenta dimensiones de escala nanométrica. Los nanotubos oscilan en longitudes entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 999 micrómetros, entre 10 nm y aproximadamente 10.000 nm, de 1 nm a aproximadamente 500 nm, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 300 nm, o de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 100 nm. Los nanotubos oscilan en diámetros entre aproximadamente 1 ángstrom y aproximadamente 100 nm o de aproximadamente 3 nm a aproximadamente 20 nm. Las aberturas a través de los nanotubos oscilan en diámetros entre aproximadamente 1 ángstrom y aproximadamente 100 nm o de aproximadamente 3 nm a aproximadamente 20 nm. Según realizaciones particulares, los nanotubos son monodispersos en diámetro para una funcionalidad dada unida a un nanotubo. Variando las funcionalidades unidas al nanotubo, el diámetro puede variar entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 30 nm, o desde aproximadamente 3 nm hasta aproximadamente 15 nm. La abertura a través del nanotubo puede oscilar en diámetro entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 30 nm, o desde aproximadamente 3 nm hasta aproximadamente 15 nm. Según determinadas formas de realización, la abertura a través del nanotubo presenta un diámetro de aproximadamente 1 nm.

Según un aspecto de la presente invención, si diferentes tipos celulares son útiles en promover el crecimiento de tejido particular, entonces puede seleccionarse un resto e incluirse en una subestructura para cada tipo celular que se desea que se adhiera a la superficie de un implante. En este aspecto de la presente invención, la arquitectura molecular de escala nanométrica puede incluir dos o más restos siendo cada uno selectivo para un tipo celular diferente. La arquitectura molecular de escala nanométrica puede recubrirse entonces sobre la superficie de un implante ya sea en parte o en su totalidad o puede darse forma para dar un implante, ya sea en forma líquida, de masilla o sólida. Entonces puede implantarse el implante en el sitio deseado dentro de un paciente, humano o animal, que necesita tal implante. Las células deseadas se adhieren a la superficie del implante y crece el tejido deseado. En la alternativa, pueden aplicarse las células deseadas y adherirse a la superficie del implante antes de la implantación. Tales formas de realización son útiles para promover el crecimiento de tejido sobre el implante o en el sitio de implantación. Según aspectos de la presente invención, los términos adhesión y adherencia se utilizan de manera intercambiable y se refieren a la capacidad de las células para permanecer sobre la superficie de un sustrato cuando se somete a enjuague con solución salina tal como se conoce en la materia.

Formas de realización de la presente invención se refieren todavía adicionalmente a composiciones que incluyen arquitecturas moleculares de escala nanométrica que presentan restos funcionales unidos a las mismas. Los restos funcionales pueden presentar aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico. Las arquitecturas moleculares de escala nanométrica pueden utilizarse como vehículos para la administración de restos funcionales a un sitio particular para aplicación terapéutica o de diagnóstico. Según determinadas formas de realización, las arquitecturas moleculares de escala nanométrica funcionalizadas se mezclan con un vehículo de administración o excipiente farmacéuticamente aceptable y entonces se administran a la ubicación deseada. Las arquitecturas moleculares de escala nanométrica de la presente invención, tales como nanotubos, pueden imitar las propiedades mecánicas del cartílago cuando se mezclan con cerámicas y pueden autoensamblarse para dar un material que puede imitar las propiedades del hueso. Según un aspecto, las arquitecturas moleculares de escala nanométrica no están funcionalizadas o están funcionalizadas con restos útiles en aplicaciones ortopédicas, de cartílago, vasculares y de curación de heridas, además de aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico.

Según otro aspecto, los módulos tal como se describen en la presente memoria que no están funcionalizados o están funcionalizados para un fin particular se administran a un sitio deseado dentro del organismo, tal como mediante inyección o colocación física tal como una masilla, donde condiciones dentro del organismo tal como la temperatura y el entorno acuoso hacen que los módulos se autoensamblen para dar estructuras nanotubulares, preferentemente solidificar, y promover el crecimiento de tejido en el entorno particular. Según un aspecto, los módulos son un componente de una composición que incluye un compuesto de refuerzo para proporcionar resistencia mecánica y un material de matriz. La composición se coloca dentro del organismo donde condiciones dentro del organismo tales como la temperatura y el entorno acuoso hacen que los módulos se autoensamblen para dar estructuras nanotubulares y la composición para curar o polimerizar o solidificar de otro modo para dar un implante endurecido. En una forma de realización, los módulos ya están autoensamblados para dar estructuras de nanotubo antes de la administración a un sitio dentro del organismo. Por ejemplo, los módulos o estructuras de nanotubo autoensambladas se inyectan al interior de un hueso facturado, cartílago, tejido vascular, tejido cardíaco, tejido de sistema nervioso, etc. donde los nanotubos autoensamblados promueven el crecimiento de tejido útil. Además, los nanotubos autoensamblados pueden aplicarse a la superficie de la piel para servir como dispositivo de curación de heridas.

Según determinados aspectos, se proporcionan procedimientos y composiciones para promover la diferenciación y proliferación de osteoblastos, por ejemplo en el sitio de una lesión o defecto óseos o sitio quirúrgico, incluyendo proporcionar un implante con una composición que incluye nanotubos formados a partir de módulos según la fórmula I y/o la fórmula II descritas en la presente memoria, nanopartículas, tales como nanopartículas de un fosfato de calcio y un material de matriz, y colocar el implante dentro del organismo en un sitio donde se desea la diferenciación y proliferación de osteoblastos. Según este aspecto de la divulgación, la geometría de superficie de escala nanométrica de la composición que resulta de los nanotubos y las nanopartículas dentro de la matriz

promueve la diferenciación y proliferación de osteoblastos y el crecimiento de tejido óseo.

Según determinados aspectos, se proporcionan procedimientos y composiciones para promover la diferenciación y proliferación de osteoblastos a la vez que se inhibe la proliferación de fibroblastos incluyendo proporcionar un implante con una composición que incluye nanotubos formados a partir de módulos según la fórmula I y/o la fórmula II descritas en la presente memoria, nanopartículas, tales como nanopartículas de un fosfato de calcio y un material de matriz, y colocar el implante dentro del organismo en un sitio donde se desea la diferenciación y proliferación de osteoblastos. Según este aspecto de la divulgación, la geometría de superficie de escala nanométrica de la composición que resulta de los nanotubos y las nanopartículas dentro de la matriz promueve la diferenciación y proliferación de osteoblastos e inhibe la proliferación de fibroblastos.

Según determinados aspectos, se proporcionan procedimientos y composiciones para tratar defectos óseos proporcionando un implante con una composición que incluye nanotubos formados a partir de módulos según la fórmula I y/o la fórmula II descritas en la presente memoria, nanopartículas, tales como nanopartículas de un fosfato de calcio y un material de matriz, y colocar el implante dentro del organismo en un sitio de un defecto óseo, tal como una fractura, o donde falta hueso. Según este aspecto de la divulgación, la composición endurecida con geometrías de superficie de escala nanométrica que resulta de los nanotubos y las nanopartículas dentro de la matriz proporciona soporte mecánico suficiente y promueve la diferenciación y proliferación de osteoblastos y la deposición de calcio para tratar el defecto óseo. Según determinados aspectos, la composición endurecida con geometrías de superficie de escala nanométrica que resulta de los nanotubos y las nanopartículas dentro de la matriz proporciona soporte mecánico suficiente y promueve la diferenciación de células madre para dar osteoblastos y promueve adicionalmente la proliferación de los osteoblastos y la deposición de calcio para tratar el defecto óseo. Según un aspecto, la composición puede estar en forma de una masilla conformable o líquido inyectable y puede incluir células madre u osteoblastos. Alternativamente, pueden aplicarse células madre u osteoblastos a un sitio de defecto tisular antes de la aplicación de la composición al sitio de defecto tisular o simultáneamente junto con la composición al sitio de defecto tisular.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A a 1D. Representación del proceso de autoensamblaje de diversos módulos para dar nanotubos de roseta.

Figuras 1E a 1G. RNT de bases dobles. (E) TB-KRSR; (F) TBL; (G) El proceso de autoensamblaje de bases dobles de C \wedge G para dar un nanotubo de roseta.

Figura 2. Un esquema de síntesis de (A) péptido KRSR protegido con resina de Wang que se acopla sobre las bases dobles de C \wedge G (TBKRSR) y (B) bases dobles de C \wedge G con un grupo de unión de 1,4-diaminobutano (TBL).

Figura 3. Imágenes de TEM de los diversos RNT: (A) y (B) RNT de TB-KRSR 0,1 mg/ml y 0,01 mg/ml; (C) y (D) RNT de TBL 0,1 mg/ml (HCl y TFA, respectivamente); (E) RNT de MB-K 0,1 mg/ml; (F) RNT de MB-RGD-K al 5% 0,1 mg/ml y (G) péptido KRSR 0,1 mg/ml sin nanotubos solo. Las flechas muestran los nanotubos.

Figura 4. Imágenes de SEM y AFM de (A) y (B) RNT de TB-KRSR; y (C) y (D) RNT de TBL.

Figura 5. Adhesión de osteoblastos sobre RNT recubiertos sobre titanio. Los datos son valores de media \pm EEM, N=3. *p<0,01 y &p<0,1 en comparación con titanio no recubierto; **p<0,05 en comparación con KRSK 0,01 mg/ml recubierto sobre titanio; ***p<0,1 en comparación con RNT de MB-K 0,01 mg/ml, MB-RGD-K al 1%, TBL (HCl) recubiertos sobre titanio; #p<0,05 en comparación con RNT de MB-K 0,01 mg/ml recubiertos sobre titanio; y §p<0,1 en comparación con RNT de MB-RGD-K al 1%, TBL (en HCl o en TFA) recubiertos sobre titanio.

Figura 6. Imágenes de microscopía fluorescente de adhesión de osteoblastos sobre RNT recubierto sobre titanio a pocos (aumento original 50x, núcleos teñidos con DAPI) y muchos aumentos (400x, filamentos de actina F teñidos con rodamina). 0,01 mg/ml de (A) y (A') RNT de MB-K; (B) y (B') RNT de TBL (HCl); (C) y (C') RNT de TBL (TFA); (D) y (D') RNT de TB-KRSR; (E) y (E') RNT de MB-RGD-K al 1%; (F) y (F') RNT de MB-RGD-K al 5%; y (G) y (G') titanio recubierto con KRSR; y (H) y (H') titanio no recubierto. Las flechas apuntan a los filopodios largos.

Figura 7. Adhesión de fibroblastos sobre RNT recubiertos sobre titanio. Los datos son valores de media \pm EEM, N=3. *p<0,05 en comparación con KRSK 0,01 mg/ml recubierto sobre titanio; #p<0,05 en comparación con RNT de TBL 0,01 mg/ml (HCl) recubiertos sobre titanio; y &p<0,05 en comparación con titanio no recubierto.

Figura 8. Imágenes de microscopía fluorescente de extensión de fibroblastos. (A) RNT de MB-K recubiertos sobre titanio; (B) RNT de TBL (HCl) recubiertos sobre titanio; (C) RNT de MB-RGD-K al 1% recubiertos sobre titanio; (D) RNT de TB-KRSR recubiertos sobre titanio; (E) KRSR recubierto sobre titanio; y (F) titanio no recubierto. Los filamentos de actina F se teñieron mediante rodamina-faloidina.

Figura 9. Adhesión de células endoteliales sobre RNT recubiertos sobre titanio. Los datos son valores de media \pm EEM, N=3. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,1$ en comparación con titanio no recubierto. # $p < 0,05$ en comparación con el resto de los sustratos. & $p < 0,1$ en comparación con RNT de TB-KRSR 0,01 mg/ml recubiertos sobre titanio.

5 Figura 10. Imágenes de microscopía fluorescente de extensión de células endoteliales sobre diversos recubrimientos tras 4 h. (A) RNT de MB-K recubiertos sobre titanio; (B) RNT de TBL (HCl) recubiertos sobre titanio; (C) RNT de MB-RGD-K al 1% recubiertos sobre titanio; (D) RNT de TB-KRSR recubiertos sobre titanio; (E) KRSR recubierto sobre titanio; y (F) titanio no recubierto. Los filamentos de actina F se tiñeron mediante rodamina-faloidina (color verde) y los núcleos de las células se tiñeron mediante DAPI (color azul).

10 Figura 11. Gráfico de curvas de temperatura de materiales compuestos de TBL/HA/pHEMA tras (a) sonicación y (b) microondas.

15 Figura 12. Gráfico de tiempo de solidificación de (a) razones en agua y (b) concentraciones de iniciador de AIBN variables.

Figura 13. Imagen de AFM de nanotubos formados a partir de grupos de unión de bases dobles.

20 Figura 14. Imágenes de SEM de diversos materiales compuestos de nanotubos formados a partir de grupos de unión de bases dobles, hidroxiapatita y poli(metacrilato de hidroxietilo). Barras de escala=200 nm.

Figura 15. Imágenes de SEM de poros de materiales compuestos de nanotubos formados a partir de grupos de unión de bases dobles, hidroxiapatita y poli(metacrilato de hidroxietilo). Barras de escala=100 μ m.

25 Figura 16. Gráfico de datos de prueba de compresión de materiales compuestos de nanotubos formados a partir de grupos de unión de bases dobles, hidroxiapatita y poli(metacrilato de hidroxietilo). Datos = Media \pm EEM.

Figura 17. Gráfico de densidad de adhesión bacteriana sobre materiales compuestos de nanotubos formados a partir de grupos de unión de bases dobles, hidroxiapatita y poli(metacrilato de hidroxietilo). Datos = Mean \pm EEM.

30 Figura 18. Gráfico de degradación de materiales compuestos de nanotubos formados a partir de grupos de unión de bases dobles, hidroxiapatita y poli(metacrilato de hidroxietilo) tras 7 días.

35 Figura 19. Gráfico de degradación de materiales compuestos de nanotubos formados a partir de grupos de unión de bases dobles, hidroxiapatita y poli(metacrilato de hidroxietilo) tras 1 mes. * $p < 0,05$ en comparación con el grupo de HA al 2% distinto de TBL.

40 Figura 20. Gráfico de densidad de osteoblastos aumentada y de fibroblastos disminuida con contenido en HA creciente en materiales compuestos de nanotubos formados a partir de grupos de unión de bases dobles, hidroxiapatita y poli(metacrilato de hidroxietilo). Datos = media \pm EEM; N = 3; * $p < 0,01$ en comparación con el resto con tipo celular respectivo. Tiempo = 4 horas. El eje Y son células/cm².

45 Figura 21. Gráfico de proliferación de osteoblastos aumentada con contenido en hidroxiapatita creciente en materiales compuestos de nanotubos formados a partir de grupos de unión de bases dobles, hidroxiapatita y poli(metacrilato de hidroxietilo). Datos = media \pm EEM; N = 3; * $p < 0,01$ en comparación con el resto con respecto a las otras muestras. Todos los sustratos son significativamente mayores con el tiempo. El eje Y son células/cm².

50 Figura 22. Gráfico de síntesis de colágeno de osteoblastos aumentada por osteoblastos con contenido en hidroxiapatita creciente en materiales compuestos de nanotubos formados a partir de grupos de unión de bases dobles, hidroxiapatita y poli(metacrilato de hidroxietilo). Datos = media \pm EEM; N = 3; * $p < 0,01$ en comparación con el resto con respecto a las otras muestras. Todos los sustratos son significativamente mayores con el tiempo. El eje Y son microgramos de colágeno/microgramos de proteína.

55 Figura 23. Gráfico de síntesis de fosfatasa alcalina de osteoblastos aumentada por osteoblastos con contenido en hidroxiapatita creciente en materiales compuestos de nanotubos formados a partir de grupos de unión de bases dobles, hidroxiapatita y poli(metacrilato de hidroxietilo). Datos = media \pm EEM; N = 3; * $p < 0,01$ en comparación con el resto con respecto a las otras muestras. Todos los sustratos son significativamente mayores con el tiempo. El eje Y es la actividad de la fosfatasa alcalina medida en picomoles/min/cm².

60 Figura 24. Gráfico de deposición de calcio de osteoblastos aumentada por osteoblastos con contenido en hidroxiapatita creciente en materiales compuestos de nanotubos formados a partir de grupos de unión de bases dobles, hidroxiapatita y poli(metacrilato de hidroxietilo). Datos = media \pm EEM; N = 3; * $p < 0,01$ en comparación con el resto con respecto a las otras muestras. Todos los sustratos son significativamente mayores con el tiempo. El eje Y son microgramos de calcio/cm².

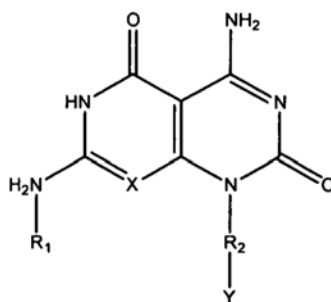
65

Descripción detallada de determinadas formas de realización a modo de ejemplo

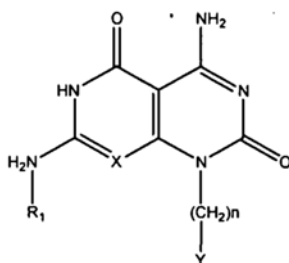
Formas de realización de la presente invención se basan en el descubrimiento de que las superficies de implante pueden adaptarse para potenciar o promover la adhesión de tipos celulares selectivos utilizando arquitecturas o estructuras de escala nanométrica que pueden ser preferentemente biomiméticas, en particular que presentan similitud estructural con estructuras encontradas en la naturaleza. Las estructuras de escala nanométrica están formadas a partir de módulos que preferentemente se autoensamblan para dar subestructuras, que se ensamblan ellas mismas para dar las arquitecturas o estructuras de escala nanométrica, cuando se colocan en un entorno acuoso tal como los fluidos corporales. Formas de realización de la presente invención se refieren además a composiciones que incluyen las estructuras de escala nanométrica, tales como nanotubos autoensamblados, un compuesto de refuerzo que proporciona resistencia mecánica, una nanopartícula opcional y un material de matriz. Las composiciones pueden ser fluidas o moldeables de manera que pueden colocarse en u ocupar o ajustarse a la forma en un sitio, espacio o ubicación deseada con el organismo, tal como mediante jeringa, trocar o a mano, y entonces curarse para dar una estructura endurecida para proporcionar una geometría de superficie de escala nanométrica, para proporcionar resistencia mecánica y/o para promover el crecimiento o la regeneración de tejido.

En algunas formas de realización, la viscosidad de la composición puede alterarse a entre un líquido fluido y una masilla menos fluida. A medida que la composición se hace más viscosa, puede ser más de tipo masilla. De manera similar, a medida que la composición se hace menos viscosa, puede describirse como un material fluido o líquido. Sin embargo, tal como conocería un experto habitual en la materia, los estados de ser "fluido" o "de tipo masilla" existen en un continuo.

Los módulos según la presente invención pueden incluir además compuestos de fórmula I a continuación:

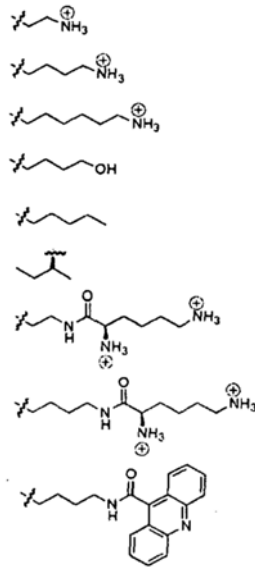


en la que X es CH o nitrógeno; Y está ausente o es un aminoácido o polipéptido; R₂ está ausente o es un grupo de unión y R₁ es un grupo alifático. Según un aspecto, Y es un aminoácido o polipéptido que presenta un grupo amino unido covalentemente a un carbono α del aminoácido y el grupo amino está unido covalentemente a un grupo de unión R₂ por ejemplo (CH₂)_n; n es un número entero de 1, 2, 3 o 4, y R₁ es un grupo alifático, tal como alquilo, de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado; y sales de los mismos. Preferentemente R₁ es alquilo de C₁ a C₁₀, alquilo de C₁ a C₅, alquilo de C₁ a C₃, o metilo. Los compuestos dentro del alcance de la invención incluyen aquellos en los que el grupo Y puede conectarse al grupo de unión o bien mediante el grupo amino o bien mediante el grupo carboxilo del aminoácido o polipéptido. Un grupo de unión a modo de ejemplo se muestra en la fórmula a continuación.



Grupos de unión R₂ alternativos pueden unir el grupo Y al carbono del grupo (CH₂)_n o al átomo de N o bien mediante el grupo amino o bien mediante el grupo carboxilo del aminoácido o polipéptido.

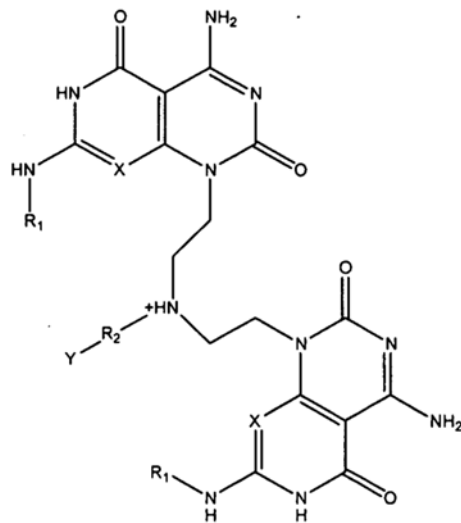
Restos de grupo de unión alternativos incluyen NH₃⁺ y los siguientes:



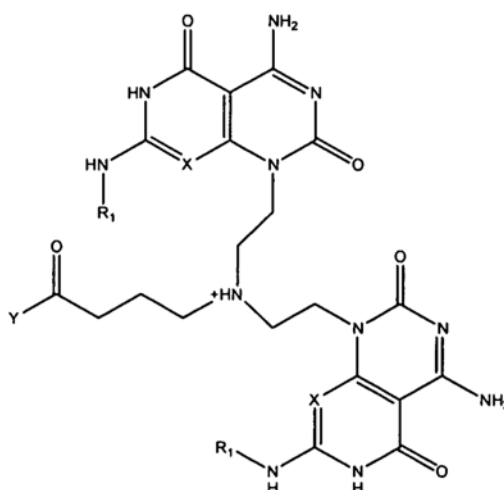
Los compuestos de fórmula I pueden prepararse mediante los procedimientos descritos en el documento US 6.696.565 solos o en combinación con procedimientos conocidos por los expertos en la materia.

5

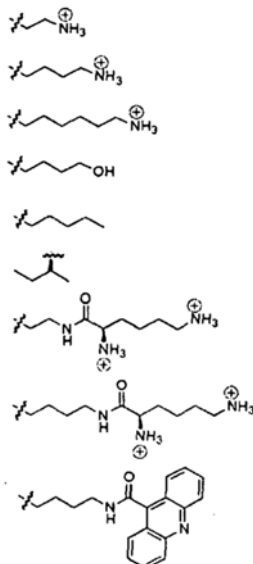
Los módulos según la invención incluyen compuestos de fórmula II a continuación:



10 en la que X es CH o nitrógeno; Y está ausente o es un aminoácido o polipéptido; R_2 está ausente o es un grupo de unión y R_1 es un grupo alifático. Según un aspecto, Y es un aminoácido o polipéptido que presenta un grupo amino unido covalentemente a un carbono α del aminoácido y el grupo amino está unido covalentemente a un grupo de unión R_2 , tal como $(\text{CH}_2)_3\text{CO}$; y R_1 es un grupo alifático, tal como alquilo, de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado; y sales de los mismos. Preferentemente R_1 es alquilo de C_1 a C_{10} , alquilo de C_1 a C_5 , alquilo de C_1 a C_3 ,
 15 o metilo. Un grupo de unión a modo de ejemplo se muestra en la fórmula a continuación.



5 Los compuestos de la invención incluyen aquellos en los que el grupo Y puede conectarse al grupo de unión o bien mediante el grupo amino o bien mediante el grupo carboxilo del aminoácido o polipéptido. Los grupos de unión R₂ alternativos que conectan el grupo NH⁺ y el grupo Y incluyen



10 Según determinados aspectos de la presente invención, la estructura de fórmula II puede denominarse una base doble con un grupo de unión (TBL) o grupos de unión de bases dobles en la medida en que dos estructuras de anillo doble similares están presentes tal como se muestra en la fórmula II y se unen y pueden incluir además un aminoácido o polipéptido. Sin embargo, ha de entenderse que no es necesario que las dos estructuras de anillo doble sean idénticas en la medida en que pueden presentar diferentes grupos X y R₁.

15 Los aminoácidos según la presente invención incluyen los aminoácidos conocidos comúnmente tales como glicina (Gly, G), alanina (Ala, A), valina (Val, V), leucina (Leu, L), isoleucina (Ile, I), prolina (Pro, P), hidroxiprolina, fenilalanina (Phe, F), tirosina (Tyr, Y), triptófano (Trp, W) cisteína (Cys, C), metionina (Met, M) serina (Ser, S), o-fosfoserina, treonina (Thr, T), lisina (Lys, K), arginina (Arg, R), histidina (His, H), aspartato (Asp, D), glutamato (Glu, E), γ -carboxiglutamato, asparagina (Asn, N), glutamina (Gln, Q) y similares. Los aminoácidos también incluyen
 20 estereoisómeros de los mismos y compuestos estructuralmente similares a los aminoácidos o modificaciones o derivados de los mismos. Los aminoácidos a modo de ejemplo dentro del alcance de la presente invención incluyen aquellos que mejoran la adhesión de células a la superficie de un sustrato. Por consiguiente, estos aminoácidos se denominan aminoácidos que promueven la adhesión celular. Los aminoácidos específicos que promueven la
 25 adhesión celular incluyen lisina, arginina, serina, glicina, aspartato y similares.

Los polipéptidos según la presente invención incluyen dos o más aminoácidos unidos covalentemente entre sí. Según un aspecto, los dos o más aminoácidos se unen covalentemente entre sí por lo menos en parte mediante uno o más enlaces peptídicos. Los polipéptidos a modo de ejemplo dentro del alcance de la presente invención incluyen
 30 aquellos que mejoran la adhesión de células a la superficie de un sustrato. Por consiguiente, estos polipéptidos se denominan péptidos que promueven la adhesión celular. Los péptidos específicos que promueven la adhesión

celular incluyen lisina-arginina-serina-arginina (KRSR), arginina-glicina-aspartato (RGD), isoleucina-lisina-valina-alanina-valina (IKVAV), tirosina-isoleucina-glicina-serina-arginina (YIGSR) y similares. Ha de entenderse que otros polipéptidos que presentan características que promueven la adhesión celular están dentro del alcance de la presente invención los reconocerán los expertos en la materia que presenta el beneficio de esta divulgación. Sin querer restringirse a la teoría científica, se cree que la adhesión entre osteoblastos y el polipéptido KRSR opera a través de mecanismos mediados por proteoglucano de sulfato de heparina. Véase Dee *et al.*, J. Biomed. Mater. Res., 1998;40:371-377.

Según aspectos de la presente invención, los módulos (compuestos) según la fórmula I y la fórmula II se autoensamblan para dar subestructuras también denominadas supermacrocielos que se ensamblarán ellos mismos para dar arquitecturas o estructuras de escala nanométrica tales como ensamblajes nanotubulares diferenciados en agua o disoluciones acuosas. Los supermacrocielos se definen en la presente memoria como varias moléculas orgánicas unidas entre sí covalente o no covalentemente para formar una estructura de anillo. Por ejemplo, los compuestos de fórmula I se autoensamblarán para dar una estructura de anillo hexamérico, en ocasiones denominada roseta. El proceso de formación de nanotubos con los módulos de la presente invención es jerárquico. En particular, los módulos de la presente invención se autoensamblan en primer lugar para dar supermacrocielos, y entonces los supermacrocielos se autoensamblan para dar nanotubos. Un autoensamblaje de este tipo se describe en el documento US 6.696.565. Para los compuestos de fórmula II que incluyen grupos de unión de bases dobles, los compuestos también se ensamblarán para dar una estructura de anillo hexamérico. Sin embargo, un único supermacrocielo formado incluirá dos capas de base debido a la presencia de las dos bases en cada uno de los compuestos de fórmula II.

Según aspectos preferidos de la presente invención, los compuestos de fórmula I y fórmula II incluyen análogos de bases de ADN sintéticas de bajo peso molecular denominadas por la nomenclatura CAG. Véase Fenniri *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 3854-3855. El resto CAG, denominado único motivo de CAG, posee el donador-donador-aceptor de guanina y el aceptor-aceptor-donador de citosina de Watson-Crick y experimentan un proceso de autoensamblaje provocado por una serie de enlaces de hidrógeno, para producir un supermacrocielo o roseta de seis miembros. El apilamiento de estas rosetas produjo un nanotubo de razón de aspecto muy alta. Los compuestos de la presente invención incluyen un motivo doble de GAC denominado (CAG)₂. Al igual que el motivo individual de CAG, el motivo doble de CAG (CAG)₂ también posee el donador-donador-aceptor de guanina y el aceptor-aceptor-donador de citosina de Watson-Crick y experimenta un proceso de ensamblaje, provocado por una serie de enlaces de hidrógeno, para producir un supermacrocielo o estructura de anillo (roseta) de seis miembros de configuración doble. El apilamiento de estas rosetas dobles produce un nanotubo de razón de aspecto muy alta y estabilidad superior.

Debe entenderse que la fórmula II descrita anteriormente demuestra que pueden organizarse eficazmente interacciones electrostáticas, de apilamiento e hidrófobas mediante enlaces de hidrógeno para dirigir el ensamblaje y la organización jerárquicas de arquitecturas nanotubulares helicoidales en un medio acuoso. Las arquitecturas nanotubulares helicoidales de la presente invención incluyen aquellas formadas completamente a partir de compuestos de fórmula II. Además, las arquitecturas nanotubulares helicoidales dentro del alcance de la presente invención incluyen aquellas formadas a partir de uno o más de entre los compuestos de fórmula I y uno o más de entre los compuestos de fórmula II. Por ejemplo, una subestructura de anillo supermacrocielo que presenta cadenas laterales de aminoácidos o polipéptidos particulares formadas a partir de los compuestos de fórmula I puede apilarse con una estructura de anillo supermacrocielo que presenta cadenas laterales de aminoácido o polipéptidos particulares formadas a partir de compuestos de fórmula II. Las subestructuras de roseta formadas a partir de los compuestos de fórmula I y fórmula II pueden apilarse en cualquier secuencia deseada para formar las estructuras nanotubulares de la presente invención. De esta manera, las estructuras nanotubulares presentan los aminoácidos o polipéptidos que promueven la adhesión de células seleccionadas a las estructuras nanotubulares. Utilizando este aspecto de la presente invención, puede sintetizarse una amplia variedad de módulos (es decir moléculas) estructuralmente diferentes específicos para promover la adhesión de determinadas células y autoensamblarse para dar supermacrocielos y después estructuras nanotubulares según procedimientos de la presente invención.

Según determinados aspectos preferidos de la presente invención, se prepara un nanotubo que incluye cadenas laterales de K, RGD y KRSR. El nanotubo puede formarse a partir de estructuras de anillo de monobase y estructuras de anillo de bases dobles en cualquier orden deseado. El nanotubo puede presentar una o más estructuras de anillo de monobase y una o más estructuras de anillo de bases dobles. Asimismo, un nanotubo dentro del alcance de la presente invención puede incluir una pluralidad de estructuras de anillo de monobase formadas a partir de compuestos de fórmula I y una pluralidad de estructuras de anillo de bases dobles formadas a partir de compuestos de fórmula II apilados entre sí, es decir uno junto a otro a través de enlaces de hidrógeno, para formar el nanotubo.

Según determinados aspectos, las superficies de implante se modifican para incluir las estructuras nanotubulares según la presente invención. Los implantes dentro del alcance de la presente invención presentan utilizaciones y aplicaciones particulares con aplicaciones ortopédicas, de cartílago, vasculares, neurales, cutáneas, de vejiga, cardiovasculares, y similares. Los implantes según la presente invención pueden fabricarse a partir de uno o más

materiales conocidos por los expertos en la materia incluyendo metales, cerámicas, polímeros y copolímeros. Los materiales de implante específicos incluyen titanio, acero inoxidable, Co-Cr-Mo, Ti6Al4V, nitinol, poli(ácido láctico-co-glicólico), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), poliuretano, policaprolactona, silicona, poli(cloruro de vinilo), alúmina, titania, hidroxiapatita, fosfatos de calcio, zircona, óxido de zinc, óxido de plata, y similares.

5 Según determinados aspectos, las estructuras nanotubulares se aplican directamente a la superficie de un implante como recubrimiento. El recubrimiento puede incluir las propias estructuras nanotubulares y puede incluir además componentes conocidos por los expertos en la materia para formar recubrimientos, tales como hidrogeles (tales como poli-HEMA), hidroxiapatita, fosfatos de calcio, alúmina, titania, polímeros (tales como poli(ácido láctico), poliuretano, policaprolactona, silicona, poli(cloruro de vinilo) y similares. El recubrimiento también puede incluir componentes que promueven el crecimiento celular tales como proteínas (vitronectina, fibronectina, heparina, etc.) y factores de crecimiento/citocinas (TGF- β , IGF, NGF, VEGF, BMP, etc.). El recubrimiento también puede incluir componentes terapéuticamente beneficiosos tales como fármacos, hormonas y antibióticos tales como penicilina, estreptomicina, gentamicina, dexametasona, estrógenos, bisfosfonatos, etc. y similares. El recubrimiento puede aplicarse a la superficie del implante utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la materia tales como aplicación directa, inmersión, pulverización, pintura, electrohilado, moldeado por colada, procesos térmicos o por calor, recubrimiento con centrifugación y similares. Según un aspecto, el recubrimiento se seca para retener el recubrimiento sobre la superficie antes de la aplicación de células. En otros aspectos, los recubrimientos dentro del alcance de la presente invención pueden curarse sobre la superficie de un implante utilizando composiciones y procedimientos de recubrimiento conocidos por los expertos en la materia.

Según determinados aspectos, una composición para la reparación o regeneración de tejido, tal como tejido óseo, puede incluir uno o más nanotubos formados a partir de una pluralidad de estructuras de anillo de monobase formadas a partir de compuestos de fórmula I. Ha de entenderse que no es necesario que el compuesto de fórmula I incluya un grupo de unión o un aminoácido o polipéptido y por tanto, no es necesario que los nanotubos formados a partir de la fórmula I según la presente divulgación incluyan un grupo de unión o aminoácido o un polipéptido. Según una forma de realización adicional, una composición según determinados aspectos incluye uno o más nanotubos formados a partir de una pluralidad de estructuras de anillo de bases dobles formadas a partir de compuestos de fórmula II. Ha de entenderse que no es necesario que el compuesto de fórmula II incluya un grupo de unión o un aminoácido o polipéptido y por tanto, no es necesario que los nanotubos formados a partir de la fórmula II según la presente divulgación incluyan un grupo de unión o aminoácido o un polipéptido. Según una forma de realización todavía adicional, una composición según determinados aspectos puede incluir uno o más nanotubos formados a partir de una pluralidad de estructuras de anillo de monobase formadas a partir de compuestos de fórmula I y una pluralidad de estructuras de anillo de bases dobles formadas a partir de compuestos de fórmula II apilados entre sí, es decir uno a junto a otro a través de enlaces de hidrógeno, para formar el nanotubo. Por consiguiente, la composición incluye compuestos de fórmula I o compuestos de fórmula II que pueden ensamblarse para dar nanotubos completamente de compuestos de fórmula II o nanotubos formados a partir de una mezcla de compuestos de fórmula I y fórmula II. Los módulos según la presente divulgación pueden estar presentes en la composición en una cantidad de entre aproximadamente 1 picogramo/ml y aproximadamente 1 kg/ml, aproximadamente 1 nanogramo/ml y aproximadamente 1 decigramo/ml, aproximadamente 1 microgramo/ml y aproximadamente 1 centigramo/ml, aproximadamente 1 miligramo/ml y aproximadamente 1 gramo/ml, de aproximadamente 0,001 mg/ml a aproximadamente 1 miligramo/ml, de aproximadamente 0,005 miligramos/ml a aproximadamente 0,05 miligramos/ml y aproximadamente 0,01 miligramos/ml. Los nanotubos según la presente divulgación pueden estar presentes en la composición en una cantidad de entre aproximadamente 1 picogramo/ml y aproximadamente 1 kg/ml, aproximadamente 1 nanogramo/ml y aproximadamente 1 decigramo/ml, aproximadamente 1 microgramo/ml y aproximadamente 1 centigramo/ml, aproximadamente 1 miligramo/ml y aproximadamente 1 gramo/ml, de aproximadamente 0,001 mg/ml a aproximadamente 1 miligramo/ml, de aproximadamente 0,005 miligramos/ml a aproximadamente 0,05 miligramos/ml y aproximadamente 0,01 miligramos/ml, y todos los intervalos y valores entremedias ya sean solapantes o no.

La composición según la presente divulgación también puede incluir un compuesto de refuerzo para proporcionar resistencia mecánica. El compuesto de refuerzo incluye fosfatos, tales como fosfatos de calcio en forma de gránulos o polvos. Determinados fosfatos de calcio incluyen hidroxiapatita, apatita, oxiapatita, fosfato de octacalcio, fosfato de monocalcio, fosfato de dicalcio, fosfato de tricalcio, β -fosfato de tricalcio, α -fosfato de tricalcio, fosfato de tetracalcio, hidrogenofosfato de calcio y dihidrogenofosfato de calcio y similares y mezclas de los mismos incluyendo todas las formas cristalinas y amorfas de fosfatos de calcio. El compuesto para proporcionar resistencia mecánica puede estar presente en la composición entre aproximadamente 1 picogramo/ml y aproximadamente 1 kg/ml, aproximadamente 1 nanogramo/ml y aproximadamente 1 decigramo/ml, aproximadamente 1 microgramo/ml y aproximadamente 1 centigramo/ml, aproximadamente 1 miligramo/ml y aproximadamente 1 gramo/ml, de aproximadamente 0,001 mg/ml a aproximadamente 1 miligramo/ml, de aproximadamente 0,005 miligramos/ml a aproximadamente 0,05 miligramos/ml y aproximadamente 0,01 miligramos/ml, y todos los intervalos y valores entremedias ya sean solapantes o no.

La composición según la presente divulgación también puede incluir un compuesto para mejorar la rugosidad de superficie. Tal rugosidad de superficie está presente sobre la superficie de un implante u otra estructura que se ha fabricado a partir de la composición. Los compuestos para mejorar la rugosidad de superficie incluyen compuestos

que presentan dimensiones de escala nanométrica, tales como nanopartículas. Tales nanopartículas incluyen nanopartículas de fosfato de calcio, tales como nanopartículas de hidroxiapatita, apatita, oxiapatita, fosfato de octacalcio, fosfato de monocalcio, fosfato de dicalcio, fosfato de tricalcio, β -fosfato de tricalcio, α -fosfato de tricalcio, fosfato de tetracalcio, hidrogenofosfato de calcio y dihidrogenofosfato de calcio y similares y mezclas de los mismos incluyendo todas las formas cristalinas y amorfas de fosfatos de calcio. El compuesto para mejorar la rugosidad de superficie puede estar presente en la composición entre aproximadamente el 0,0001% y aproximadamente el 99,9999%, aproximadamente el 0,01% y aproximadamente el 75%, aproximadamente el 0,1% y aproximadamente el 50%, aproximadamente el 1% y aproximadamente el 40%, aproximadamente el 2% y aproximadamente el 30%, aproximadamente el 5% y aproximadamente el 25%, y aproximadamente el 10% y aproximadamente el 20% y todos los intervalos y valores entremedias ya sean solapantes o no. El tamaño en diámetro de las nanopartículas puede ser de entre aproximadamente 1 ángstrom y aproximadamente 999 nm, aproximadamente 10 ángstrom y aproximadamente 500 nm, aproximadamente 1 nm y aproximadamente 100 nm, aproximadamente 10 nm y aproximadamente, 50 nm, y aproximadamente 20 nm y aproximadamente 40 nm y todos los intervalos y valores entremedias ya sean solapantes o no. Según un aspecto, un compuesto puede proporcionar tanto propiedades de resistencia mecánica como rugosidad de superficie. Un compuesto a modo de ejemplo que proporciona tanto resistencia mecánica como rugosidad de superficie son nanopartículas de hidroxiapatita. Según un aspecto, la cantidad de nanopartículas de hidroxiapatita en la composición puede variarse para conferir diferentes propiedades de resistencia mecánica al implante que se ha fabricado a partir de la composición.

La composición según la presente divulgación incluye además un material de matriz. Los materiales de matriz adecuados incluyen polímeros e hidrogeles. Los polímeros pueden ser no degradables o no erosionables o resistir la degradación o la erosión. Los polímeros pueden ser biodegradables o bioerosionables. Los polímeros a modo de ejemplo incluyen uno o más de entre poli(ácido láctico), poli(lactida-co-glicolida), poli(ácido glicólico), poli(metacrilato de metilo), poliuretano, policaprolactona, polietileno, poliestireno polipropileno, polipirrol, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) y similares utilizados como materiales de matriz y combinaciones de los mismos. Según un aspecto, la composición se prepara combinando uno o más tipos de componentes polimerizables tales como monómeros de los polímeros anteriores, tales como monómeros de metacrilato de hidroxietilo (HEMA), y/o polímeros que pueden polimerizarse adicionalmente en combinación con nanotubos y el compuesto para proporcionar resistencia mecánica y/o rugosidad de superficie. Los componentes polimerizables se polimerizan para dar una matriz de polímero que incorpora los nanotubos y el compuesto para mejorar la resistencia mecánica y/o la rugosidad de superficie. Los componentes polimerizables según la presente divulgación pueden estar presentes en la composición en una cantidad de entre aproximadamente el 0,0001% y aproximadamente el 99,9999%, aproximadamente el 0,01% y aproximadamente el 75%, aproximadamente el 0,1% y aproximadamente el 50%, aproximadamente el 1% y aproximadamente el 40%, aproximadamente el 2% y aproximadamente el 30%, aproximadamente el 5% y aproximadamente el 25%, aproximadamente el 10% y aproximadamente el 20%, aproximadamente el 20% y aproximadamente el 90%, aproximadamente el 30% y aproximadamente el 90%, aproximadamente el 40% y aproximadamente el 90%, aproximadamente el 50% y aproximadamente el 90%, aproximadamente el 60% y aproximadamente el 90%, y aproximadamente el 70% y aproximadamente el 90% y todos los intervalos y valores entremedias ya sean solapantes o no. En este aspecto, una forma de realización de la composición incluye un material de matriz curable que se cura para dar una sustancia endurecida. El material de matriz curable se cura para formar una matriz curada con, por ejemplo, nanotubos y nanopartículas de hidroxiapatita incluidos en la misma y presentes en la superficie de la matriz curada. La matriz curada puede adoptar cualquier conformación deseada, tal como la conformación de un molde deseado, por ejemplo que se asemeja a un defecto tisular, tal como un defecto óseo o zona de pérdida de hueso o un implante utilizado para reconstruir daño tisular tal como una placa o un tornillo. Los materiales de matriz curables incluyen resinas curables tales como resinas curables con energía. Los materiales de matriz curables incluyen aquellos que pueden curarse mediante exposición a la luz, tal como luz ultravioleta, calor, condensación o reticulación. Los materiales de matriz curables incluyen materiales curables a base de silicona.

Las composiciones pueden incluir además componentes típicos para la polimerización tales como un iniciador, un agente de reticulación, un agente dispersante, un modificador de la reología, una carga y otros componentes útiles en la producción de una matriz polimerizable que pueden combinarse, si se desea, con componentes biológicos tales como proteínas, citocinas y factores de crecimiento. Los iniciadores según la presente divulgación incluyen aquellos conocidos por un experto en la materia, tales como azobisisobutironitrilo (AIBN), moléculas de halógeno, compuestos azoicos, peróxidos orgánicos y similares, que pueden estar presentes en la composición en una cantidad de entre aproximadamente el 0,0001% y aproximadamente el 20%, aproximadamente el 0,001% y aproximadamente el 10%, aproximadamente el 0,01% y aproximadamente el 5%, aproximadamente el 0,1% y aproximadamente el 3%, aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 2 mg/ml y aproximadamente 3 mg/ml y todos los intervalos y valores entremedias ya sean solapantes o no. Los agentes de reticulación según la presente divulgación incluyen aquellos conocidos por un experto en la materia, tales como formalina, formaldehído, calcio, glutaraldehído y similares, que pueden estar presentes en la composición en una cantidad de entre aproximadamente el 0,0001% y aproximadamente el 99,9999%, aproximadamente el 0,01% y aproximadamente el 75%, aproximadamente el 0,1% y aproximadamente el 50%, aproximadamente el 1% y aproximadamente el 40%, aproximadamente el 2% y aproximadamente el 30%, aproximadamente el 5% y aproximadamente el 25%, aproximadamente el 10% y aproximadamente el 20%, aproximadamente el 20% y aproximadamente el 90%, aproximadamente el 30% y

aproximadamente el 90%, aproximadamente el 40% y aproximadamente el 90%, aproximadamente el 50% y aproximadamente el 90%, aproximadamente el 60% y aproximadamente el 90%, y aproximadamente el 70% y aproximadamente el 90% y todos los intervalos y valores entremedias ya sean solapantes o no.

5 Las composiciones pueden incluir además excipientes, tales como excipientes de sacáridos como monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos dispersables en agua.

Las composiciones pueden incluir además aglutinantes conocidos por los expertos en la materia tales como sulfatos de calcio y silicatos de calcio. Los aglutinantes a modo de ejemplo incluyen sulfato de calcio hemihidratado (CaSO₄.1/2H₂O), que reacciona con agua para formar sulfato de calcio dihidratado (CaSO₄.2H₂O) tras mezclado, y silicato de tricalcio (CaO)₃.SiO₂ (o Ca₃SiO₅).

15 Según un aspecto de la presente divulgación, una composición solidificada a modo de ejemplo incluye pHEMA, HA a aproximadamente el 20%, AIBN aproximadamente 3 mg/ml y un compuesto de fórmula II aproximadamente 0,01 mg/ml. Las formulaciones fluidas a modo de ejemplo incluyen pHEMA, agua H₂O a aproximadamente el 20%-30%, AIBN aproximadamente 2-3 mg/ml y aproximadamente 0,01 mg/ml de un compuesto de fórmula II. HA puede estar presente opcionalmente en la formulación fluida.

20 Según determinados aspectos, las células pueden adherirse sobre la superficie de los implantes que se han modificado con las estructuras nanotubulares de la presente invención. Las células dentro del alcance de la presente invención incluyen osteoblastos, fibroblastos, células endoteliales, células madre, queratinocitos, miocitos cardiacos, condrocitos, sinoviocitos, células madre mesenquimatosas, células madre neurales, células de islote, hepatocitos, células del músculo liso, células uroteliales, neuronas, células de Schwann, etc. y similares. Las células preferidas incluyen osteoblastos en la medida en que los recubrimientos de la presente invención convierten superficies de implantes convencionales en superficies de contacto nanoestructuradas biomiméticas para potenciar la adhesión celular y la osteointegración.

25 En otras formas de realización determinadas, los módulos o estructuras nanotubulares autoensambladas puede combinarse con componentes o con el medio adecuado para producir una composición para una masilla o formulación inyectable. La composición también puede incluir componentes que promueven el crecimiento celular tales como proteínas (vitronectina, fibronectina, heparina, etc.) y factores de crecimiento/citocinas (TGF-β, IGF, NGF, VEGF, BMP, etc.). La composición también puede incluir componentes terapéuticamente beneficiosos tales como fármacos, hormonas, antibióticos, tales como penicilina, estreptomina, gentamicina, dexametasona, estrógenos, bisfosfonatos, etc. y similares. La composición también puede incluir componentes beneficiosos para el diagnóstico tales como radiomarcadores, partículas magnéticas, marcadores fluorescentes y marcadores radiopacos.

30 El agente bioactivo, cuando está presente, puede ser por ejemplo un factor de crecimiento tal como proteína morfogenética ósea (por ejemplo, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-14, BMP-15), y pueden incluirse uno o más factores de crecimiento diferentes en el implante. Cuando se incluye un factor de crecimiento, en primer lugar debe mezclarse manualmente la composición y luego empapar la composición con una disolución que comprende el factor de crecimiento. Esta composición resultante puede administrarse a un usuario final como una formulación premezclada.

35 En algunas formas de realización, la composición que formará el implante comprende colágeno, tal como colágeno bovino de tipo I. En otras formas de realización hay ausencia de colágeno. Además, en algunas formas de realización, la composición que formará el implante contiene uno o más componentes fibrosos distintos de colágeno, tales como hidroxibutirato y/o un alginato reticulado. Estos componentes fibrosos distintos de colágeno pueden potenciar la osteoconductividad. En algunas formas de realización, la composición contiene tanto alginatos reticulados como no reticulados. En otras formas de realización, la composición no contiene alginatos, sólo alginatos reticulados o sólo alginatos no reticulados.

40 En algunas formas de realización, la composición puede incluir uno o más vidrios bioactivos. Un vidrio bioactivo está compuesto generalmente por los elementos silicio, calcio, fósforo, sodio y oxígeno, aunque pueden añadirse otros elementos tales como boro, potasio, magnesio y flúor por ejemplo, para modificar diversas características, tal como se da a conocer en las patentes U.S. n.^{os} 4.103.002, 4.775.646 y 4.851.046. Una composición de vidrio bioactivo representativa puede comprender por ejemplo del 40 al 52% en peso de SiO₂, del 10 al 50% en peso de CaO, del 10 al 35% en peso de Na₂O, del 2 al 8% en peso de P₂O₅, del 0 al 25% en peso de CaF₂, del 0 al 10% en peso de B₂O₃, del 0 al 8% en peso de K₂O y del 0 al 5% en peso de MgO. Como ejemplo preferido, una composición de vidrio bioactivo específica, comercializada con el nombre comercial BIOGLASS®, presenta una composición de 45 aproximadamente el 21% de silicio, el 18% de calcio, el 18% de sodio, el 3% de fósforo y el 40% de oxígeno (en porcentaje en peso).

50 Adicionalmente, en algunas formas de realización, las composiciones que formarán los implantes no contienen componentes derivados ni de tejido humano ni de tejido animal. Al omitir estos tipos de componentes, puede reducirse el riesgo de transmisión de enfermedades, y particularmente en formas de realización que no contienen colágeno, los implantes serán particularmente ventajosos para su utilización en aplicaciones en las que están

prohibidos productos que contienen colágeno.

5 En algunas formas de realización, las composiciones que formarán los implantes también contendrán un componente líquido tal como agua. En la práctica, la composición que va a conformarse e implantarse puede suministrarse a un proveedor en una formulación lista para utilizar. Por ejemplo, una composición que va a moldearse para dar una conformación de implante deseada puede prehidratarse y suministrarse con una jeringa o precargarse en una jeringa. En algunas formas de realización, la hidratación se lleva a cabo con agua estéril.

10 En algunas formas de realización, el implante está diseñado para fluir a través de una jeringa así como para ser maleable y cohesivo de manera que pueda conformarse y moldearse de manera intraoperatoria para adaptarse a un sitio quirúrgico. Puesto que estas características están presentes, un profesional sanitario dispondrá de un intervalo de tiempo mayor en el que conformar el implante para su utilización en cada aplicación. Por tanto, la composición puede dispensarse a partir de la jeringa, moldearse y luego insertarse a mano en un sitio deseado.

15 El implante puede combinarse en un sitio operatorio con uno o más de aspirado de médula ósea, tejido de autoinjerto, tejido de aloinjerto y agentes de injertado sintéticos. También pueden utilizarse en diversas ubicaciones diferentes incluyendo, pero sin limitarse a la columna vertebral, sitios ortopédicos y COMF. En algunas formas de realización, el implante de la presente invención es particularmente útil para rellenar defectos periodontales, rellenar alvéolos de extracción dental, rellenar defectos quísticos, elevaciones sinusales, aumento de borde alveolar, aumento o reconstrucción bucal o maxilofacial, aplicaciones de cuerpos invertebrales o postero-laterales, defecto no de soporte de carga y huecos producidos por traumatismo. En estas y otras aplicaciones, el implante puede utilizarse con o sin fijación interna.

25 En algunas formas de realización, los componentes de la composición del implante son tales que no hay tiempo de fraguado. Por tanto, en algunas formas de realización puede que no haya estabilizadores (también conocidos como agentes de estabilización). En otras formas de realización, el implante puede contener además un agente de estabilización, que puede ser un material que permitirá que un mineral de fosfato de calcio fragüe cuando reacciona una vez que se ha almacenado el fosfato de calcio durante una cantidad de tiempo predeterminada. En algunas formas de realización, este periodo de tiempo es de por lo menos un mes, por lo menos dos meses, por lo menos tres meses, por lo menos cuatro meses, por lo menos cinco meses, por lo menos seis meses. En algunas formas de realización, este periodo de tiempo es de menos de siete meses, menos de seis meses, menos de cinco meses, menos de cuatro meses, menos de tres meses o menos de dos meses.

35 Ejemplos de los agentes de estabilización que pueden utilizarse según la presente invención, incluyen pero no se limitan a MgO , MgO_2 , $Mg(OH)_2$, $MgHPO_4$, $MgHPO_4 \cdot 3H_2O$, $MgHPO_4 \cdot 7H_2O$, $Mg_3(PO_4)_2$, $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 4H_2O$, $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$, $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22H_2O$, $MgCO_3$, $MgCO_3 \cdot 3H_2O$, $MgCO_3 \cdot 5H_2O$, $3MgCO_3Mg(OH)_2 \cdot 3H_2O$, $Mg(C_3H_5O_3)_2 \cdot 3H_2O$, $MgC_2O_4 \cdot 2H_2O$, $Mg(C_4H_4O_6)_2 \cdot 4H_2O$, $MgCO_3CaCO_3$, $Mg_2P_2O_7$, $Mg(C_{12}H_{23}O_2)_2 \cdot 2H_2O$, $Mg(C_{14}H_{27}O_2)_2$, $Mg(C_{18}H_{33}O_2)_2$, o $Mg(C_{18}H_{35}O_2)_2$ y/o una mezcla de los mismos. En algunas formas de realización, el agente de estabilización preferido es óxido de magnesio.

40 En algunas formas de realización, el agente de estabilización está presente en una cantidad de desde aproximadamente 10 ppm hasta aproximadamente 60 ppm o desde aproximadamente 30 ppm hasta aproximadamente 50 ppm o desde aproximadamente 35 ppm hasta aproximadamente 45 ppm en relación con el peso total del fosfato de calcio.

45 En algunas formas de realización, se incluye uno o más de entre los siguientes aditivos además del factor de crecimiento al que se ha hecho referencia anteriormente o en lugar del factor de crecimiento al que sea hecho referencia anteriormente: proteínas, agentes de opacidad a los rayos X, medicamentos, materiales de carga de soporte o refuerzo, agentes de ajuste del crecimiento de cristales, modificadores de la viscosidad, agentes de formación de poros y mezclas de los mismos.

50 El implante también puede contener uno o más antibióticos. Los ejemplos de antibióticos que pueden usarse, incluyen pero no se limitan a antibióticos de nitroimidazol, tetraciclinas, penicilinas, cefalosporinas, carbopenem, aminoglucósidos, antibióticos macrólidos, antibióticos de lincosamida, 4-quinolonas, rifamicinas y nitrofurantoína. Los compuestos específicos adecuados incluyen, sin limitación, ampicilina, amoxicilina, bencilpenicilina, fenoximetilpenicilina, bacampicilina, pivampicilina, carbenicilina, cloxacilina, ciclacilina, dicloxacilina, meticilina, oxacilina, piperacilina, ticarcilina, flucloxacilina, cefuroxima, cefetamet, cefetram, cefixina, ceftazidima, ceftizoxima, latamoxef, cefoperazona, ceftriaxona, cefsulodina, cefotaxima, cefalexina, cefaclor, cefadroxilo, cefalotina, cefazolina, cefpodoxima, ceftibuteno, aztreonam, tigemonam, eritromicina, diritromicina, roxitromicina, azitromicina, claritromicina, clindamicina, paldimicina, lincomiricina, vancomicina, espectinomicina, tobramicina, paromomicina, metronidazol, tinidazol, ornidazol, amifloxacino, cinoxacina, ciprofloxacino, difloxacino, enoxacina, fleroxacina, norfloxacino, ofloxacino, temafloracino, teromocina, doxiciclina, minociclina, tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina, metaciclina, rolitetraciclina, nitrofurantoína, ácido nalidixico, gentamicina, rifampicina, amicacina, netilmicina, imipenem, cilastatina, cloranfenicol, furazolidona, nifuroxazida, sulfadiazina, sulfametoxazol, subsalicilato de bismuto, subcitrato de bismuto coloidal, gramicidina, meclilnam, cloxiquina, clorhexidina, alcohol diclorobencílico, metil-2-pentilfenol y cualquier combinación de los mismos.

Los antibióticos pueden integrarse en la composición de la misma manera que el factor de crecimiento se integra en la misma. Además, puede incluirse un antibiótico en lugar de o además de un factor de crecimiento.

5 Los compuestos antiinflamatorios adecuados incluyen tanto estructuras esteroideas como no esteroideas. Los ejemplos no limitativos adecuados de compuestos antiinflamatorios no esteroideos son corticosteroides tales como hidrocortisona, cortisol, hidroxiltriamicinolona, alfa-metil-dexametasona, fosfato de dexametasona, dipropionatos de beclometasona, valerato de clobetasol, desonida, desoximetasona, acetato de desoxicorticosterona, dexametasona, diclorisona, diacetato de diflorasona, valerato de diflucortolona, fludrenolona, acetónido de fluclorolona, fludrocortisona, pivalato de flumetasona, acetónido de fluosinolona, fluocinonida, ésteres butílicos de fluocortina, fluocortolona, acetato de flupredideno (fluprednilideno), flurandrenolona, halcinonida, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, metilprednisolona, acetónido de triamicinolona, cortisona, cortodoxona, flucetónido, fludrocortisona, diacetato de difluorasona, flurandrenolona, fludrocortisona, diacetato de difluorasona, fluocinolona, acetónido de flurandrenolona, medrisona, amcinafel, amcinafida, betametasona y el resto de sus ésteres, cloroprednisona, acetato de cloroprednisona, clocortolona, clescincinolona, diclorisona, difluprednato, fluclozinida, flunisolidina, fluorometolona, fluperolona, fluprednisolona, valerato de hidrocortisona, ciclopentilpropionato de hidrocortisona, hidrocortamato, meprednisona, parametasona, prednisolona, prednisona, dipropionato de beclometasona, triamicinolona. También pueden usarse mezclas de los compuestos antiinflamatorios esteroideos anteriores.

20 Los ejemplos no limitativos de compuestos antiinflamatorios no esteroideos incluyen nabumetona, celecoxib, etodolac, nimesulida, apasona, oro, oxicam, tales como piroxicam, isoxicam, meloxicam, tenoxicam, sudoxicam y CP-14.304; los salicilatos, tales como aspirina, disalcid, benorilato, trilisato, safaprina, solprina, diflunisal y fendosal; los derivados de ácido acético, tales como diclofenaco, fenclofenaco, indometacina, sulindaco, tolmetina, isoxepaco, furofenaco, tiopinaco, zidometacina, acematacina, fentiazaco, zomepiraco, clindanaco, oxepinaco, felbinaco y ketorolac; los fenamatos, tales como los ácidos mefenámico, meclofenámico, flufenámico, niflúmico y tolfenámico; los derivados de ácido propiónico, tales como ibuprofeno, naproxeno, benoxaprofeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, fenoprofeno, fenbufeno, indoprofeno, piroprofeno, carprofeno, oxaprozina, pranoprofeno, miroprofeno, tioxaprofeno, suprofeno, alminoprofeno y ácido tiaprofénico; y los pirazoles, tales como fenilbutazona, oxifenbutazona, feprazona, azapropazona y trimetazona.

25 Los diversos compuestos englobados por compuestos antiinflamatorios se conocen bien por los expertos en la materia. Para una descripción detallada de la estructura química, la síntesis, los efectos secundarios, etc. de compuestos antiinflamatorios no esteroideos, puede hacerse referencia a textos convencionales, incluyendo Anti-inflammatory and Anti-Rheumatic Drugs, K. D. Rainsford, Vol. I-III, CRC Press, Boca Raton, (1985), y Anti-inflammatory Agents, Chemistry and Pharmacology 1, R. A. Scherrer, *et al.*, Academic Press, New York (1974).

30 También pueden emplearse mezclas de estos compuestos antiinflamatorios no esteroideos, así como las sales y los ésteres farmacológicamente aceptables de estos compuestos.

35 Además, pueden ser útiles los denominados compuestos antiinflamatorios "naturales". Tales compuestos pueden obtenerse de manera adecuada como un extracto mediante aislamiento físico y/o químico adecuado a partir de fuentes naturales (por ejemplo, plantas, hongos, subproductos de microorganismos). Los ejemplos no limitativos adecuados de tales compuestos incluyen cera de candelilla, alfa-bisabolol, aloe vera, Manjistha (extraído de plantas del género *Rubia*, particularmente *Rubia cordifolia*), y Guggal (extraído de plantas del género *Commiphora*, particularmente *Commiphora mukul*), extracto de nuez de cola, manzanilla, extracto de gorgonia, compuestos de la familia del regaliz (el género/especies de plantas *Glycyrrhiza glabra*), incluyendo el ácido glicirrético, ácido glicirrítico y derivados de los mismos (por ejemplo, sales y ésteres). Las sales adecuadas de los compuestos anteriores incluyen sales de metal y amonio. Los ésteres adecuados incluyen ésteres de los ácidos saturados o insaturados C₂-C₂₄, preferentemente C₁₀-C₂₄, más preferentemente C₁₆-C₂₄. Los ejemplos específicos de los anteriores incluyen extracto de regaliz soluble en aceite, los propios ácidos glicirrítico y glicirrético, glicirricinato de monoamonio, glicirricinato de monopotasio, glicirricinato de dipotasio, ácido 1-beta-glicirrético, glicirretinato de estearilo y ácido 3-esteariloxi-glicirretínico y 3-succiniloxi-beta-glicirretinato de sodio.

40 Generalmente, los fármacos antiinflamatorios no esteroideos se incluyen en la definición de agentes analgésicos porque proporcionan alivio del dolor. Además, los agentes analgésicos adecuados incluyen otros tipos de compuestos, tales como, por ejemplo, opioides (tales como, por ejemplo, morfina y naloxona), anestésicos locales (tales como, por ejemplo, lidocaína), antagonistas del receptor de glutamato, agonistas de receptores α -adrenérgicos, adenosina, cannabinoides, agonistas de receptores colinérgicos y de GABA y diferentes neuropéptidos. Una discusión detallada de diferente analgésicos se facilita en Sawynok *et al.*, (2003) Pharmacological Reviews, 55:120.

45 Las composiciones de la presente divulgación también pueden incluir células. Las células adecuadas incluyen, sin limitaciones, células madre, por ejemplo, células madre embrionarias o adultas, que pueden derivarse de manera conveniente de la sangre o la médula ósea del paciente o de una estructura alogénica, que preferentemente es inmunológicamente compatible con el paciente. Otras células adecuadas pueden incluir células precursoras

condrogénicas u osteogénicas. Un experto habitual en la materia apreciará que las células pueden modificarse genéticamente (por ejemplo, sobreexpresando determinadas proteínas, o presentando expresión inhibida de determinadas proteínas). Los procedimientos de creación de tales células modificadas genéticamente están dentro del conocimiento y la experiencia del experto habitual en la materia.

Las composiciones de la presente divulgación también pueden incluir secuencias de ácido nucleico. Las secuencias de ácido nucleico adecuadas incluyen, sin limitación, secuencias de ADNc que codifican para el por lo menos un factor bioactivo de naturaleza proteica. Estos ADNc pueden incluirse dentro de vectores respectivos (por ejemplo, VAA). En otra realización, las secuencias de ácido nucleico pueden ser ARNip o ARNhc o secuencias de ácido nucleico que codifican para tales ARNip o ARNhc. Estos ARNip y ARNhc pueden usarse en formas de realización en las que es deseable inhibir la expresión de determinados genes, tales como, por ejemplo genes de proteínas inflamatorias tales como proteínas inhibitoras de TNF, IL-1, IL-6 y BMP tales como nogina y cordina, e inhibidores intracelulares de BMP, SMADS. Un experto habitual en la materia apreciará que las secuencias de nucleótidos para tales genes están disponibles en bases de datos accesibles públicamente, incluyendo, sin limitación, Genbank. Además, se han descrito en la técnica los criterios para la selección del ARNip. Por consiguiente, un experto habitual en la materia tendrá suficiente conocimiento y experiencia para preparar tales ARNip o ARNhc.

Los procedimientos de incorporación de por lo menos un factor bioactivo también se conocen en la materia. En una realización, la composición puede empaparse con una disolución del por lo menos un factor bioactivo antes de la implantación. En algunas formas de realización, dependiendo de las propiedades del por lo menos un factor bioactivo, la composición puede empaparse con la disolución durante 1-60 minutos antes de la implantación. El por lo menos un factor bioactivo también puede añadirse por goteo, cepillado o pulverizarse sobre la composición de la presente divulgación o implantes que incluyen la composición de la presente divulgación.

Si el por lo menos un factor bioactivo incluye células, las células pueden resuspenderse en un volumen de medios (por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco) y cultivarse con las composiciones descritas en la presente memoria. Debido a las propiedades de la superficie de la composición y, en determinados casos, la porosidad de la composición, las células poblarán las superficies externas de la composición y sus huecos internos. Las condiciones de carga óptimas (por ejemplo, composición del medio, agitación, si es necesario) pueden determinarse fácilmente por el experto habitual en la materia. Además, la composición puede humedecerse con un aspirado de la médula ósea del paciente, permitiendo por tanto que las células de la médula ósea pueblen los huecos y poros dentro de la composición.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son formas de realización específicas de la presente invención pero no pretenden limitar la misma.

Ejemplo 1

Síntesis de compuesto de bases dobles funcionalizadas con polipéptido de fórmula II

Todos los reactivos y disolventes utilizados en las siguientes síntesis se obtuvieron de Aldrich, Novabiochem, BaChem, Fluka, Fisher Scientific of Advanced ChemTech, y se utilizaron sin purificación adicional. Se purificaron diclorometano, metanol y éter de calidad para reactivo en un sistema de purificación de disolventes MBraun. En las figuras 1A a 1D se muestran módulos de pares de bases dobles funcionalizadas con el polipéptido KRSR, es decir KRSR-(C \wedge G)₂ y módulos de pares de bases dobles funcionalizadas con aminobutano, es decir AB-(C \wedge G)₂ y se sintetizaron según los procedimientos ilustrados en la figura 2A y la figura 2B, respectivamente. Las figuras 1E a 1G representa RNT de bases dobles de TB-KRSR (E); TBL (F); el proceso de autoensamblaje de bases dobles de C \wedge G para dar un nanotubo de roseta (G).

Se utilizó la síntesis peptídica en fase sólida con Fmoc convencional [véase Carpino *et al.*, J. Org. Chem. 1972;37(22):3404-3409 y Atherton *et al.*, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1978:537-539] para preparar el péptido KSRS soportado sobre resina de Wang. SPPS [véase Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 1963;85(14):2149-2154] es un procedimiento sencillo, que permite la síntesis rápida de péptidos con buenos rendimientos. Este procedimiento elimina problemas de solubilidad, purificación y racemización, comunes con la síntesis peptídica en fase sólida. En general, los grupos carboxilo del aminoácido protegido Fmoc-Lys(Boc)-OH se acoplaron en primer lugar a los grupos hidroxilo en la resina de Wang. Se eliminó el grupo Fmoc de la lisina anclada a la resina en condiciones básicas, tras lo cual se hizo reaccionar con el segundo aminoácido Fmoc-Arg(PBf)-OH. Se repitió el mismo procedimiento para acoplamiento de aminoácidos posteriores con Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Arg(PBf)-OH y Fmoc- γ -Abu-OH. Se eliminó el grupo Fmoc terminal en el péptido soportado sobre resina de Wang y se acopló de manera reductora la amina libre resultante con el aldehído de C \wedge G. Se obtuvo el motivo KRSR-(C \wedge G)₂ deseado tras desprotección y escisión de la resina en condiciones fuertemente ácidas.

Más específicamente y con referencia a la figura 2A, para anclar el primer aminoácido a la resina, se vertieron Fmoc-aminoácido (4 eq.), *p*-dimetilaminopiridina (DMAP) (1 eq.) en N, N-dimetilformamida (DMF, 8 ml) en una jeringa de

plástico desechable que contenía la resina de Wang (1 eq.). Después de activar la resina durante 20 min, se añadió N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC, 4 eq.) al recipiente y se agitó la mezcla de reacción durante 6 horas (h). Entonces se filtró la resina a vacío, se lavó con 10 ml de cada uno de CH₂Cl₂, MeOH, DMF y luego se trató con anhídrido acético/piridina 50:50 (5 ml, 1 x 10 min y 2 x 20 min) para ocupar los grupos hidroxilo no reactivos. Entonces se filtró la resina y se lavó con (3 x 10 ml) con DMF, CH₂Cl₂, y MeOH y se secó a vacío. Se determinó el grado de sustitución (0,52 mmol/g) mediante cuantificación espectroscópica del aducto fulveno-piperidina a 301 nm con una muestra de resina.

Se acoplaron los aminoácidos posteriores de la siguiente manera: se eliminó el grupo protector Fmoc mediante incubación de la resina en piperidina al 20%/DMF (5 ml, 1 x 5 min, 1 x 30 min). Se lavó la resina de peptidilo resultante con 10 ml de cada uno de CH₂Cl₂, MeOH, DMF. Se añadió N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (DIEA, 8 eq.) a una mezcla de aminoácido (4 eq. con relación a la carga de resina) y hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU, 4 eq.) en disolución en DMF, y se activó la mezcla mediante agitación durante 3 minutos (min). Entonces se añadió la mezcla resultante a la resina de peptidilo y se agitó durante 3 horas (h). Entonces se drenó la resina de peptidilo y se lavó con 10 ml de cada uno de CH₂Cl₂, MeOH y DMF. Se confirmó la ausencia de grupos amino libres con la prueba de Kaiser [véase Kaiser *et al.*, Anal. Biochem, 1970, 24, 595-598]. Se eliminó el grupo protector Fmoc mediante incubación de la resina en piperidina al 20%/DMF (5 ml, 1 x 5 min, 1 x 30 min). Se lavó la resina de peptidilo resultante con 10 ml de cada uno de CH₂Cl₂, MeOH y DMF.

Para preparar KRSR-(C_λG)₂, se acopló el péptido KRSR soportado sobre resina de Wang al aldehído de C_λG 1 (figura 2A). Se añadió el aldehído de C_λG 1 (4 eq. con relación a la carga de resina) a la resina de peptidilo en 1,2-dicloroetano (1,2-DCE, 5 ml), y se agitó la mezcla durante 4 h. Luego se añadieron NaBH(OAc)₃ (2 eq.) y DIEA (4 eq.) y se agitó la mezcla durante 36 h, después de lo cual se añadieron otros 2 eq. de NaBH(OAc)₃ y 4 eq. de DIEA y se agitó durante 36 h más. Se drenó la resina y se lavó la resina de peptidilo resultante con CH₂Cl₂, MeOH y DMF (4 x 10 ml cada uno), y se secó a vacío. Se logró la escisión de la resina y la desprotección tratando la resina con TFA al 95%/agua durante 2 h. Se filtraron las perlas sobre Celite y se concentró el filtrado resultante hasta dar un líquido viscoso (rotavapor). Entonces se añadió a Et₂O frío para precipitar KRSR-(C_λG)₂ en bruto, que se aisló mediante centrifugación. Se retiró el líquido sobrenadante mediante decantación. Se resuspendió el sólido residual en Et₂O (2 x 15 ml), se sonicó y se centrifugó. Se secó el precipitado para producir el KRSR-(C_λG)₂ deseado como un polvo blanquecino.

Se llevó a cabo el esquema de síntesis (figura 2B) para la preparación del módulo AB-(C_λG)₂ a partir del aldehído de C_λG y 4-aminobutilcarbamato de *t*-butilo mediante dos reacciones de aminación reductoras consecutivas seguidas por la eliminación de todos los grupos protectores. Específicamente, para preparar AB-(C_λG)₂, se añadió la amina disponible comercialmente 2 (1,00 g, 1,57 mmol) a una disolución de aldehído de C_λG 1 (0,148 g, 0,784 mmol) en 1,2-DCE (10 ml) a temperatura ambiente bajo N₂ y se agitó durante 30 min. Se añadió NaBH(OAc)₃ (0,395 g, 1,88 mmol) y se agitó la mezcla resultante durante 15 h más. Se diluyó la mezcla de reacción con CH₂Cl₂ (50 ml) y luego se lavó con agua (10 ml), salmuera (15 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró (rotavapor). Se obtuvo el compuesto 3 (1,36 g, 93%) como una espuma amarilla después de cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (MeOH al 0-10%/EtOAc). Entonces se añadió aldehído de C_λG 1 (0,100 g, 0,155 mmol) a una disolución del monómero 3 (0,126 g, 0,155 mmol) en 1,2-DCE (10 ml) a temperatura ambiente bajo N₂ y se agitó durante 30 min. Se añadió NaBH(OAc)₃ (0,039 g, 0,186 mmol) y se agitó la mezcla resultante durante 15 h más. Se diluyó la mezcla de reacción con CH₂Cl₂ (50 ml) y se lavó con agua (10 ml), salmuera (15 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. Se obtuvo el compuesto 4 (0,204 g, 91%) como una espuma amarilla después de cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (EtOAc al 0-50%/hexanos). Se agitó el compuesto 4 (0,106 g, 0,074 mmol) en TFA al 95%/tioanisól (10 ml) durante 72 h. Entonces se añadió Et₂O (60 ml) a la mezcla de reacción y se sedimentó por centrifugación el precipitado formado. Se resuspendió el sólido residual en Et₂O, se sonicó y se sedimentó por centrifugación. Se repitió este procedimiento hasta que no pudo detectarse producto activo mediante UV en el lavado de Et₂O (mediante aplicación sobre una placa de sílice). Se secó la sal de TFA de AB-(C_λG)₂ resultante y luego se disolvió en ácido clorhídrico 1 M (10 ml), seguido por la eliminación del disolvente a presión reducida. Se repitió este procedimiento dos veces antes de secarse el sólido a vacío durante 72 h para dar la sal de HCl de AB-(C_λG)₂ como un polvo blanquecino con rendimiento cuantitativo.

Ejemplo 2

Autoensamblaje de nanotubos de roseta (RNT) en agua

Se prepararon disoluciones madre (1 mg/ml) de RNT ensamblados a partir de bases dobles funcionalizadas AB-(C_λG)₂ y KRSR-(C_λG)₂ (denominadas AB-RNT^t y KRSR-RNT^t respectivamente) disolviendo los motivos (AB-(C_λG)₂) correspondientes aislados como sal o bien de TFA o bien de HCl) en agua desionizada (dH₂O). Entonces se diluyeron las disoluciones madre para dar disoluciones 0,1 mg/ml y 0,01 mg/ml para fines de comparación. Se prepararon RGD-C_λG y K-C_λG tal como se notificó previamente [véase Fenniri *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 2001;123:3854-3855 y Zhang *et al.*, Biomaterials 2009;30(7):1309-1320]. K-RNT^m (comparativo) se refieren a RNT ensamblados a partir de la monobase funcionalizada K-C_λG. K⁹⁹/RGD¹-RNT^m (comparativo) y K⁹⁵/RGD⁵-RNT- (comparativo) se refieren a RNT ensamblados conjuntamente a partir de las monobases K-C_λG y RGD-C_λG en una

razón molar del 99% y el 95%, respectivamente. Se filtraron todas las disoluciones de RNT a través de un filtro de jeringa de 0,22 μm .

Ejemplo 3

Caracterización de KRSR-(G \wedge C) y AB-(G \wedge C)₂

Se caracterizaron KRSR-(C \wedge G)₂, AB-(C \wedge G)₂ y todas las moléculas intermedias que conducen a los mismos mediante espectroscopía de ¹H/¹³C-RMN, espectrometría de masas con ionización por electropulverización de alta resolución (EI-EMAR), y análisis elemental. Se registraron los espectros de ¹H/¹³C con el disolvente como referencia interna en espectrómetros de RMN Inova de Varian (de 500 o 600 MHz) en el Instituto Nacional de Nanotecnología de Canadá o el Departamento de Química, Universidad de Alberta. Se presentan los datos de RMN de la siguiente manera: desplazamiento químico, asignación de pico, multiplicidad, constante de acoplamiento e integración. Se obtuvieron los espectros de masas del Laboratorio de Espectrometría de Masas en el Departamento de Química, Universidad de Alberta. En las tablas 1 y 2 a continuación se resumen estos datos.

Tabla 1. Datos de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, EMAR y análisis elemental de TB-KRSR

Datos de caracterización de TB-KRSR	
¹ H-RMN (DMSO; 600 MHz)	12,34 (sa, 2H), 9,24 (sa, 2H), 9,06 (sa, 2H), 8,97 (m, 1H), 8,26 (m, 2H), 8,13 (m, 2H), 8,08-7,98 (m, 2H), 7,65 (sa, 3H), 7,54-7,50 (m, 2H), 7,39-7,16 (sa, 4H), 7,10-6,65 (sa, 4H), 4,43 (m, 4H), 4,35-4,27 (m, 3H), 4,12 (m, 1H), 3,62 (m, 1H), 3,59-3,47 (m, 4H), 3,33 (m, 1H), 3,08 (sa, 5H), 2,91 (d, 6H, J= 4,2 Hz), 2,74 (m, 4H), 2,34-2,23 (m, 2H), 1,90-1,86 (m, 2H), 1,77-1,64 (m, 2H), 1,60-1,43 (m, 8H), 1,34-1,27 (m, 2H)
¹³ C-RMN (DMSO; 150 MHz)	174,9, 174,1, 173,7, 172,0, 171,9, 170,4, 169,8, 162,6, 161,7, 160,3, 157,2, 156,7, 156,0, 148,6, 128,9, 128,7, 83,0, 82,2, 62,2, 55,4, 52,6, 52,5, 52,2, 52,0, 49,5, 40,9, 39,2, 39,1, 31,0, 30,7, 29,8, 29,5, 28,3, 27,1, 27,0, 25,4, 25,3, 22,9
EMAR	Masa calculada para C ₄₃ H ₇₁ N ₂₄ O ₁₁ [M+H] ⁺ 1099,5729; hallada 1099,5727
Análisis elemental	Calculado para (C ₄₃ H ₇₀ N ₂₄ O ₁₁)(TFA) ₅ (H ₂ O) ₃ (H ₂ SO ₄) _{1,5} (Et ₂ O) = C (35,22), H (4,82), N (17,30), S (2,47); hallado: C (35,20), H (4,71), N (17,25), S (2,49)

Tabla 2. Datos de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, EMAR y análisis elemental de TBL y productos intermedios

Datos de caracterización de TBL y productos intermedios	
Monómero 3	R _f = 0,25 (MeOH al 10% en EtOAc); ¹ H-RMN (CDCl ₃ , 500 MHz) (ppm) 7,44-7,32 (m, 5H), 5,56 (s, 2H), 4,75 (sa, 1H), 4,50 (t, 2H, J = 6,3 Hz), 3,46 (s, 3H), 3,07 (t ap., 4H, J = 6,0 Hz), 2,73 (t, 2H, J = 6,9 Hz), 1,58 (s, 9H), 1,54-1,44 (m, 4H), 1,42 (s, 9H), 1,33 (s, 18H); ¹³ C-RMN (CDCl ₃ , 125 MHz) (ppm) 165,8, 161,2, 160,9, 160,5, 156,0, 155,9, 152,6, 149,3, 134,9, 128,6, 128,5, 128,3, 93,1, 83,8, 83,3, 70,1, 50,0, 47,0, 42,6, 40,2, 34,9, 28,4, 28,1, 27,8, 27,6, 26,3; EMAR calculado para C ₄₀ H ₆₁ N ₈ O ₁₀ [M] ⁺ 813,4505, hallado 813,4507.
Dímero 4	R _f = 0,26 (EtOAc al 50% en hexanos); ¹ H-RMN (CDCl ₃ , 500 MHz) (ppm) 7,46-7,33 (m, 10H), 5,57 (s, 4H), 4,87 (sa, 1H), 4,39 (t, 4H, J = 7,2 Hz), 3,48 (s, 6H), 3,06 (m, 2H), 2,90 (t, 4H, J = 7,3 Hz), 2,67 (m, 2H), 1,56 (s, 18H), 1,41 (s, 14H), 1,31 (s, 36H); ¹³ C-RMN (CDCl ₃ , 125 MHz) (ppm) 165,7, 161,2, 161,1, 160,3, 156,1, 155,6, 152,6, 149,3, 135,0, 128,6, 128,5, 127,8, 114,0, 92,9, 83,7, 82,9, 78,8, 70,1, 53,9, 50,9, 41,3, 40,5, 35,0, 29,7, 28,5, 28,1, 27,9, 25,1; EMAR calculado para C ₇₁ H ₁₀₀ N ₁₄ O ₁₈ Na [M+Na] ⁺ 1459,72377, hallado 1459,72376.
TBL	p.f. = 296-301°C (descomposición); ¹ H-RMN (DMSO, 600 MHz) (ppm) 12,32 (s, = 296-301°C (descomposición); ¹ H-RMN (DMSO, 600 MHz) (ppm) 12,32 (2H), 9,15 (s, 2H), 8,90 (s, 2H), 8,57 (q ap., 2 H, J = 4,8 Hz), 8,11 (sa, 3H), 4,45 (sa, 2H), 3,46 (sa, 3H), 3,30 (sa, 4H), 2,95 (d, 6H, J = 4,7 Hz), 2,81-2,75 (m, 2H), 1,85-1,75 (m, 2H), 1,70-1,58 (m, 2H); ¹³ C-RMN (DMSO, 100 MHz) (ppm) 160,3, 159,6, 155,9, 155,6, 147,6, 82,4, 51,2, 48,3, 37,8, 36,0, 27,7, 23,8, 19,7; EMAR calculado para C ₂₂ H ₃₃ N ₁₄ O ₄ [M+H] ⁺ 557,2804, hallado 557,2803; Análisis elemental calculado para C ₂₂ H ₃₂ N ₁₄ O ₄ (HCl) ₄ (H ₂ O) _{1,5} C, 36,22, H, 5,39, N, 26,88, hallado C, 36,31, H, 5,35, N, 26,44.

Se utilizó la obtención de imágenes mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) para caracterizar las diversas morfologías de RNT de monobase y bases dobles. Tal como se describió previamente [véase Zhang *et al.*, J. Org. Chem. 1972;37(22):3404-3409], se hicieron flotar rejillas de cobre de 400 de malla recubiertas con carbono (EM Sciences, PA) sobre una gota de dH₂O de cada RNT (0,1 mg/ml o 0,01 mg/ml) durante 2 min para adsorber los RNT. Se colocaron entonces las rejillas sobre una gota de dH₂O durante 20 s para retirar los RNT no adherentes en exceso antes de colocarse sobre una segunda gota de acetato de uranilo acuoso al 2% durante 20 s para teñir negativamente los RNT. Entonces se secaron las rejillas con papel de filtro y se obtuvieron imágenes en un

instrumento EM410 de Phillips con una tensión de aceleración de 120 kV. También se obtuvieron imágenes del péptido KR₅SR (no acoplado a la base C \wedge G) como experimento de control.

Independientemente de las cadenas laterales en el motivo C \wedge G, todos los RNT resultantes mostraron nanoestructuras de alta relación de aspecto (figura 3). Las imágenes de TEM revelaron un mayor diámetro ($4,4 \pm 0,2$ nm) para KR₅SR-RNT^t (figuras 3A a B) en comparación con AB-RNT^t ($3,5 \pm 0,2$ nm) (figuras 3C a D) debido al resto KR₅SR más voluminoso unido a la periferia de las bases dobles. KRNT^m (comparativo) y K⁹⁵/RGD⁵-RNT^m (comparativo) (figuras 3E a F) presentaron un diámetro de $3,4 \pm 0,3$ nm. Tal como se esperaba, la muestra de control con péptido KR₅SR no mostró ninguna morfología 1D (figura 3G).

Para la obtención de imágenes mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), se disolvieron bases dobles (0,5 mg/ml) en dH₂O mediante sonicación a temperatura ambiente durante ~2 min. Se filtraron las disoluciones sobre una membrana filtrante Whatmann de 0,25 μ m, se calentaron hasta ebullición (para promover el autoensamblaje), y se envejecieron durante 1 día. Se diluyeron las disoluciones hasta 0,025 mg/ml con dH₂O antes de la obtención de imágenes. Se prepararon muestras para SEM haciendo flotar una rejilla de cobre de 400 de malla recubierta con carbono sobre una gota de la disolución de RNT diluida durante 10 s. Se secó con papel la rejilla y se hizo flotar sobre una gota de acetato de uranilo al 2% durante 10 s. Entonces se secó al aire la rejilla recubierta con RNT y se calentó sobre una placa calefactora (100°C) durante 15 min antes de la obtención de imágenes en un SEM Hitachi S-4800 de alta resolución.

Para la obtención de imágenes mediante microscopía de fuerza atómica (AFM), se depositó una gota de la disolución de RNT diluida (0,05 mg/ml) sobre un sustrato de mica recién escindido (1 cm²) durante 10 s y se secó con papel la disolución en exceso utilizando papel de filtro. Se obtuvieron imágenes de la superficie de la muestra utilizando un AFM Nanoscope IV multimodal de Digital Instruments/Veeco Instruments equipado con E scanner en modo de contacto intermitente. Se utilizaron elementos en voladizo de silicio (MikroMasch USA, Inc.) con bajas constantes elásticas de 4,5 N/m, una velocidad de exploración de 0,5⁻¹ Hz y valor de consigna de amplitud de 1 V.

Las imágenes de SEM y AFM revelaron densas redes nanotubulares tanto para KR₅SR-RNT^t como para AB-RNT^t (figura 4). La longitud promedio de KR₅SR-RNT^t era menor que la de AB-RNT^t, lo que sugiere que la voluminosidad del péptido influye en el grado de apilado y, por tanto, en la longitud de los RNT.

Ejemplo 4

Preparación de recubrimientos de RNT sobre sustratos de titanio

Se empaparon cubreobjetos de titanio (Ti) (1 cm x 1 cm x 0,05 cm) (lámina de Ti de Alfa Aesar) y de vidrio con acetona durante 15 min, se sonicaron durante 15 min en acetona, y se enjuagaron con dH₂O. Entonces se empaparon y se sonicaron en etanol al 70% y se enjuagaron con dH₂O. Por último, se empaparon y se sonicaron en dH₂O durante otros 15 min y se enjuagaron. Se sometió el vidrio a ataque químico en NaOH 1 M durante 1 h y se enjuagó meticulosamente en dH₂O. Se secaron en estufa todos los cubreobjetos de Ti y vidrio durante la noche y se trataron en autoclave para su esterilización. El día antes de la siembra de células, se recubrieron los sustratos de Ti limpiados, con las diversas disoluciones de RNT (0,01 mg/ml) y péptido KR₅SR (0,01 mg/ml) durante 45 min a temperatura ambiente. Luego se retiraron de las disoluciones y se secaron al aire durante la noche.

Ejemplo 5

Cultivo de osteoblastos, fibroblastos y células endoteliales

Se cultivó una línea celular de osteoblastos fetales humanos (ATCC, CRL-11372, VA) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen Corporation) complementado con suero bovino fetal al 10% (FBS, Hyclone, UT) y penicilina al 1%/estreptomicina (P/S, Hyclone, UT) en condiciones de cultivo celular convencionales (37°C, humidificado, el 5% de CO₂ en aire). Se utilizaron las células hasta números de población de 8-11 en los experimentos sin caracterización adicional.

Se cultivó una línea celular de fibroblastos de piel de rata (FR, ATCC, CRL-1213) en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM, ATCC 30-2003) complementado con FBS al 10% en condiciones de cultivo celular convencionales. Se cultivaron células endoteliales de aorta de rata (RAEC, VEC Technologies) en medio completo MCDB-131 (VEC Technologies) en condiciones de cultivo celular convencionales. Se utilizaron los fibroblastos en números de población de 6-9 y se utilizaron las células endoteliales en números de población de 6-11 durante el cultivo. Se reemplazó el medio celular cada dos días.

Ejemplo 6

Adhesión de osteoblastos, fibroblastos y células endoteliales

Se sembraron osteoblastos, fibroblastos y células endoteliales sobre los sustratos a una densidad de 3500 células/cm² y se incubaron en el medio de cultivo celular (específicamente, DMEM complementado con FBS y P/S para osteoblastos, EMEM complementado con FBS para fibroblastos y medio completo MCDB-131 para células endoteliales) durante 4 h. Entonces, se enjuagaron los sustratos tres veces con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) para retirar las células no adherentes. Se fijaron las células restantes utilizando formaldehído tamponado normal al 10% (Fisher Scientific) durante 10 min y Triton X-100 al 0,1% (Sigma-Aldrich, MO) durante 5 min. Entonces se tiñeron las células con rodamina-faloídina (que tiñen filamentos de actina F, Molecular Probes) para examinar la extensión celular y se tiñeron además con DAPI (Invitrogen). Se observaron las células utilizando un microscopio de fluorescencia (Axiovert 200M, Zeiss) y se obtuvieron imágenes de cinco zonas diferentes de cada muestra. Entonces se determinó la densidad celular mediante recuento de las células utilizando el instrumento Image Pro Analyzer. Se ejecutaron todos los experimentos celulares por triplicado y se repitieron tres veces para cada sustrato.

Se presentan los datos como el valor medio \pm el error estándar de la media y se analizaron con una prueba de la t de Student para realizar comparaciones por parejas. Se consideró significación estadística a $p < 0,1$.

Ejemplo 7

Mayor adhesión de osteoblastos sobre el sustrato recubierto que sobre el sustrato no recubierto

Todos los RNT recubiertos sobre Ti potenciaron significativamente la adhesión de osteoblastos en comparación con Ti no recubierto después de 4 h ($p < 0,01$) (figura 5). El nanotubo KR⁹⁹SR-RNT^t mejoró enormemente la adhesión de osteoblastos con relación a K-RNT^m (comparativo), AB-RNT^t y Ti no recubierto. En comparación con Ti no recubierto, Ti recubierto con KR⁹⁹SK-RNT^t y K⁹⁵/RGD⁵-RNT^m 0,01 mg/ml (comparativo) mejoró la adhesión de osteoblastos en el 122% y el 124% respectivamente. De hecho, KR⁹⁹SR-RNT^t y K⁹⁵/RGD⁵-RNT^m (comparativo) promovieron las mayores densidades de osteoblastos sobre Ti. Además, el péptido KR⁹⁹SR solo sobre Ti promovió más adhesión celular de osteoblastos con relación a Ti no recubierto. No hubo una diferencia estadísticamente significativa entre AB-RNT^t, K⁹⁹/RGD¹-RNT^m (comparativo) y K-RNT^m (comparativo).

Además, se adhirieron más osteoblastos a Ti cuando se recubrió este último con KR⁹⁹SR-RNT^t frente a KR⁹⁹SR. Específicamente, la adhesión de osteoblastos sobre Ti recubierto con KR⁹⁹SR-RNT^t fue un 84,4% mayor que en Ti recubierto con el péptido KR⁹⁹SR solo. Adicionalmente, se extendieron mejor los osteoblastos con filopodios más extendidos sobre Ti recubierto con RNT que sobre Ti no recubierto (figura 6).

Ejemplo 8

Los sustratos recubiertos no aumentaron la adhesión de fibroblastos

En comparación con Ti no recubierto, KR⁹⁹SR-RNT^t, K⁹⁹/RGD¹-RNT^m, K-RNT^m y AB-RNT^t no alteraron la adhesión de fibroblastos después de 4 h (figura 7). Se ensambló AB-RNT^t a partir de las sales de HCl y TFA de AB-(C \wedge G)₂. Las diferencias en la unión de fibroblastos con estos dos tipos de RNT pueden estar asociadas con sus diferentes contraiones. En contraposición con su efecto sobre la adhesión de osteoblastos, el péptido KR⁹⁹SR no potenció la adhesión de fibroblastos sobre Ti. Según un aspecto de la presente invención, un nanotubo que incorpora KR⁹⁹SR proporciona selectividad celular y utilidad en aplicaciones ortopédicas. Finalmente, fueron visibles muchas extensiones de filopodios pequeños desde fibroblastos redondeados sobre todos los sustratos, indicando que los fibroblastos se extienden independientemente de los recubrimientos de Ti (figura 8).

Ejemplo 9

Determinados RNT aumentan la adhesión de células endoteliales

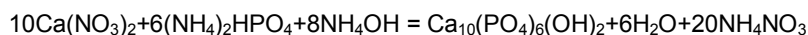
Tal como se muestra en la figura 9, se logró una densidad endotelial significativamente mayor sobre Ti recubierto con RNT (excepto para KR⁹⁹SR-RNT^t) en comparación con Ti no recubierto después de 4 h. Además, Ti recubierto con AB-RNT^t (HCl) promovió la mayor adhesión de células endoteliales en comparación con el resto de los sustratos. Además, se unieron más células endoteliales sobre Ti recubierto con K-RNT^m (comparativo) y AB-RNT^t (HCl) que sobre Ti recubierto con KR⁹⁹SR-RNT^t. Ti recubierto con KR⁹⁹SR-RNT^t y péptido KR⁹⁹SR no potenció la adhesión de células endoteliales. Según un aspecto de la presente invención, los nanotubos que incorporan KR⁹⁹SR promueven selectivamente la adhesión de osteoblastos. Se mostraron las morfologías de extensión de células endoteliales en la figura 10. La figura 10 muestra excelentes propiedades de citocompatibilidad de K-RNT^m (comparativo) y RGD-RNT^m (comparativo) para la adhesión de células endoteliales y la selectividad de KR⁹⁹SR-RNT^t sólo para la adhesión de osteoblastos. Por consiguiente, una película delgada de recubrimientos de RNT nanoestructurados con numerosas cadenas laterales de K o RGD altera la química de superficie y la rugosidad de superficie de Ti convencional para proporcionar un entorno favorable para potenciar la adhesión de células endoteliales. Según un aspecto de la presente invención, se forma un nanotubo que incluye cadenas laterales de K o RDG que promueven la adhesión de células endoteliales y el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en hueso formado alrededor de un implante ortopédico. El nanotubo también puede incluir cadenas laterales de KR⁹⁹SR que promueven la adhesión de

osteoblastos. Un nanotubo con una combinación de cadenas laterales de K, RDG y KRSR promueve la adhesión selectiva de osteoblastos y células endoteliales que conduce a la formación de nuevo tejido óseo útil en aplicaciones ortopédicas.

5 **Ejemplo 10**

Síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita

10 Se sintetizaron nanopartículas de hidroxiapatita (HA) mediante agitación de (NH₄)₂HPO₄ y Ca(NO₃)₂ en una disolución en NH₄OH (pH>10), siguiendo la siguiente ecuación.



15 Para una distribución de tamaño estrecha, se llevó a cabo la reacción a 4°C. En primer lugar, se añadieron 30 ml de disolución de fosfato de amonio 0,6 M a 300 ml de agua básica ajustada mediante NH₄OH (pH>10). Entonces se añadieron 30 ml de nitrato de calcio 0,6 M gota a gota a 3 ml/min. Tras agitar durante 10 min, se lavó el precipitado tres veces mediante centrifugación a 5000 rpm durante 5 min. Entonces, se trataron los precipitados de HA de manera hidrotérmica en un revestimiento de teflón a 200°C durante 20 h. Después de la etapa hidrotérmica, se lavó el precipitado con agua desionizada una vez y se puso en una estufa a 80°C durante la noche.

20 **Ejemplo 11**

Síntesis de materiales compuestos que incluyen nanotubos

25 Se prepararon materiales compuestos de nanotubos, compuestos para proporcionar resistencia mecánica y/o rugosidad de superficie y una matriz de polímero de la siguiente manera. Se inició el proceso de polimerización de los materiales compuestos con concentraciones de nanopartículas de HA variables (al 2%, al 10%, al 20%) mediante 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN) a través de sonicación o estufa a 60°C. Específicamente, se sonicó la mezcla de 5 ml de HEMA, agua desionizada y polvos de nanopartículas de HA durante 20 min, seguido por la adición de 30 moléculas de TBL 0,01 mg/ml de fórmula II en la que X es nitrógeno, R₁ es metilo, R₂ está ausente e Y está ausente e iniciador de AIBN 3 mg/ml. Finalmente, se calentaron los materiales compuestos en un sonicador o una estufa a 60°C hasta que las muestras solidificaron por completo.

35 Se compararon los tiempos de polimerización de materiales compuestos TBL/HA/pHEMA (HEMA al 100%, HA al 2%, AIBN 3 mg/ml, moléculas de TBL 0,01 mg/ml de fórmula II en la que X es nitrógeno, R₁ es metilo, R₂ está ausente e Y está ausente) mediante cuatro procedimientos de calentamiento incluyendo la estufa, baño de agua, sonicación o microondas. Entonces, se sometió a prueba el perfil de temperatura de las muestras (400 μl/tubo) utilizando sonicación (60°C, fuerza 5) y microondas (700 W, 50 s, potencia 5) utilizando un termómetro digital.

40 Tal como se muestra en la tabla 1, en comparación con la estufa y el baño de agua convencionales, la sonicación y las microondas pueden reducir el tiempo de solidificación desde más de 40 minutos hasta varios minutos debido al rápido proceso de transferencia de calor.

Procedimientos	Estufa 60°C	Baño de agua 60°C	Sonicación 60°C	Microondas
Tiempo de solidificación	> 40 min	~25-30 min	8-12 min	< 2 min

45 Tal como se muestra en la figura 11, los perfiles de temperatura de muestras mediante calentamiento por sonicación (figura 11a) o microondas (figura 11b) están en un intervalo de temperatura similar de desde 60 hasta 70°C. Para los materiales compuestos sin agua, la ventana temporal desde la fase de iniciación hasta la solidificación es muy corta (~1 min).

50 Se estudiaron las propiedades de solidificación que implicaban el tiempo y las formas finales a través de la variación de un componente (concentración de agua o iniciador de AIBN) en los materiales compuestos. Se pusieron las muestras (400 μl) en las jeringas BD y se calentaron en un sonicador con baño de agua a 60°C. Entonces, se registraron los tiempos de solidificación y las formas de inyección.

55 La figura 12 muestra los resultados del tiempo de solidificación en función de la cantidad de agua (figura 12a) y la concentración de iniciador de AIBN (figura 12b). Se amplió el tiempo de solidificación con el contenido creciente de agua o la concentración decreciente de iniciador de AIBN. Además, la combinación de una baja concentración de AIBN con un alto contenido en agua dio como resultado una resistencia mecánica reducida de los materiales compuestos y un aumento de la ventana temporal.

60 **Ejemplo 12**

Exploración mediante AFM

Para experimentos de AFM, se diluyeron los TBL del ejemplo 11 hasta 0,025 mg/ml en metanol. Se prepararon sustratos de mica limpios y se depositaron las muestras mediante recubrimiento por centrifugación de una disolución 0,05-0,25 mg/ml sobre la misma a 2000 rpm durante 20 s. Se observaron las superficies de las muestras utilizando un AFM Nanoscope IV multimodal de Digital Instruments/Veeco Instruments equipado con E scanner. Para obtener perfiles de altura optimizados en esta investigación, se utilizaron elementos en voladizo de silicio (MikroMasch USA, Inc.) con bajas constantes elásticas de 4,5 N/m en modo de contacto intermitente (TM-AFM). Para obtener una imagen clara de la superficie, se eligieron una baja velocidad de exploración (0,5-1 Hz) y valor de consigna de amplitud (1 V) durante las mediciones (Moralez *et al* 2005).

La figura 13 es una imagen de microscopía de fuerza atómica de nanotubos formados a partir de grupos de unión de bases dobles del ejemplo 11.

Ejemplo 13

Obtención de imágenes mediante SEM

En primer lugar, se recubrieron las superficies de las muestras (HEMA al 100%, AIBN 3 mg/ml, TBL 0,01 mg/ml del ejemplo 11, HA (al 2%, al 10%, al 20%)) con una capa de oro. Entonces, se estudiaron la caracterización de superficie y los tamaños de poro de materiales compuestos mediante SEM (LEO 1530-VP) a una escala de 200 nm y 100 μ m.

Tal como se muestra en la figura 14, con proporciones crecientes de HA en los materiales compuestos, se agruparon más nanopartículas de HA sobre la superficie, generando por tanto mayor nanorrugosidad. Puesto que la topografía de superficie está relacionada con la adhesión de proteínas y células, el movimiento celular, la orientación, morfología e incluso la expresión génica, la nanorrugosidad proporcionada por las nanopartículas de HA promueve la osteointegración entre el hueso y los implantes.

Tal como se muestra en la figura 15, los materiales compuestos presentan porosidad que promueve el crecimiento de tejido en y a través de los materiales compuestos implantados. Los tamaños de poro pueden ser de entre aproximadamente 1 \AA y aproximadamente 999 micrómetros de diámetro. La densidad de poros puede ser de entre aproximadamente el 0,0001% y aproximadamente el 99,9999%.

Ejemplo 14

Propiedades mecánicas

Se sometieron a prueba las propiedades de compresión y tracción siguiendo las normas ASTM, el procedimiento de prueba convencional D695-10 para propiedades de compresión de plásticos rígidos y el procedimiento de prueba convencional D638-10 para las propiedades de tracción de plásticos que se incorporan cada uno en la presente memoria como referencia en su totalidad. Se prepararon muestras de material compuesto solidificado siguiendo el procedimiento anterior. Se utilizó el sistema de pruebas mecánicas 5882 de Instron para someter a prueba la curva de compresión de muestras cilíndricas (12,7 mm de diámetro y 25,4 de altura) a la velocidad de 1,3 mm/min.

Tal como se muestra en la figura 16, las propiedades mecánicas de materiales compuestos incluyendo los nanotubos formados a partir de TBL del ejemplo 11 podían ajustarse con el componente de HA, y la resistencia a la compresión aumentó con la proporción en peso de HA. Los materiales compuestos con HA al 20% presentaban la mayor resistencia de 42,7 MPa, que es adecuada para aplicaciones de soporte de carga ortopédicas. Según determinados aspectos, los materiales compuestos presentan resistencias a la compresión de entre aproximadamente 0,001 MPa y aproximadamente 1000 GPa. Utilizando la obtención de imágenes mediante TEM, el tamaño de poro promedio de los materiales compuestos es de 90,1 μ m.

Ejemplo 15

Estudio bacteriano

Para pruebas bacterianas, se establecieron PMMA y pHEMA puro como grupos de control, y se incubaron tres tipos de cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*) sobre las superficies de las muestras en una placa de 96 pocillos durante 1 h a 37°C, incubador con el 5% de CO₂. Después de la incubación, se enjuagaron las muestras con agua desionizada, siguiendo el ensayo de proliferación bacteriana durante 3 h.

Tal como se muestra en la figura 17, en el estudio bacteriano, en comparación con muestras de PMMA y pHEMA puro, la adición de nanotubos de TBL formados a partir de los TBL del ejemplo 11 y nanopartículas de HA no alteró la adhesión de bacterias. Tampoco hay una diferencia discernible entre los grupos pHEMA, TBL, HA o PMMA.

Ejemplo 16Degradación

5 Se preparó el 100% de la disolución de HEMA con AIBN 3 mg/ml, TBL del ejemplo 11 (ninguno, 0,01 mg/ml) y nanopartículas de HA (al 2%, al 20%) como anteriormente. Se registraron los pesos de muestras solidificadas secas en primer lugar. Entonces, se pusieron 4 muestras en cada grupo en tubos de centrifuga de 50 ml con agua desionizada en un incubador a 37°C durante 7, 30 y 60 días. Después del periodo de tiempo recomendado, se secaron las muestras y se midieron de nuevo, y se calculó la pérdida de peso.

10 Tal como se muestra en la figuras 18 y 19, pruebas de degradación de 7 y 30 días indicaron pequeños porcentajes de pérdida de peso para todas las muestras. Después de 30 días, las muestras que contenían HA al 2% con moléculas de nanotubos de TBL del ejemplo 11 presentaban la mayor pérdida de peso.

Ejemplo 17Cultivos celulares

20 Se cultivó una línea celular de osteoblastos fetales humanos (ATCC, CRL-11372, VA) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen Corporation) complementado con suero bovino fetal al 10% (FBS, Hyclone, UT) y penicilina al 1%/estreptomocina (P/S, Hyclone, UT) en condiciones de cultivo celular convencionales (37°C, humidificado, el 5% de CO₂/el 95% de aire). Se utilizaron las células hasta números de población de 3 en experimentos sin caracterización adicional.

25 Para estudios de toxicidad convencionales, se cultivó una línea celular de fibroblastos de piel de rata (FR, ATCC, CRL-1213) en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM, ATCC, 30-2003) complementado con FBS al 10% en condiciones de cultivo celular convencionales. Se cultivaron células endoteliales de aorta de rata (RAEC, VEC Technologies) en medio completo MCDB-131 (VEC Technologies) en condiciones de cultivo celular convencionales. Se utilizaron los fibroblastos en números de población de 6-9. La toxicidad celular de fibroblastos y células endoteliales no se vio afectada a las concentraciones utilizadas, lo que demostró que las composiciones no eran tóxicas a diversas concentraciones.

Ejemplo 18Densidad de adhesión de osteoblastos y fibroblastos

35 Se sembraron por separado osteoblastos y fibroblastos sobre los sustratos a una densidad de 3500 células/cm² y se incubaron en el medio de cultivo celular (específicamente, DMEM complementado con FBS y P/S para osteoblastos y EMEM complementado con FBS para fibroblastos) durante 4 h. Entonces, se enjuagaron los sustratos formulados anteriormente tres veces con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) para retirar las células no adherentes. Se fijaron las células restantes utilizando formaldehído tamponado normal al 10% (Fisher Scientific) durante 10 min y Triton X-100 al 0,1% (Sigma-Aldrich, MO) durante 5 min. Entonces se tiñeron las células con rodamina-faloidina (que tiñen filamentos de actina F, Molecular Probes) para examinar la extensión celular y se tiñeron además con DAPI (Invitrogen). Se observaron las células utilizando un microscopio de fluorescencia (Axiovert 200M, Zeiss) y se obtuvieron imágenes de cinco zonas diferentes de cada muestra. Se determinó la densidad celular mediante recuento de las células utilizando el instrumento Image Pro Analyzer. Se ejecutaron todos los experimentos celulares por triplicado y se repitieron tres veces para cada sustrato.

50 La figura 20 demuestra la densidad de osteoblastos aumentada y la densidad de fibroblastos disminuida con la concentración creciente de hidroxiapatita en combinación con nanotubos formados a partir de módulos de grupo de unión de bases dobles del ejemplo 11.

Ejemplo 19Proliferación de osteoblastos

55 Se prepararon osteoblastos tal como se describió anteriormente, se sembraron aleatoriamente sobre la superficie del sustrato, y se cultivaron en condiciones de cultivo celular convencionales durante periodos de tiempo más prolongados (1, 3, y 5 días). Se evaluó la proliferación de osteoblastos midiendo la cantidad de ADN en digestos de papaína utilizando colorante Hoeschst 33258 (Sigma) y un fluoroespectrofotómetro (Milton Roy Company, Fluorospectronic). Se determinó el número de células en las muestras experimentales a partir de una curva patrón que correlacionaba la cantidad de ADN por número de células conocido (ensayo sensible hasta aproximadamente 1.000). Se notificó la proliferación en estos periodos de tiempo prolongados como la densidad celular (células por área superficial unitaria).

65 La figura 21 demuestra la proliferación de osteoblastos aumentada con contenido en hidroxiapatita creciente en

combinación con nanotubos formados a partir de módulos de grupo de unión de bases dobles del ejemplo 11.

Ejemplo 20

5 Diferenciación de osteoblastos

Se prepararon osteoblastos tal como se describió anteriormente, se sembraron aleatoriamente sobre la superficie del sustrato, y se cultivaron en condiciones de cultivo celular convencionales durante periodos de tiempo más prolongados (1, 3, y 5 días). Se evaluó la proliferación de osteoblastos midiendo la cantidad de ADN en digestos de papaína utilizando colorante Hoeschst 33258 (Sigma) y un fluoroespectrofotómetro (Milton Roy Company, Fluorospectronic). Se determinó el número de células en las muestras experimentales a partir de una curva patrón que correlacionaba la cantidad de ADN por el número de células conocido (ensayo sensible hasta aproximadamente 1.000). Se notificó la proliferación en estos periodos de tiempo prolongados como la densidad celular (células por área superficial unitaria).

15 Contenido de proteína intracelular total: Se sembraron osteoblastos (100.000 célula/cm²) sobre los sustratos y se cultivaron en DMEM completo (es decir, DMEM complementado con FBS al 10%, P/S al 1%, ascorbato 50 µg/ml (Sigma) y β-glicerofosfato 10 mM (Sigma)) en condiciones de cultivo celular convencionales durante 7, 14 y 21 días. Se reemplazaron los medios cada dos días. Al final de los periodos de tiempo recomendados, en primer lugar se enjuagaron los sustratos con solución salina tamponada con Tris (TBS; una disolución que consiste en Tris-HCl 42 mM, base de Tris 8 mM y NaCl 0,15 M ajustado a un pH de 7,4; todos los productos químicos son de Sigma) tres veces y entonces se lisaron los osteoblastos utilizando agua destilada y tres ciclos de congelación-descongelación. Se determinó de manera espectrofotométrica el contenido de proteína total en los lisados celulares utilizando un kit de reactivo de ensayo de proteína BCA (Pierce Chemical Co.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Específicamente, se incubaron 25 µl de cada lisado de muestra con 200 µl del reactivo de trabajo (que contiene sulfato cúprico y bicinonínico) a 37°C durante 30 min. Entonces, se midió la absorbancia de luz de estas muestras mediante un espectrofotómetro (SpectroMAX; Molecular Devices) a 562 nm. Se determinó la proteína intracelular total sintetizada por osteoblastos cultivados sobre los sustratos a partir de una curva patrón de la absorbancia frente a concentraciones conocidas de albúmina ejecutadas en paralelo con muestras experimentales. Se normalizó la síntesis de proteína intracelular total mediante el área superficial de sustrato.

20 Contenido de colágeno intracelular total: El colágeno es una proteína muy conocida contenida en la matriz extracelular del hueso. Para determinar estas cantidades, se prepararon lisados celulares tal como se describió anteriormente. Se añadieron 50 µl de lisados de osteoblastos por pocillo de una placa de 96 pocillos (Corning). Se permitió que se secase el colágeno sobre la placa a través de incubación a 37°C durante 16 horas y se incubó entonces a 37°C durante 24 horas en presencia de un desecante (W.A. Hamond Drierite Company LTD.). Después de eso, se enjuagó la placa de 96 pocillos tres veces con agua destilada (1 min por lavado y 200 µl por pocillo). Se dispensaron 100 µl de una tinción de rojo sirio al 0,1% (polvo de rojo sirio en ácido pícrico; Sigma) en cada pocillo y se permitió que se asentase durante una hora a temperatura ambiente. Después de eso, se lavó cada pocillo 5 veces con 200 µl de HCl 0,01 M (Sigma) durante 10 segundos por lavado. Se añadieron 200 µl de NaOH 0,1 M (Sigma) a cada pocillo y se permitió que se asentase durante 5 min. Finalmente, se mezcló la disolución en cada pocillo, se transfirió a una segunda placa y se leyó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (SpectroMAX; Molecular Devices). Se determinó el colágeno intracelular total sintetizado por osteoblastos cultivados sobre los sustratos a partir de una curva patrón de la absorbancia frente a concentraciones conocidas de colágeno ejecutadas en paralelo con muestras experimentales. Se normalizó el colágeno intracelular total mediante el área superficial de sustrato.

La figura 22 demuestra la síntesis de colágeno de osteoblastos aumentada por osteoblastos con contenido en hidroxiapatita creciente en combinación con nanotubos formados a partir de módulos de grupo de unión de bases dobles del ejemplo 11.

35 Actividad de la fosfatasa alcalina: La fosfatasa alcalina es una enzima cuya síntesis indica la diferenciación de osteoblastos de células sin deposición de calcio con respecto a con deposición de calcio. Para someter a prueba esto, se prepararon lisados celulares tal como se describió previamente y se utilizó un kit de ensayo de fosfatasa alcalina/ácida comercial (Upstate) para determinar la concentración de fosfatasa alcalina en estos lisados celulares siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar se mezclaron alícuotas de los sobrenadantes de agua destilada y se incubaron con NiCl₂ 40 mM, BSA 5 mg/ml, disolución de fosfopéptido 1 mM y tampón de ensayo de Ser/Thr Pnpp a 37°C durante 10-15 min. Entonces, se incubaron con disolución de verde de malaquita durante 15-20 min a temperatura ambiente. Se midieron los valores de absorbancia óptica mediante un espectrofotómetro (SpectroMAX; Molecular Devices) a 650 nm. Se determinó la fosfatasa alcalina sintetizada por osteoblastos cultivados sobre los sustratos a partir de una curva patrón de la absorbancia frente a concentraciones conocidas de colágeno ejecutadas en paralelo con muestras experimentales. Se normalizó la actividad de la fosfatasa alcalina mediante el área superficial de sustrato.

La figura 23 demuestra la síntesis de fosfatasa alcalina aumentada por osteoblastos con contenido en hidroxiapatita

creciente en combinación con nanotubos formados a partir de módulos de grupo de unión de bases dobles del ejemplo 11.

5 Cuantificación de calcio extracelular: Se determinó la deposición de calcio como medida de la diferenciación de osteoblastos. Después de lisarse las células tal como se describió anteriormente, se incubaron los sustratos (y los depósitos de calcio restantes sobre los mismos) con HCl 0,6 N (Sigma) a 37°C durante la noche. Se cuantificó la cantidad de calcio presente en el sobrenadante ácido utilizando un kit de cuantificación de calcio (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante; se midió la absorbancia de luz de las muestras mediante un espectrofotómetro (SpectroMAX; Molecular Devices) a 575 nm. Se calculó el calcio total (mg/dl) a partir de curvas patrón de absorbancia frente a concentraciones conocidas de calcio medidas en paralelo con las muestras experimentales. Se normalizaron los valores de concentración de calcio mediante el área superficial de sustrato.

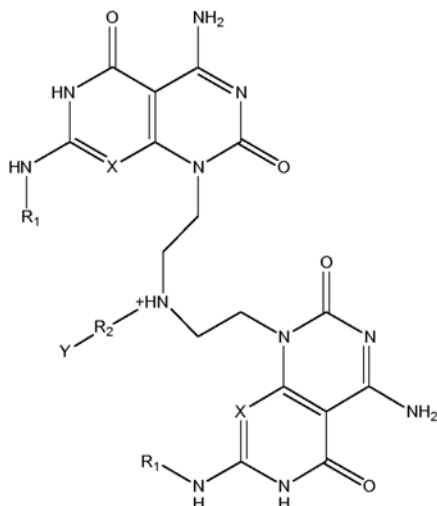
10 La figura 22 demuestra la deposición de calcio de osteoblastos aumentada por osteoblastos con contenido en hidroxiapatita creciente en combinación con nanotubos formados a partir de módulos de grupo de unión de bases dobles del ejemplo 11.

15 Debe entenderse que la utilización de un artículo indefinido o definido en singular (por ejemplo, “un(o)”, “una”, “el/la”, etc.) en esta divulgación y en las siguientes reivindicaciones sigue el enfoque tradicional en patentes de significar “por lo menos uno” a menos que en un caso particular quede claro a partir del contexto que el término pretende significar en ese caso particular específicamente uno y sólo uno. Asimismo, el término “que comprende” es abierto, sin excluir elementos, características, componentes adicionales, etc.

REIVINDICACIONES

1. Implante que presenta una composición que incluye unos nanotubos formados a partir de unos módulos que presentan la fórmula a continuación, unas nanopartículas y un material de matriz,

5



en la que X es CH o nitrógeno; Y está ausente o es un aminoácido o polipéptido; R₂ está ausente o es un grupo de unión y R₁ es un grupo alifático, para su utilización en un procedimiento para promover la diferenciación y proliferación de osteoblastos en un sitio de una lesión o defecto óseos o sitio de cirugía ósea que comprende prever la colocación del implante en el sitio de una lesión o defecto óseos o sitio de cirugía ósea.

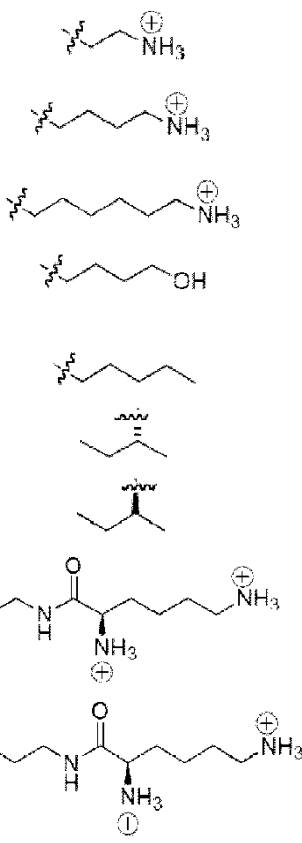
10

2. Implante para su utilización en el procedimiento según la reivindicación 1, en el que Y es lisina, arginina, serina, glicina, aspartato, lisina-arginina-serina-arginina, arginina-glicina-aspartato, isoleucina-lisina-valina-alanina-valina o tirosina-isoleucina-glicina-serina-arginina.

15

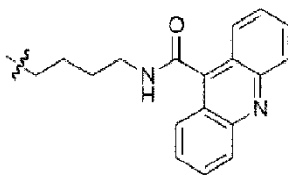
3. Implante para su utilización en el procedimiento según la reivindicación 1, en el que R₂ es NH₃⁺,

20



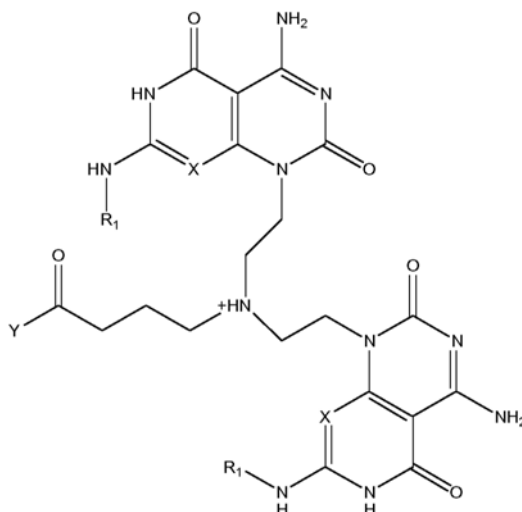
Me

25



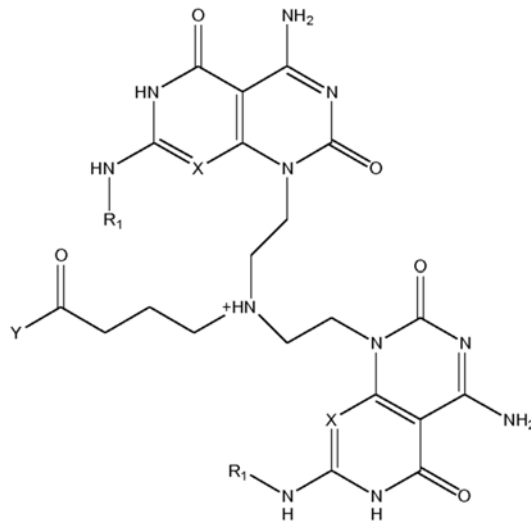
(CH₂)₃CO o (CH₂)_n, siendo n un número entero de entre 1, 2, 3 o 4.

- 5 4. Implante para su utilización en el procedimiento según la reivindicación 1, en el que R₁ es alquilo de C₁ a C₁₀, de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado.
- 5 5. Implante para su utilización en el procedimiento según la reivindicación 1, en el que las nanopartículas son unas nanopartículas de fosfato de calcio.
- 10 6. Implante para su utilización en el procedimiento según la reivindicación 1, en el que el material de matriz es uno o más de entre poli(ácido láctico), poli(lactida-co-glicolida), poli(ácido glicólico), poli(metacrilato de metilo), poliuretano, policaprolactona, polietileno, poliestireno polipropileno, polipirrol o poli(metacrilato de 2-hidroxietilo).
- 15 7. Implante para su utilización en el procedimiento según la reivindicación 1, en el que X es N, R₁ es metilo, R₂ es (CH₂)₃CO, Y es lisina-arginina-serina-arginina, las nanopartículas son nanopartículas de hidroxiapatita, y el material de matriz es poli(metacrilato de 2-hidroxietilo).
8. Compuesto, que presenta la fórmula



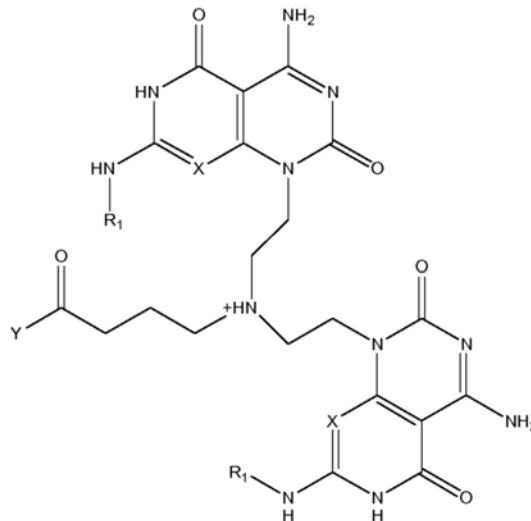
- 20 en la que X es CH o nitrógeno; Y es un aminoácido distinto de lisina o un polipéptido que presenta un grupo amino unido covalentemente a un carbono α del aminoácido y el grupo amino está unido covalentemente al grupo carbonilo; y R₁ es un grupo alifático, tal como alquilo de C₁ a C₁₀, de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado; y sales del mismo.
- 25

9. Estructura formada a partir del autoensamblaje en un medio acuoso de uno o más compuestos, que presentan la fórmula



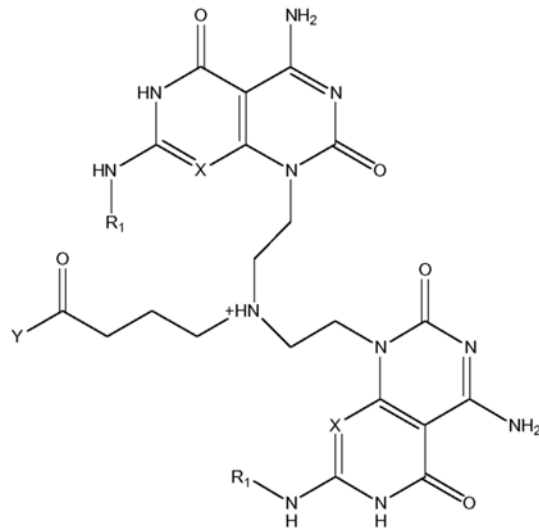
5 en la que X es CH o nitrógeno; Y es un aminoácido distinto de lisina o un polipéptido que presenta un grupo amino unido covalentemente a un carbono α del aminoácido y el grupo amino está unido covalentemente al grupo carbonilo; y R_1 es un grupo alifático, tal como alquilo de C_1 a C_{10} , de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado; y sales de los mismos.

10 10. Procedimiento de formación de un nanotubo que comprende colocar en un medio acuoso compuestos que presentan la fórmula



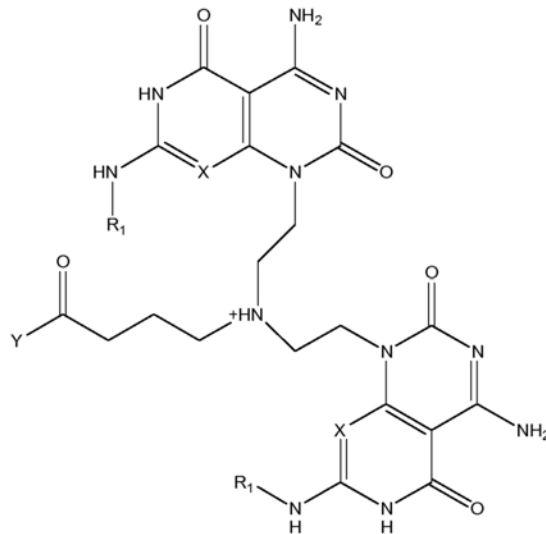
15 en la que X es CH o nitrógeno; Y es un aminoácido o un polipéptido que presenta un grupo amino unido covalentemente a un carbono α del aminoácido y el grupo amino está unido covalentemente al grupo carbonilo con la condición de que Y sea distinto de lisina en por lo menos un compuesto; y R_1 es un grupo alifático, tal como alquilo de C_1 a C_{10} , de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado; y sales de los mismos, y a una concentración suficiente para que se forme un nanotubo.

20 11. Procedimiento de obtención de un implante que comprende recubrir un implante con un nanotubo formado a partir de uno o más compuestos que presentan la fórmula



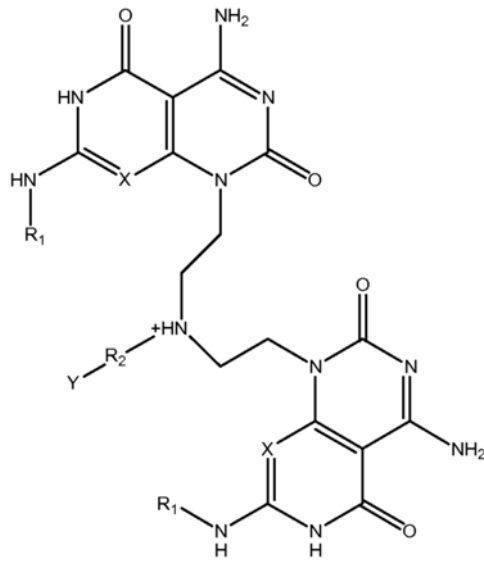
5 en la que X es CH o nitrógeno; Y es un aminoácido o polipéptido que presenta un grupo amino unido covalentemente a un carbono α del aminoácido y el grupo amino está unido covalentemente al grupo carbonilo; y R₁ es un grupo alifático, tal como alquilo de C₁ a C₁₀, de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado; y sales de los mismos.

10 12. Implante que presenta un recubrimiento de nanotubos formados a partir de uno o más compuestos que presentan la fórmula



15 en la que X es CH o nitrógeno; Y es un aminoácido o polipéptido que presenta un grupo amino unido covalentemente a un carbono α del aminoácido y el grupo amino está unido covalentemente al grupo carbonilo; y R₁ es un grupo alifático, tal como alquilo de C₁ a C₁₀, de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado; y sales de los mismos para su utilización en un procedimiento para promover el crecimiento de tejido en el sitio del implante.

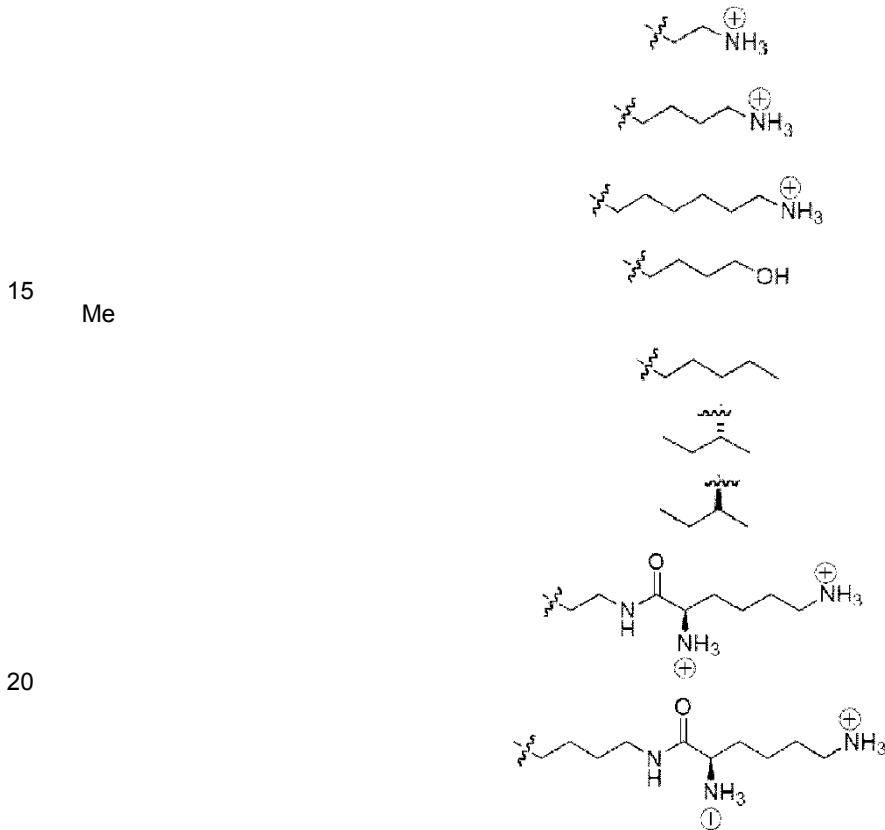
20 13. Composición que comprende unos nanotubos, un compuesto para proporcionar resistencia mecánica y una matriz, en la que los nanotubos están formados a partir de uno o más compuestos que presentan la fórmula a continuación

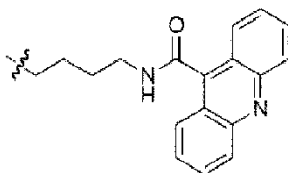


en la que X es CH o nitrógeno; Y está ausente o es un aminoácido o polipéptido; R₂ está ausente o es un grupo de unión y R₁ es un grupo alifático.

5 14. Composición según la reivindicación 13, en la que Y es lisina, arginina, serina, glicina, aspartato, lisina-arginina-serina-arginina, arginina-glicina-aspartato, isoleucina-lisina-valina-alanina-valina o tirosina-isoleucina-glicina-serina-arginina.

10 15. Composición según la reivindicación 13, en la que R₂ es NH₃⁺,





(CH₂)₃CO o (CH₂)_n, siendo n un número entero de entre 1, 2, 3 o 4.

- 5 16. Composición según la reivindicación 13, en la que R₁ es alquilo de C₁ a C₁₀, de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado.
17. Composición según la reivindicación 13, en la que el compuesto para proporcionar resistencia mecánica es una nanopartícula de fosfato de calcio.
- 10 18. Composición según la reivindicación 13, en la que el material de matriz es uno o más de entre poli(ácido láctico), poli(lactida-co-glicolida), poli(ácido glicólico), poli(metacrilato de metilo), poliuretano, policaprolactona, polietileno, poliestireno polipropileno, polipirrol o poli(metacrilato de 2-hidroxietilo).
- 15 19. Composición según la reivindicación 13, en la que X es N, R₁ es metilo, R₂ es (CH₂)₃CO, Y es lisina-arginina-serina-arginina, el compuesto para proporcionar resistencia mecánica es una nanopartícula de hidroxiapatita y el material de matriz es poli(metacrilato de 2-hidroxietilo).

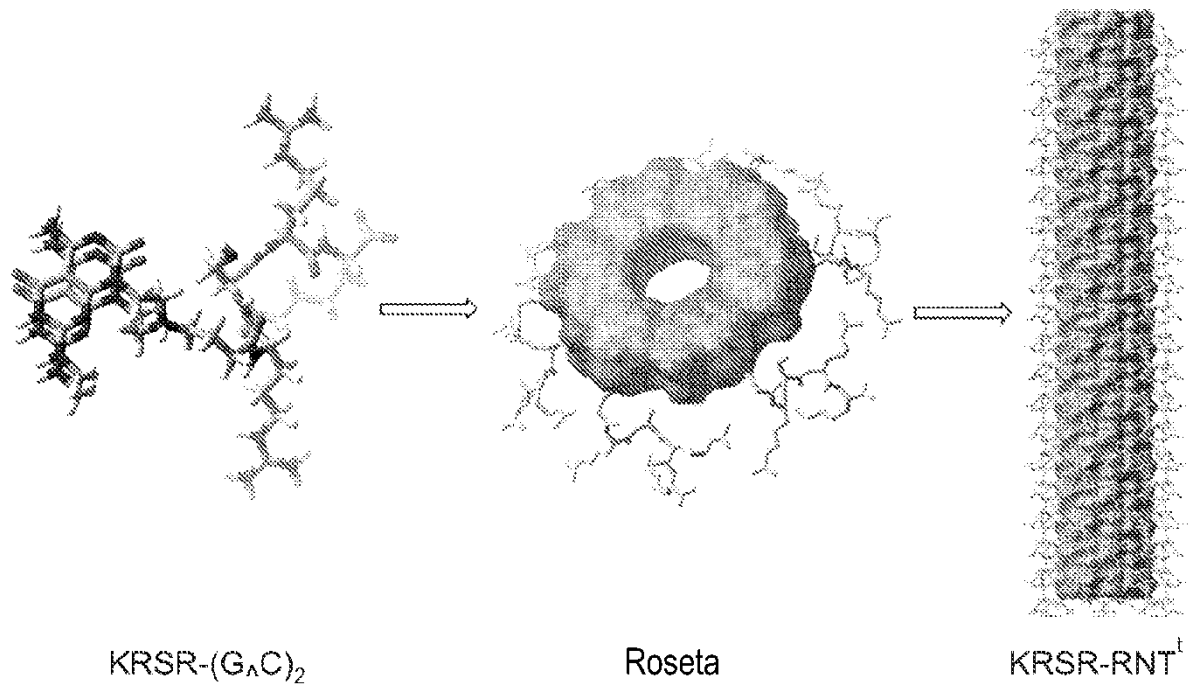


FIG. 1A

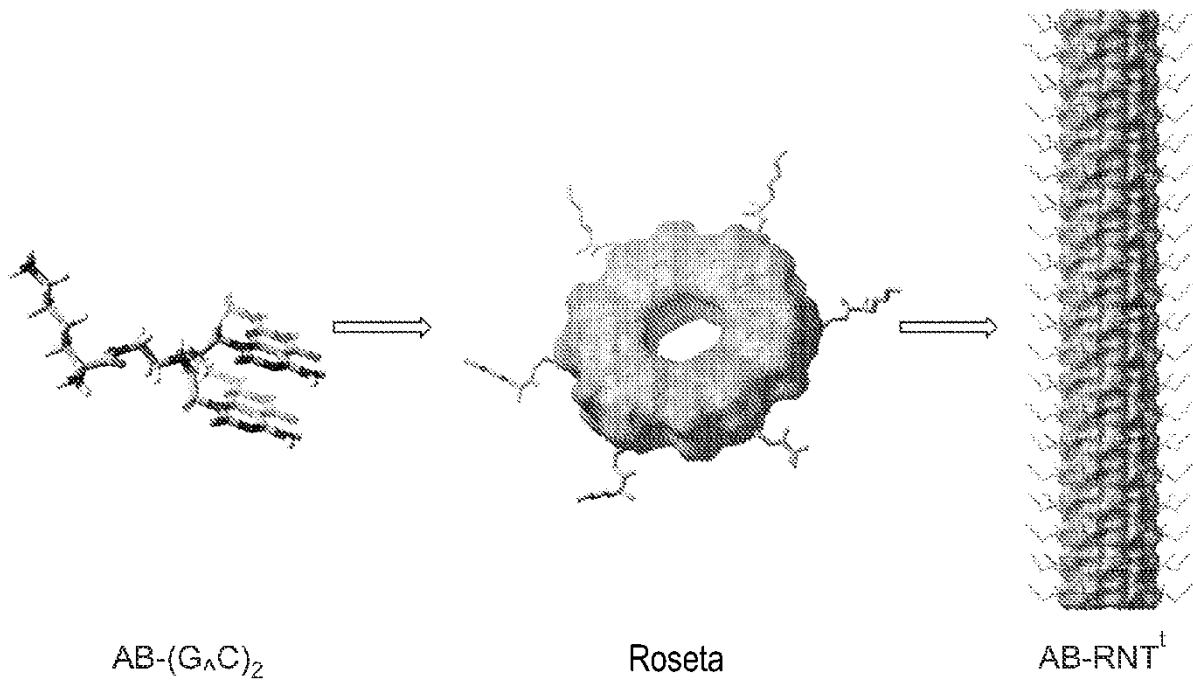


FIG. 1B

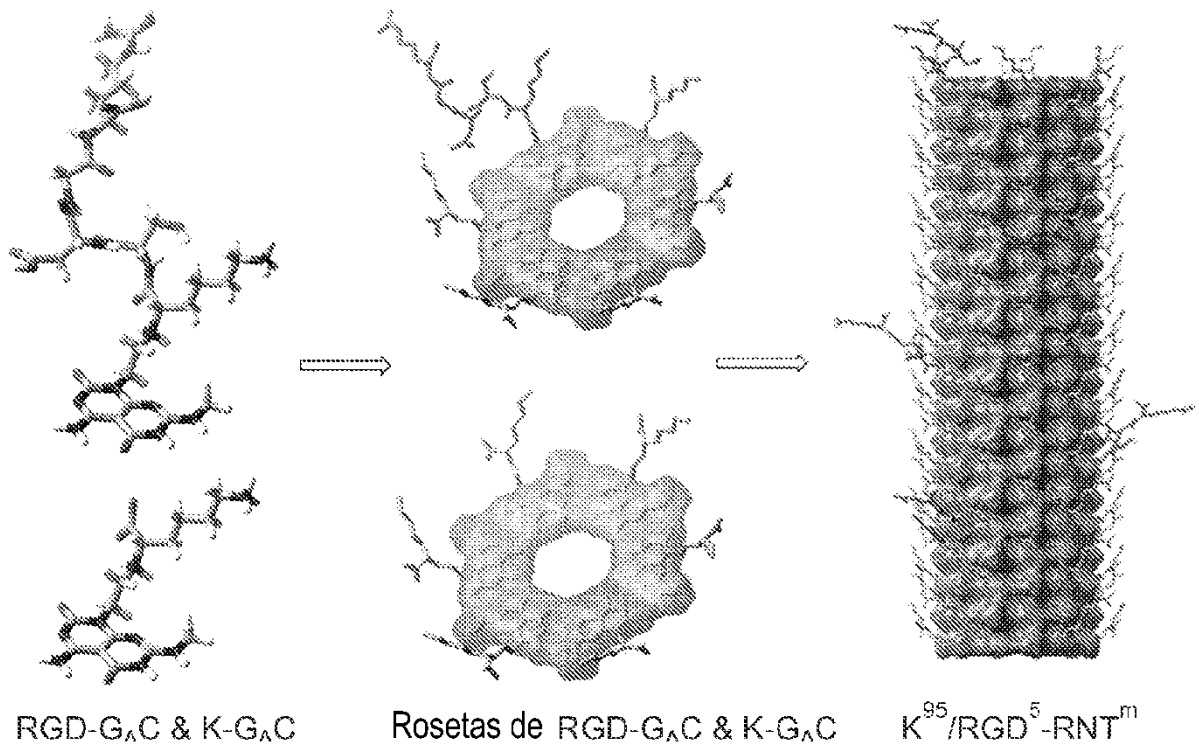


FIG. 1C

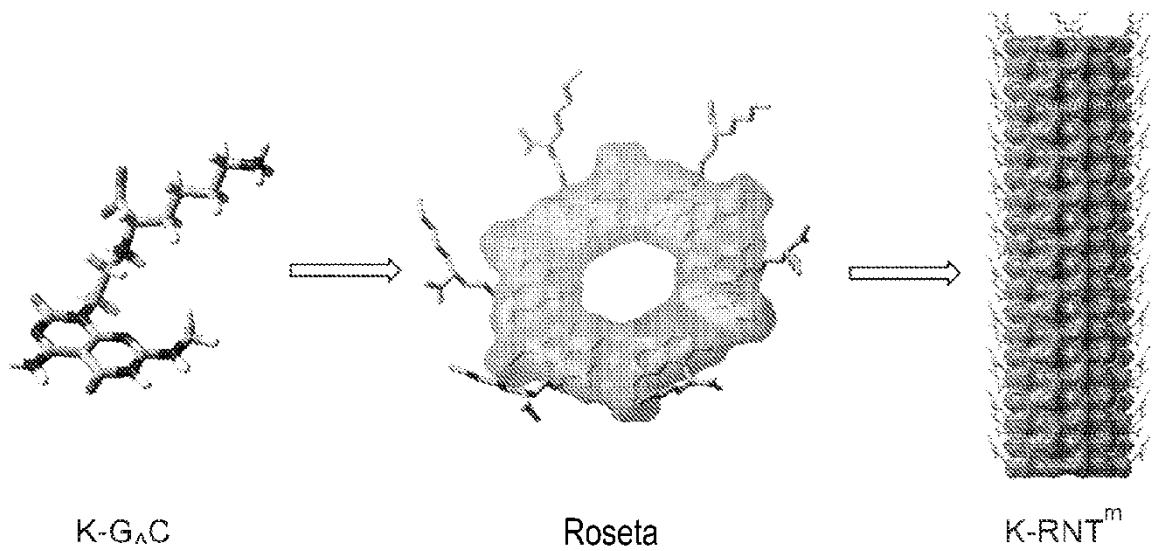


FIG. 1D

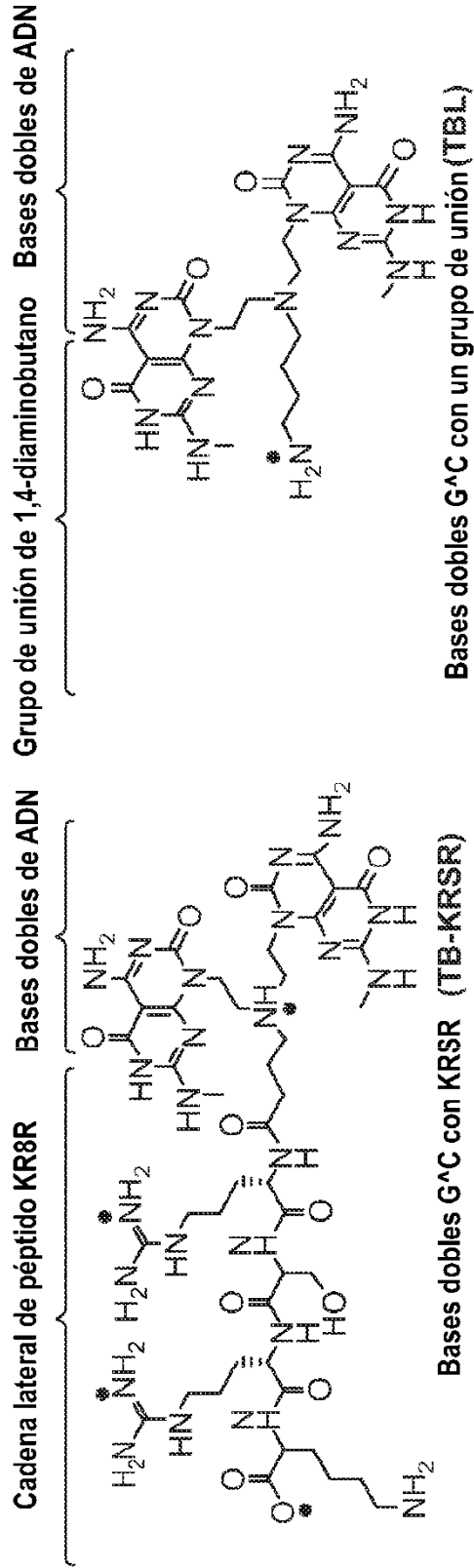


FIG. 1E

FIG. 1F

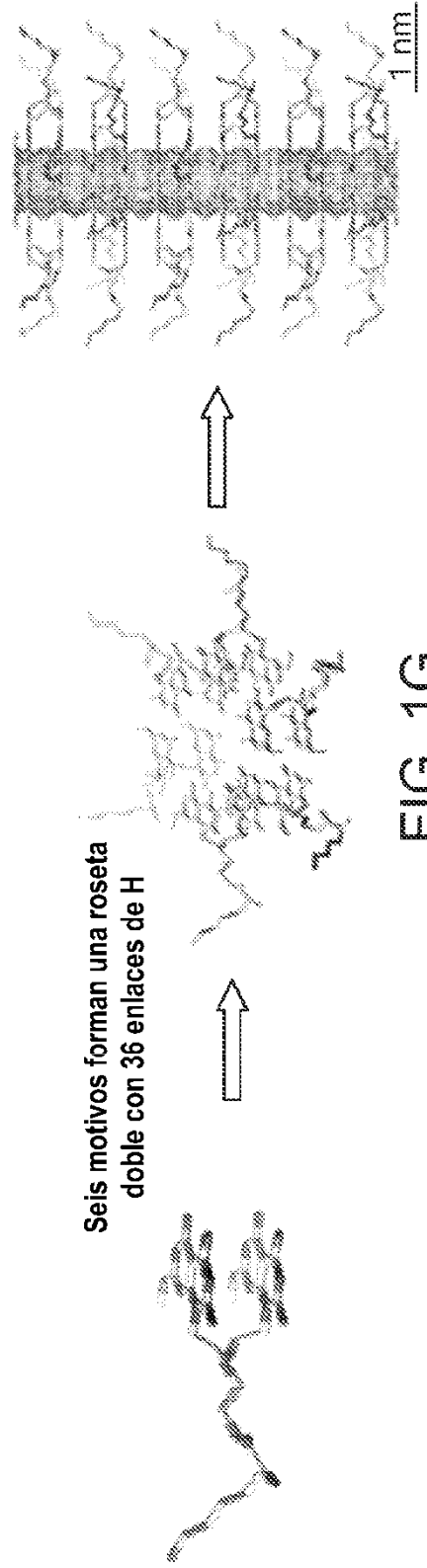


FIG. 1G

FIG. 2A-1
FIG. 2A-2
FIG. 2A-3

FIG. 2A

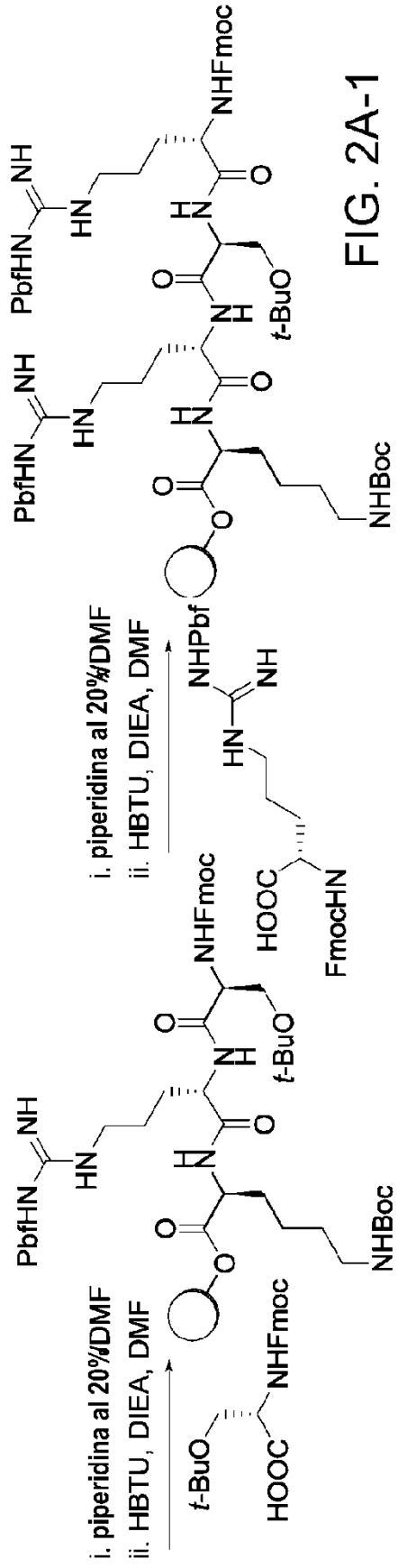
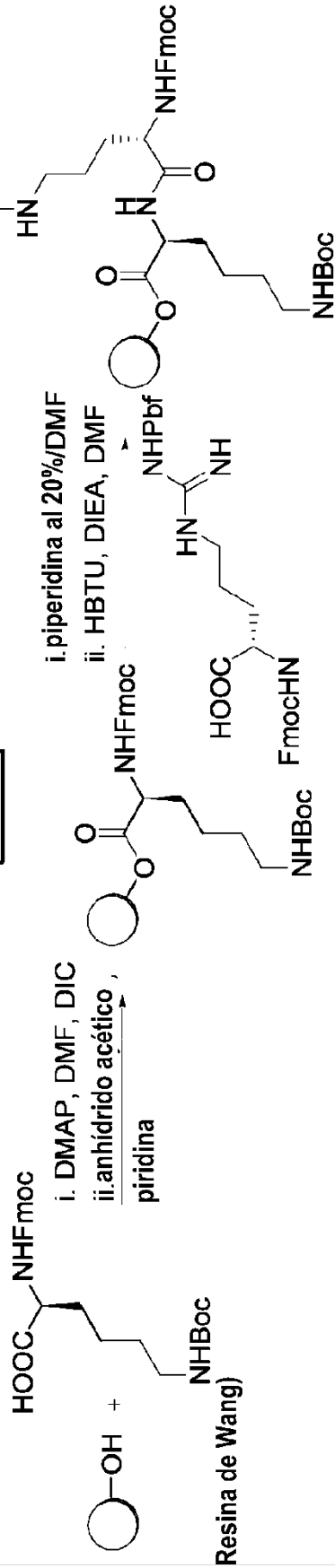


FIG. 2A-1

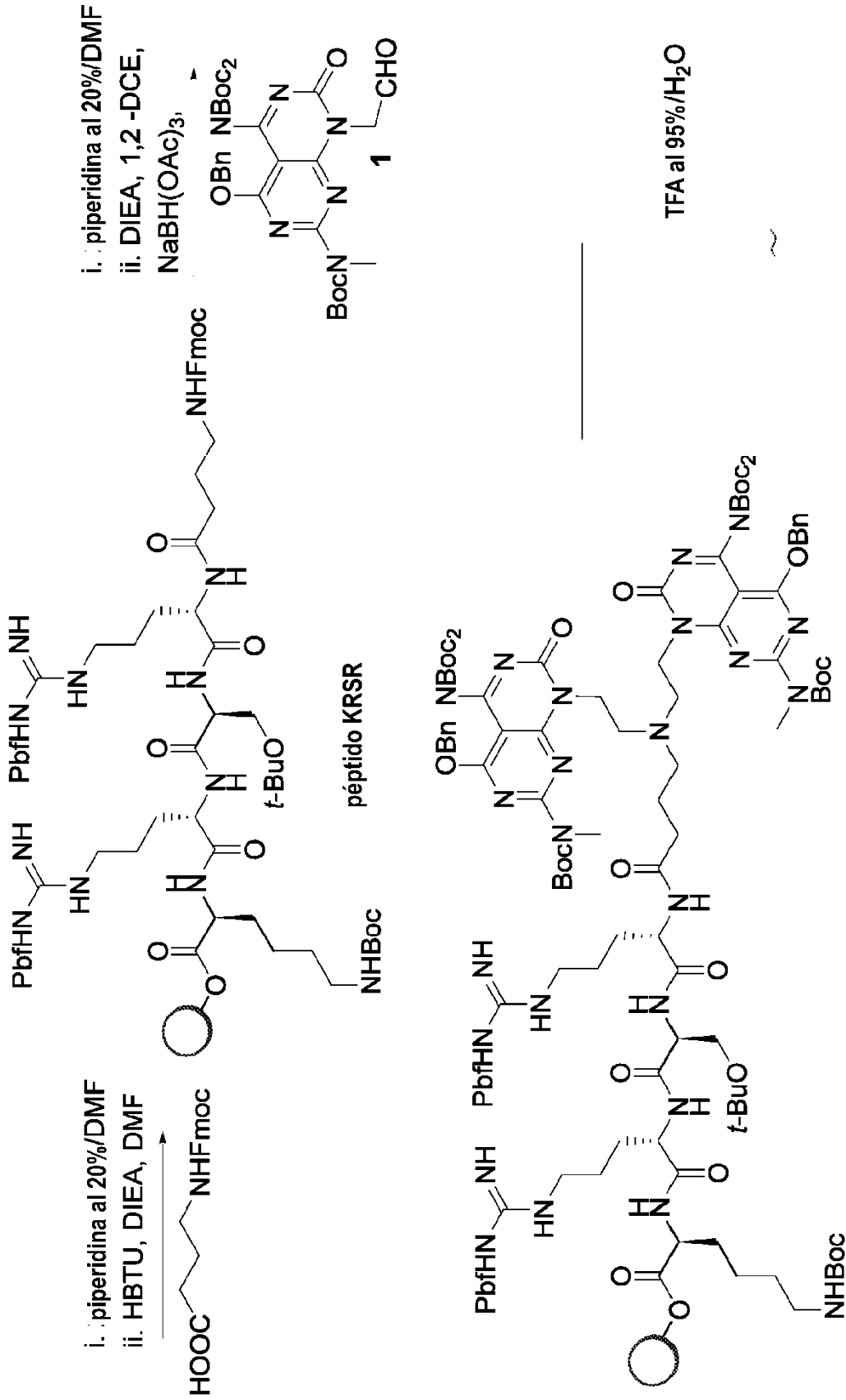


FIG. 2A-2

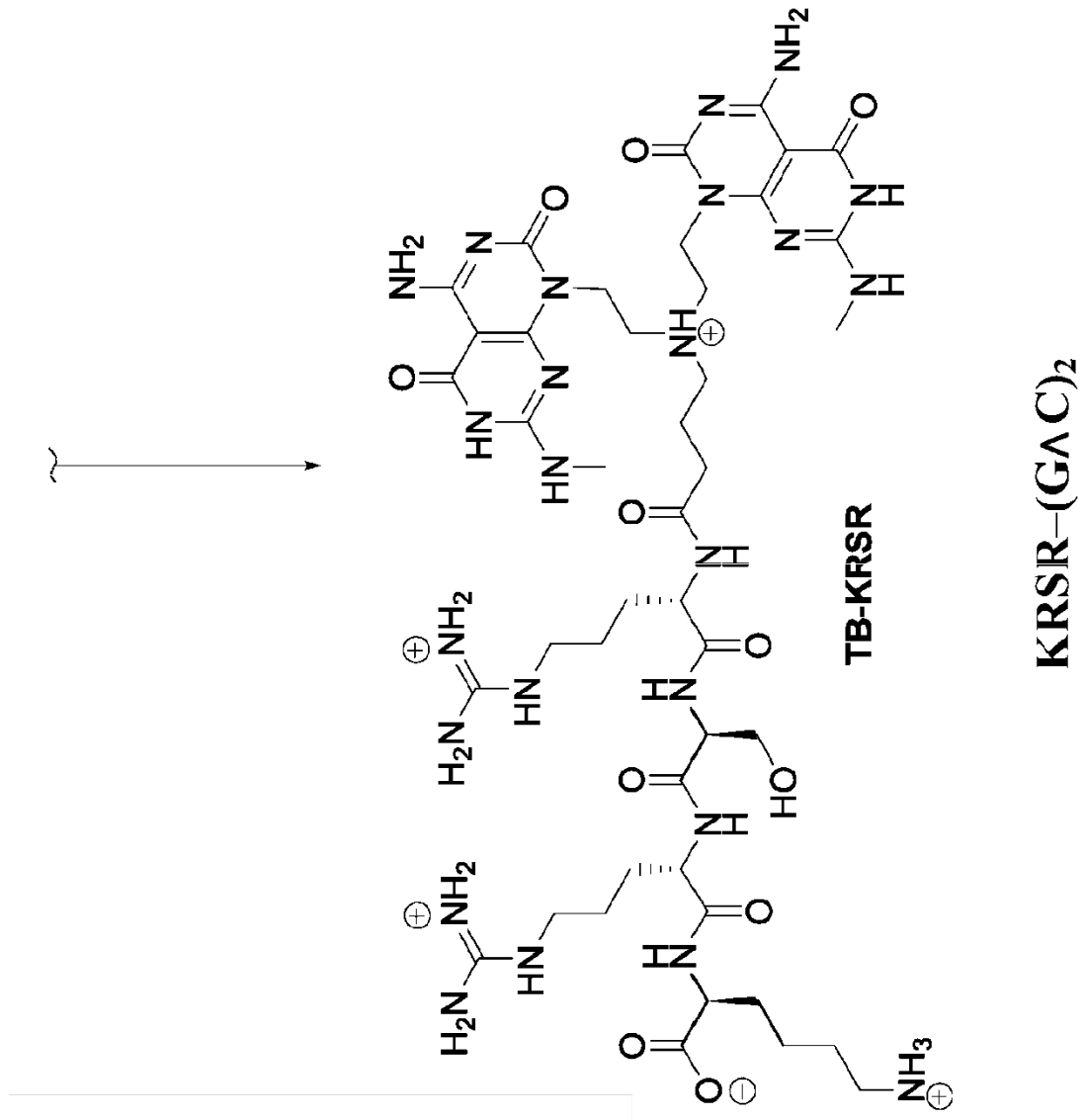


FIG. 2A-3

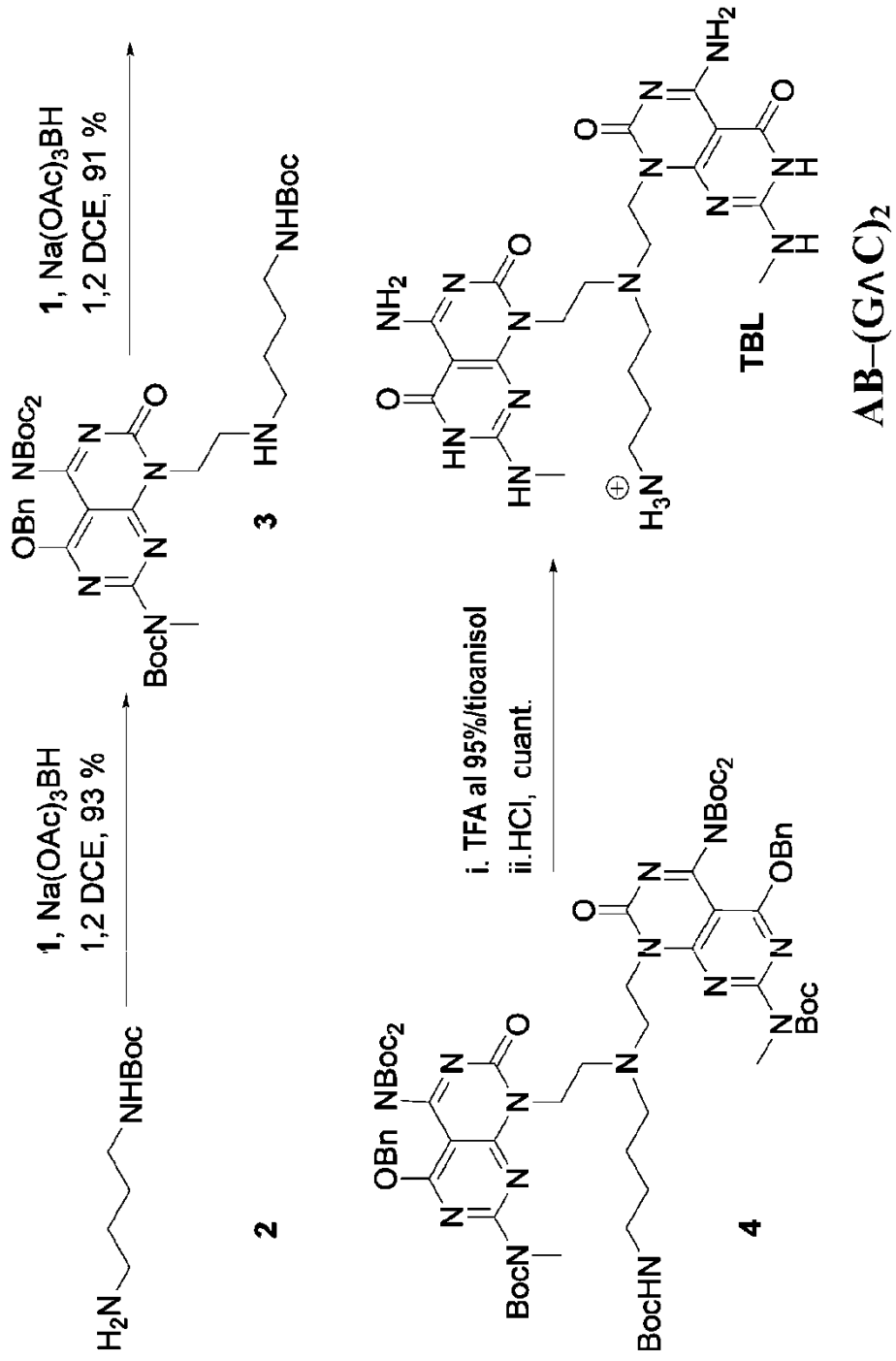


FIG. 2B

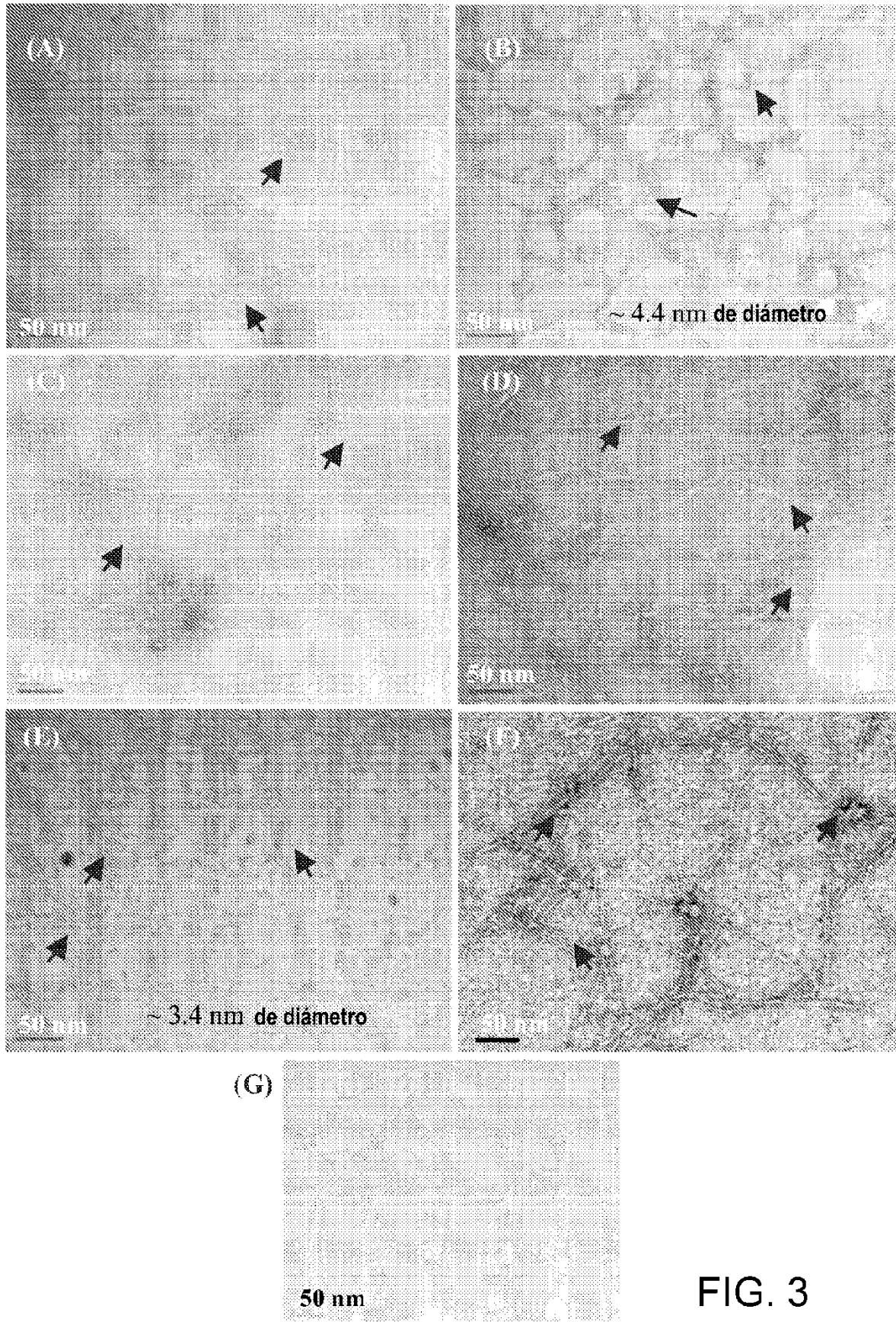


FIG. 3

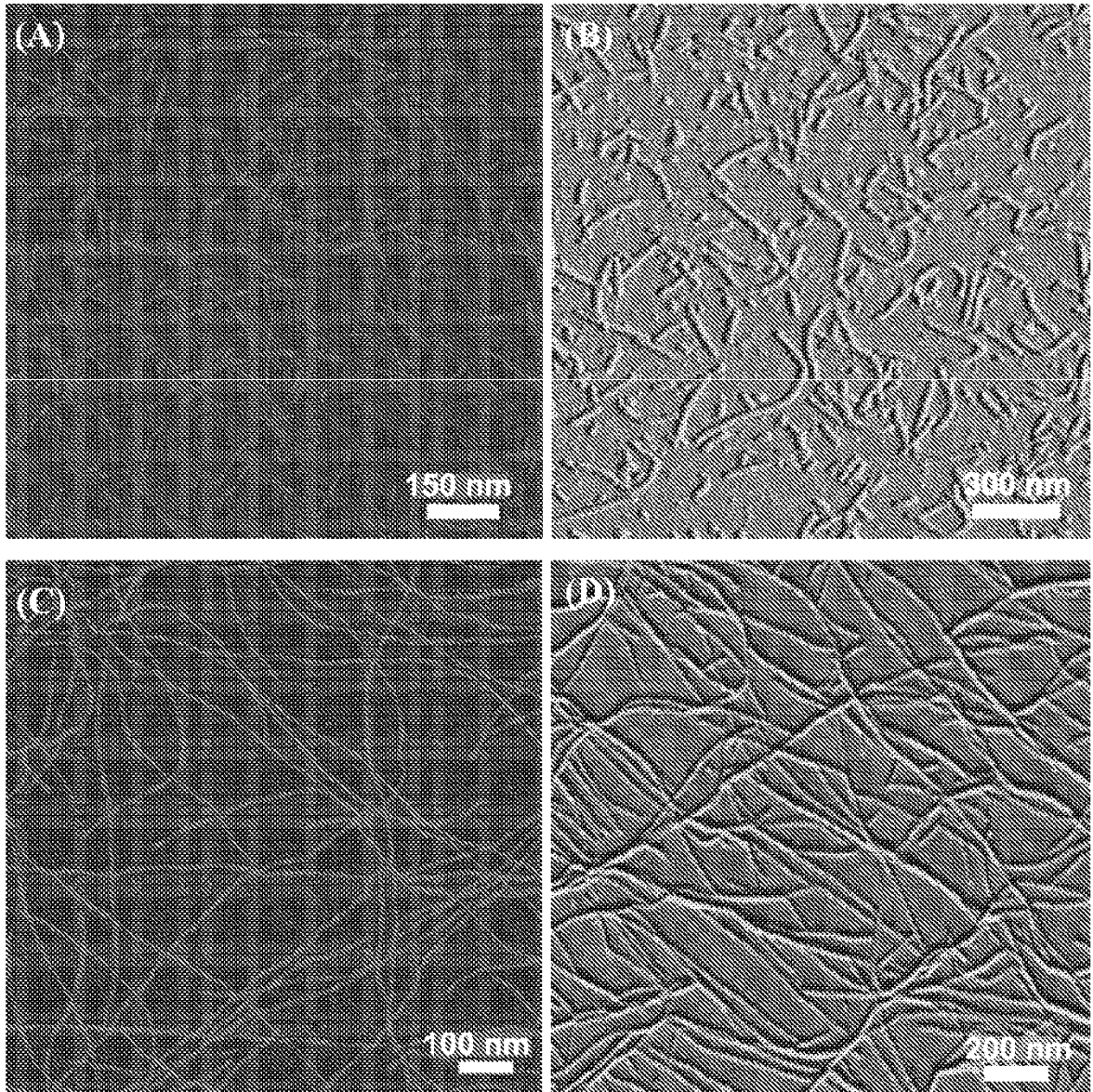


FIG. 4

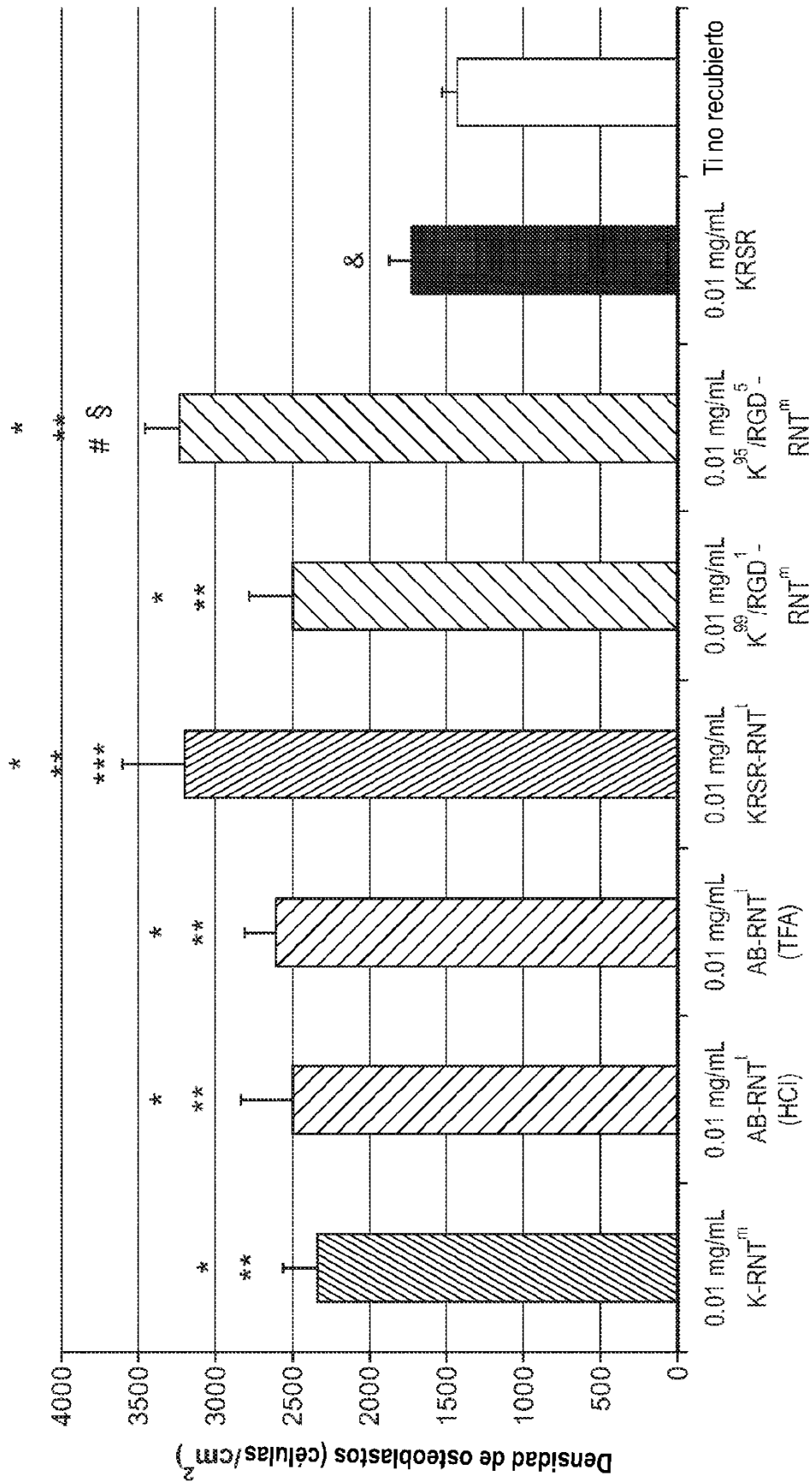


FIG. 5

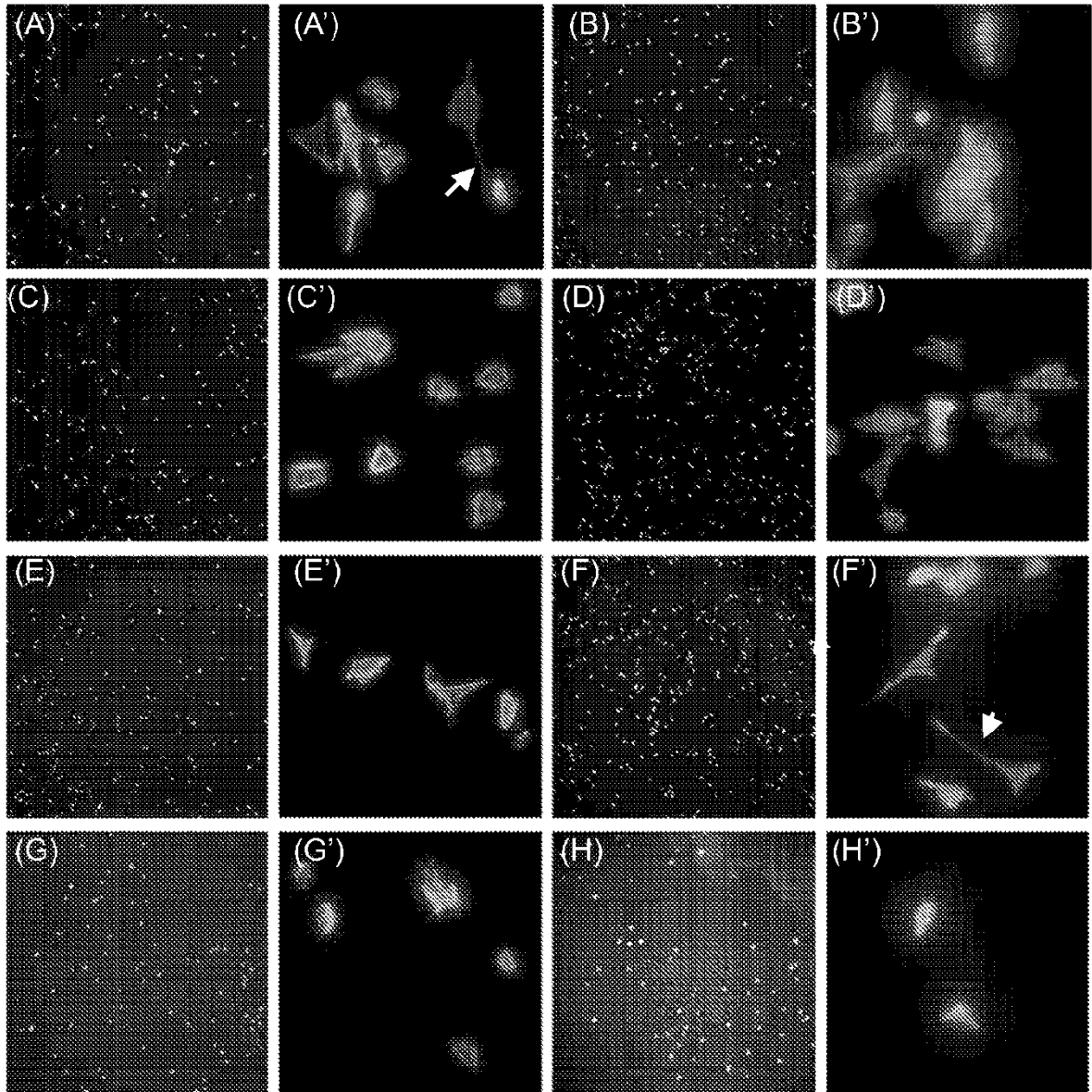


FIG. 6

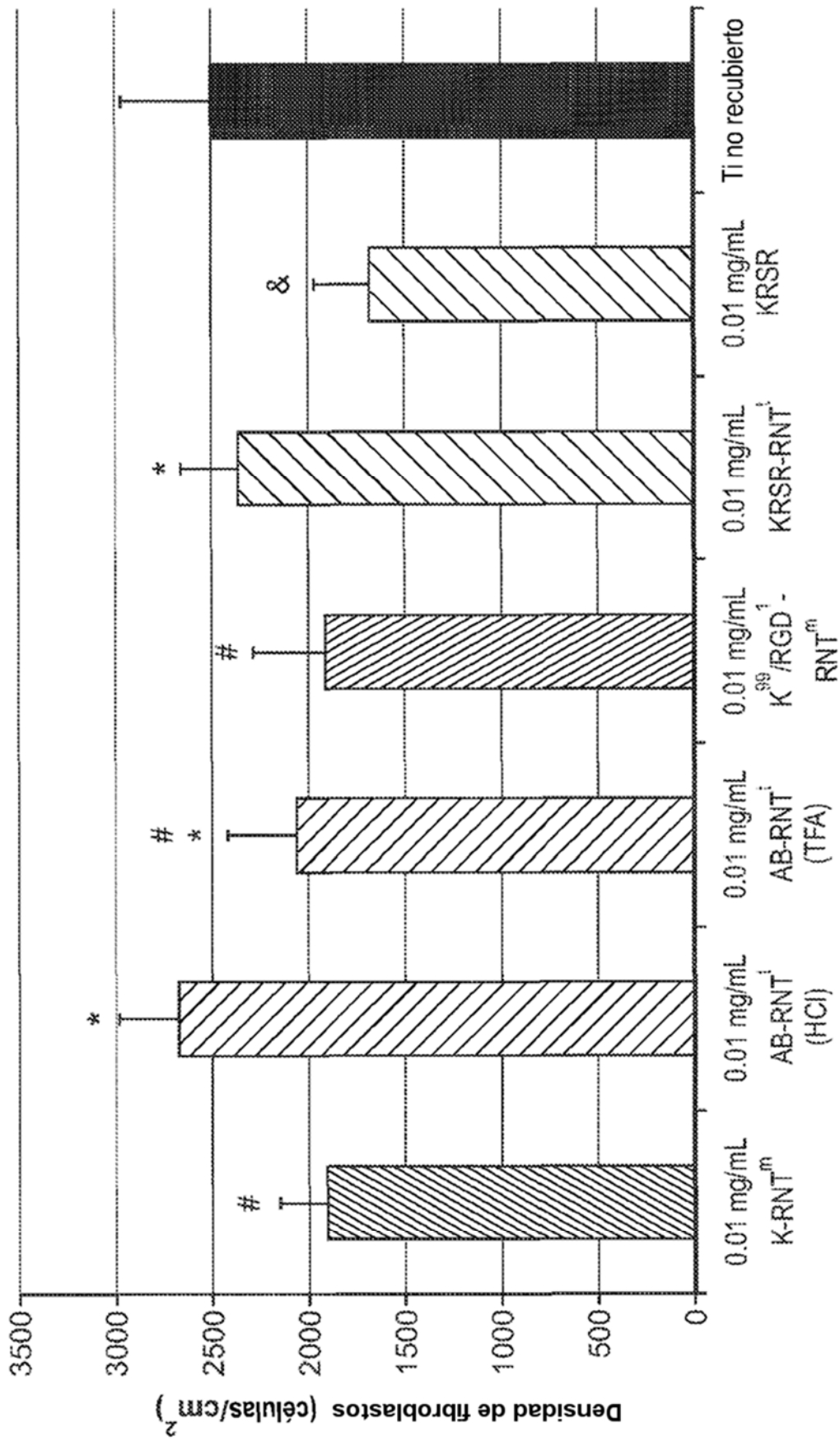


FIG. 7

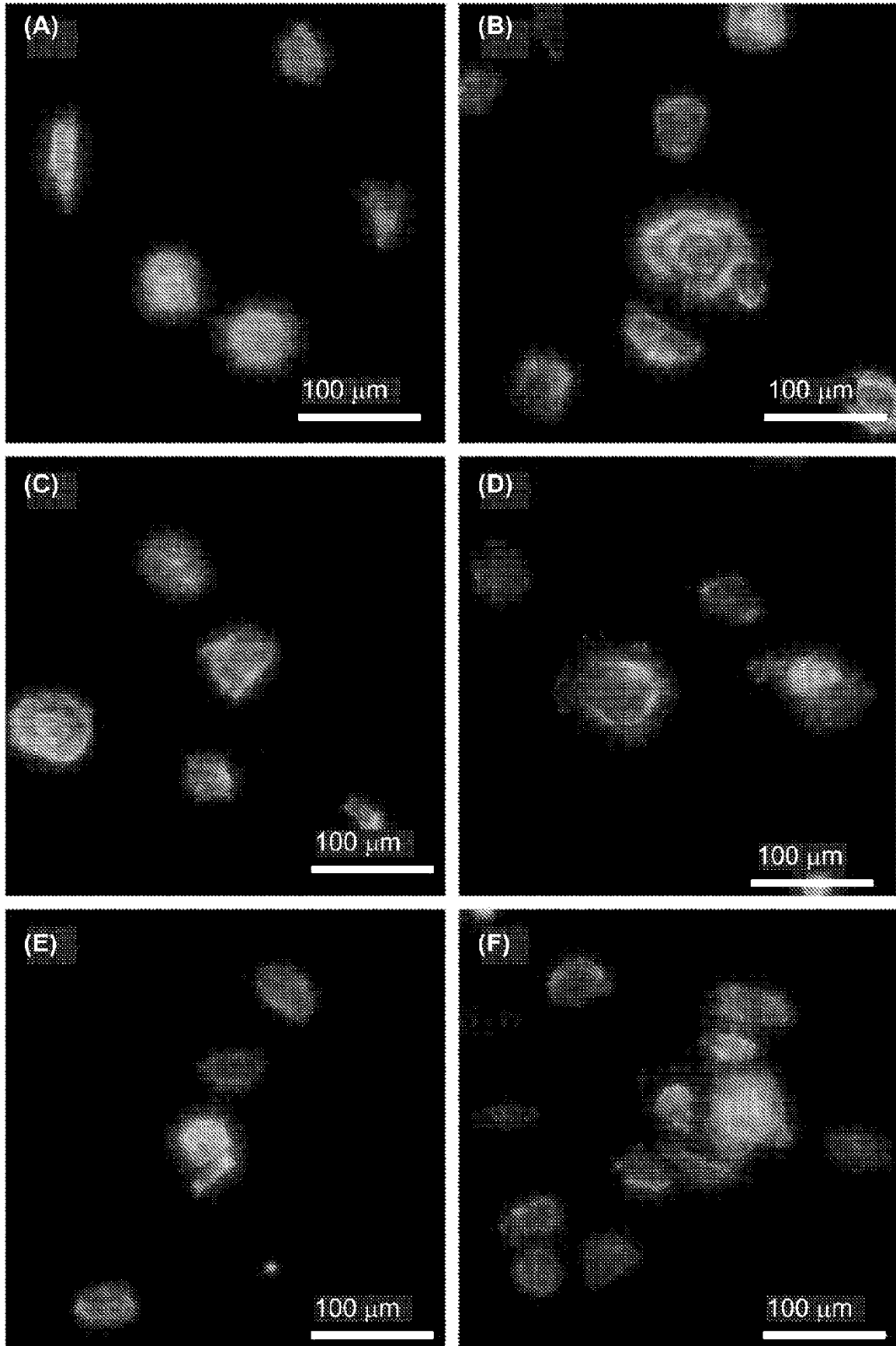


FIG. 8

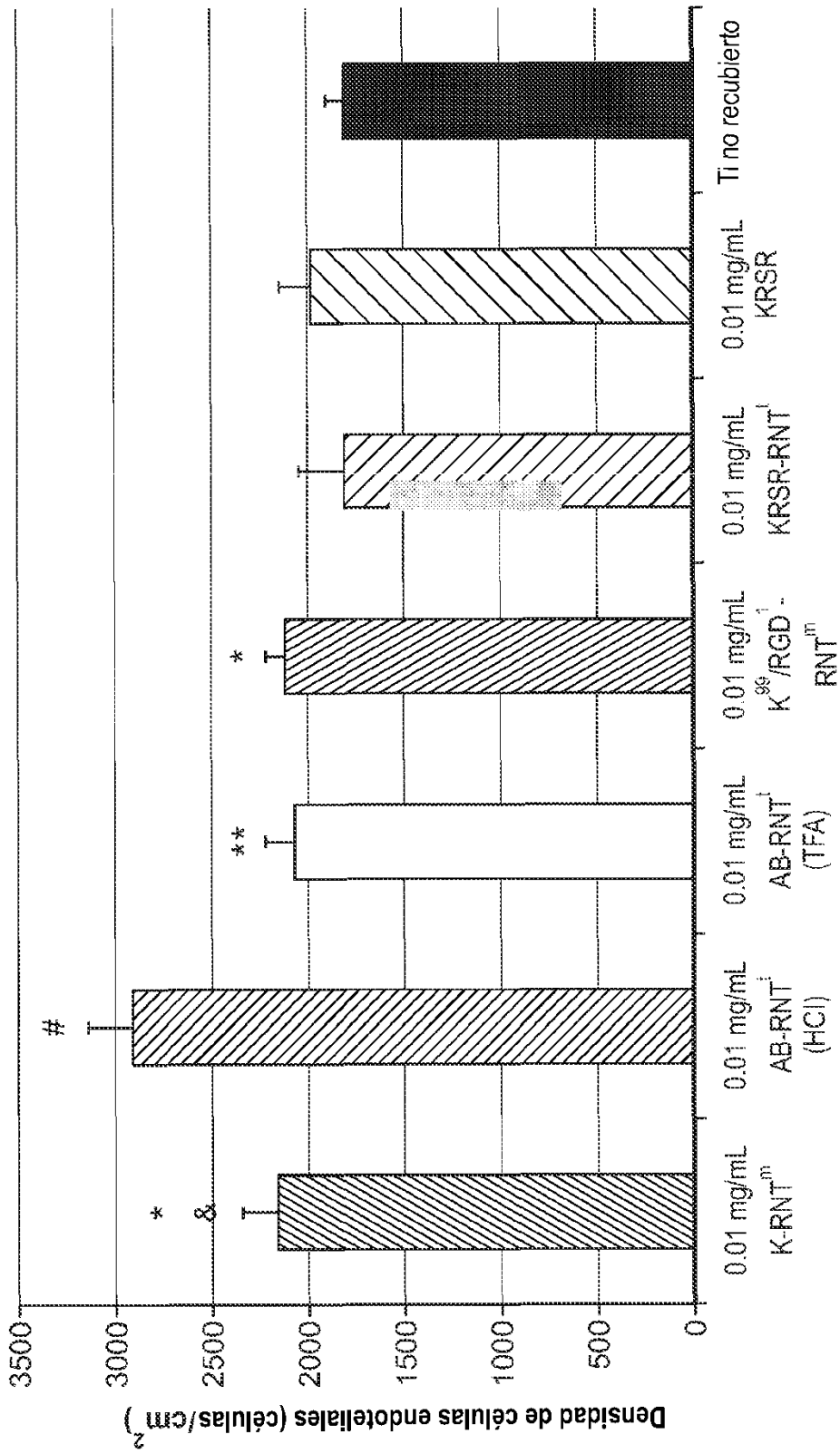


FIG. 9

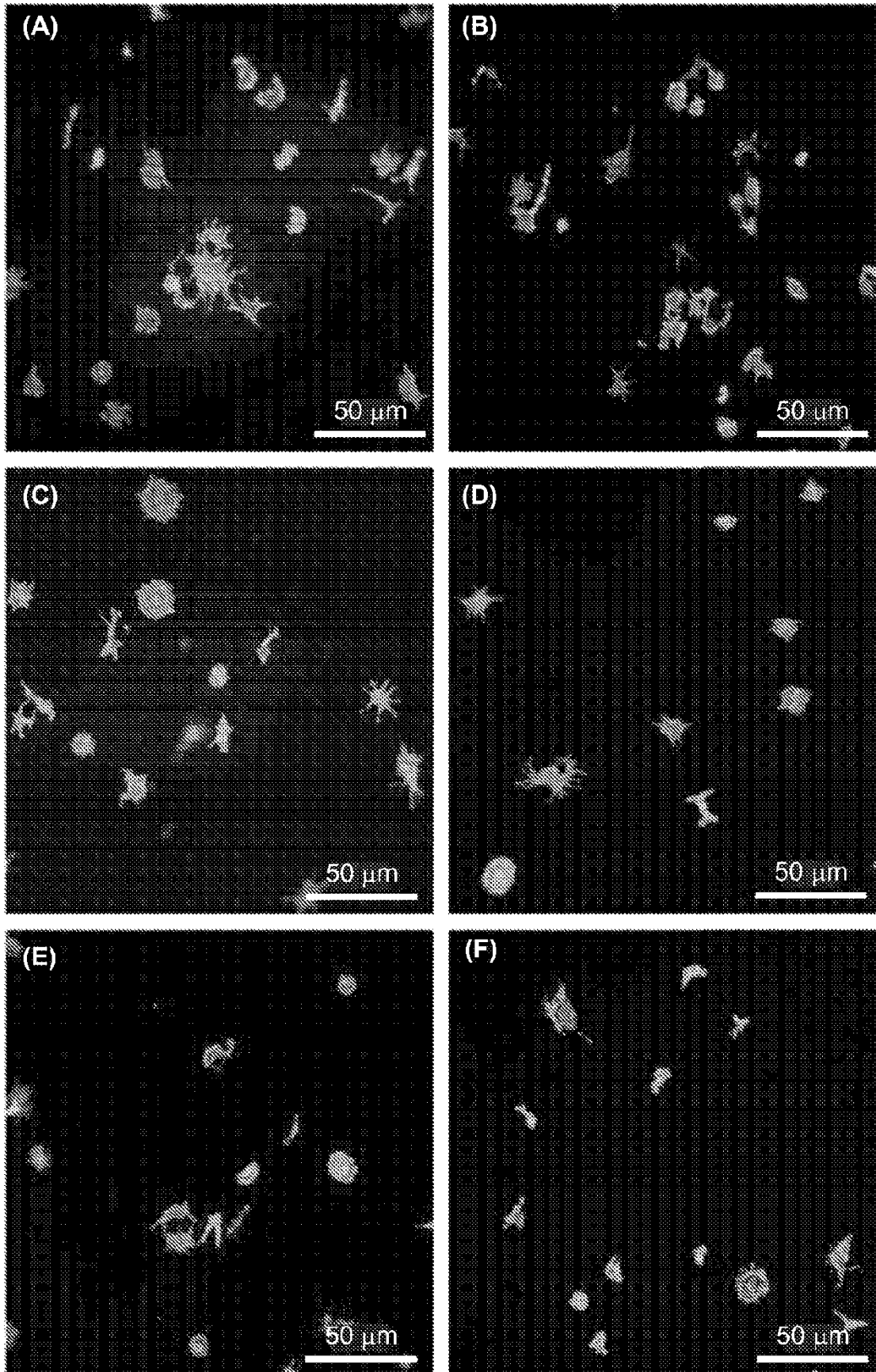


FIG. 10

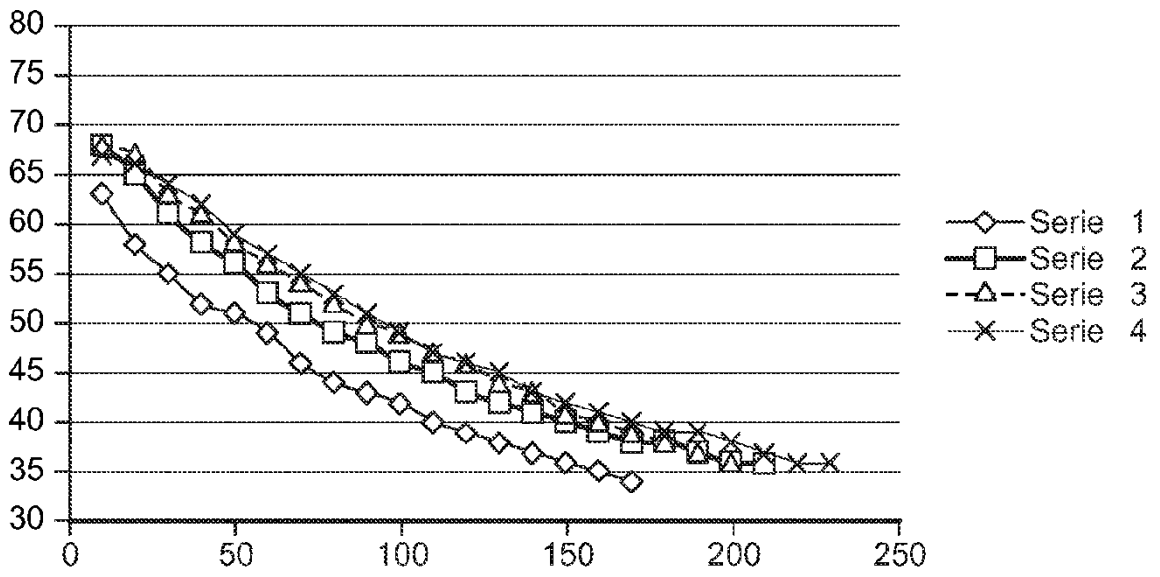


FIG. 11A

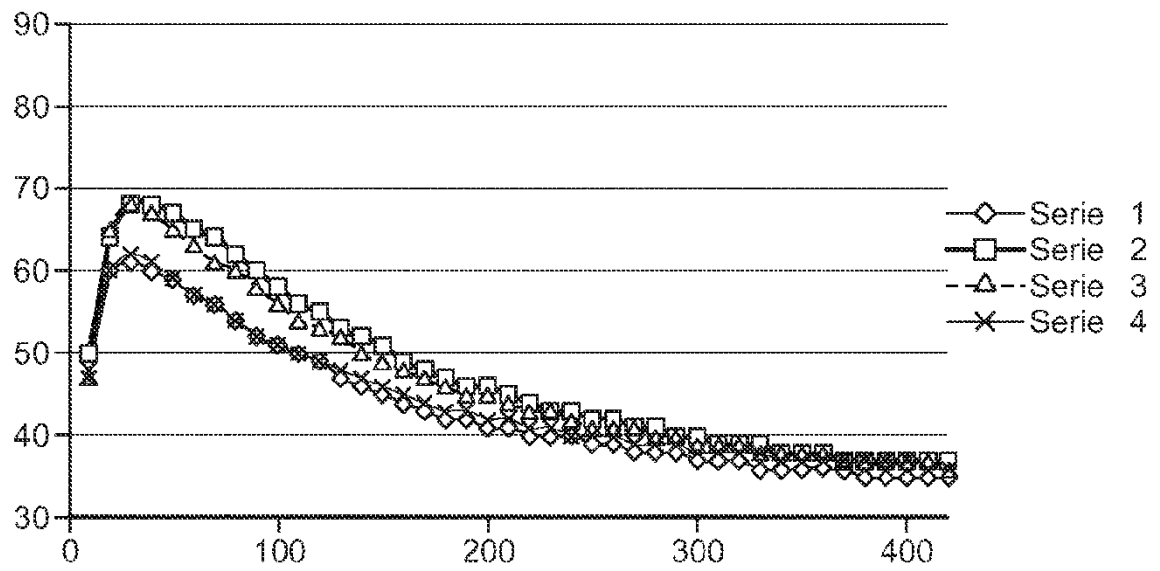


FIG. 11B

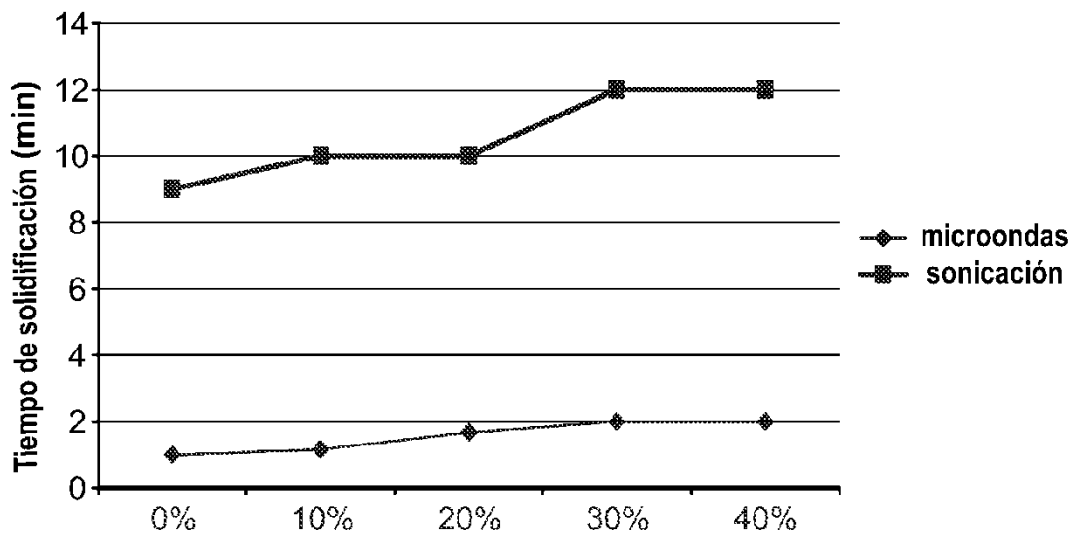


FIG. 12A

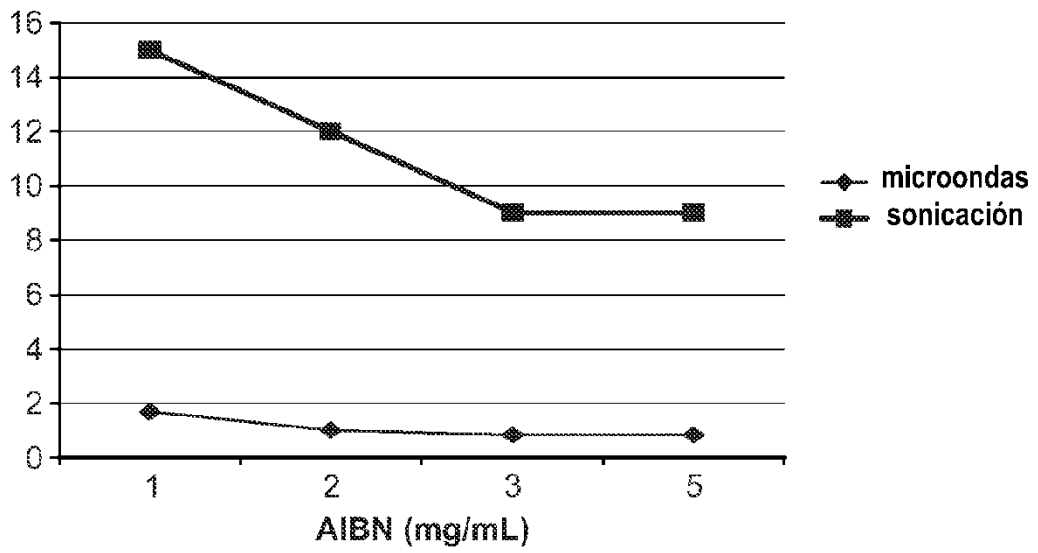


FIG. 12B

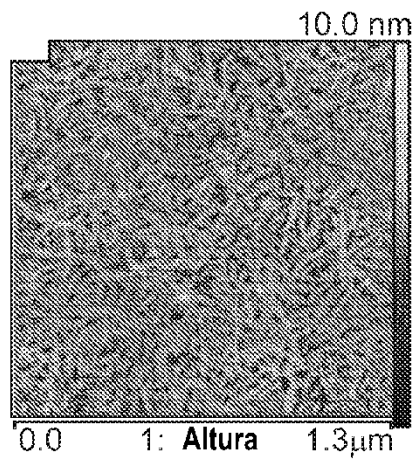


FIG. 13

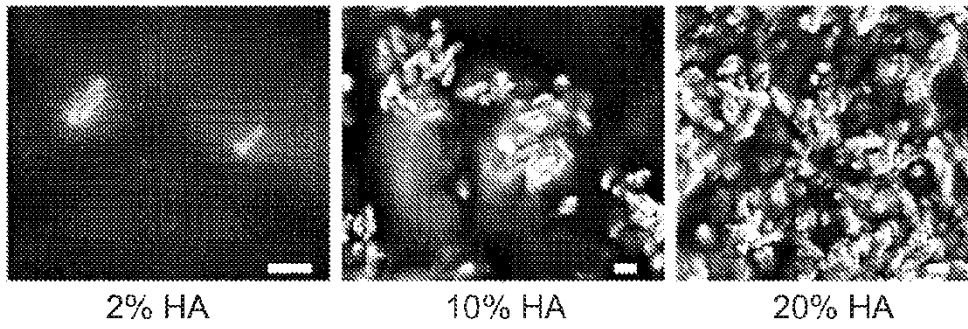


FIG. 14

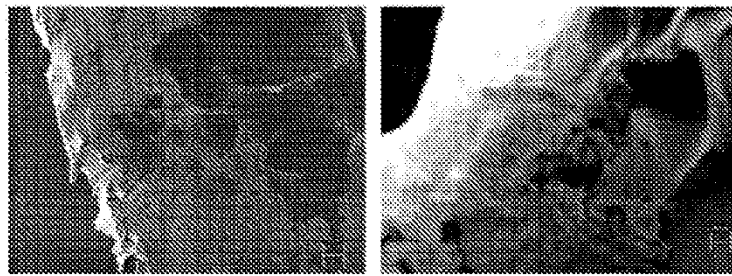
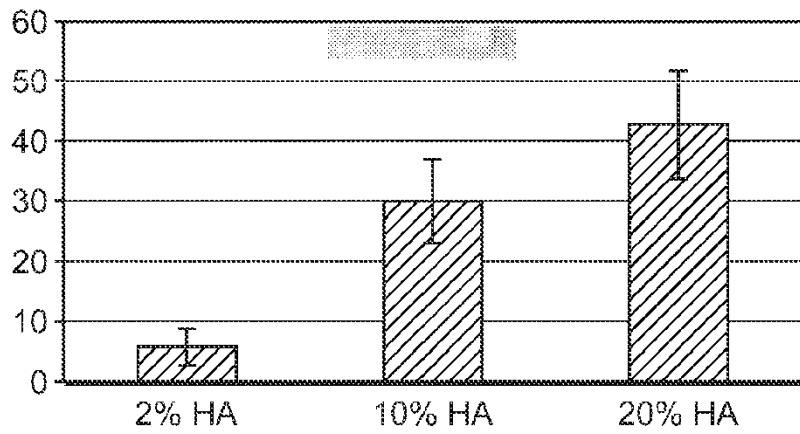


FIG. 15



Materiales compuestos de nanotubo/nano-HA-pHEMA

FIG. 16

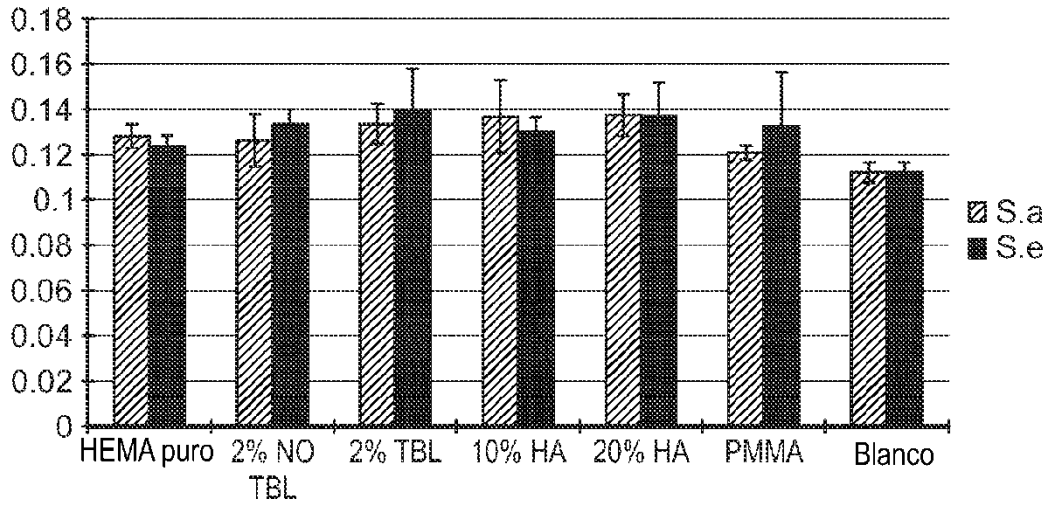


FIG. 17

Degradación de materiales compuestos de TBL/HA/pHEMA

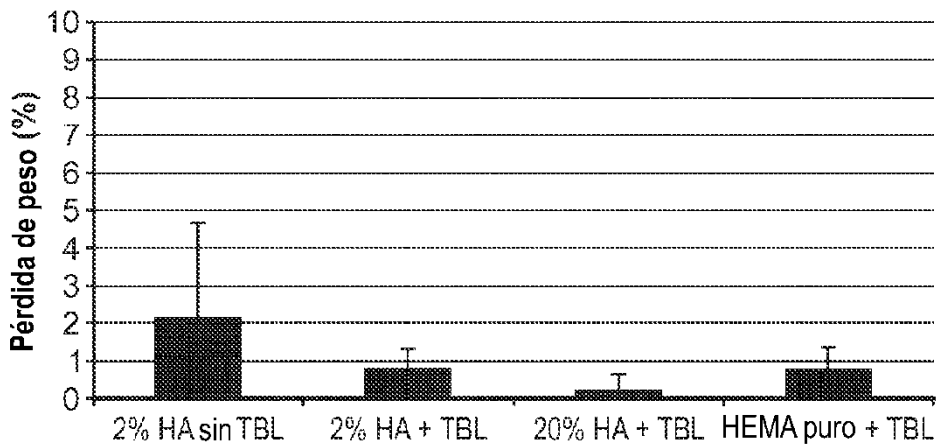


FIG. 18

Degradación de materiales compuestos de TBL/HA/pHEMA

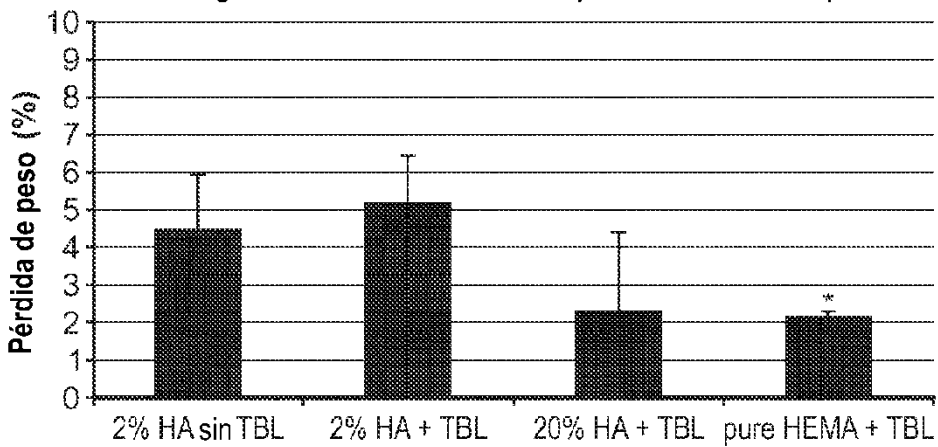


FIG. 19

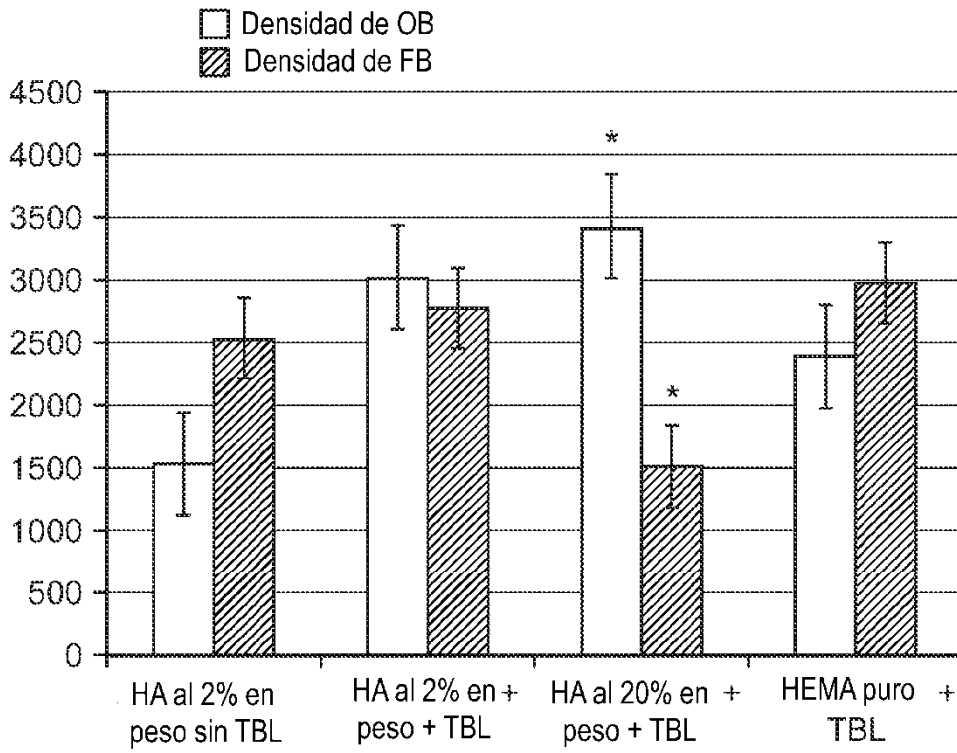


FIG. 20

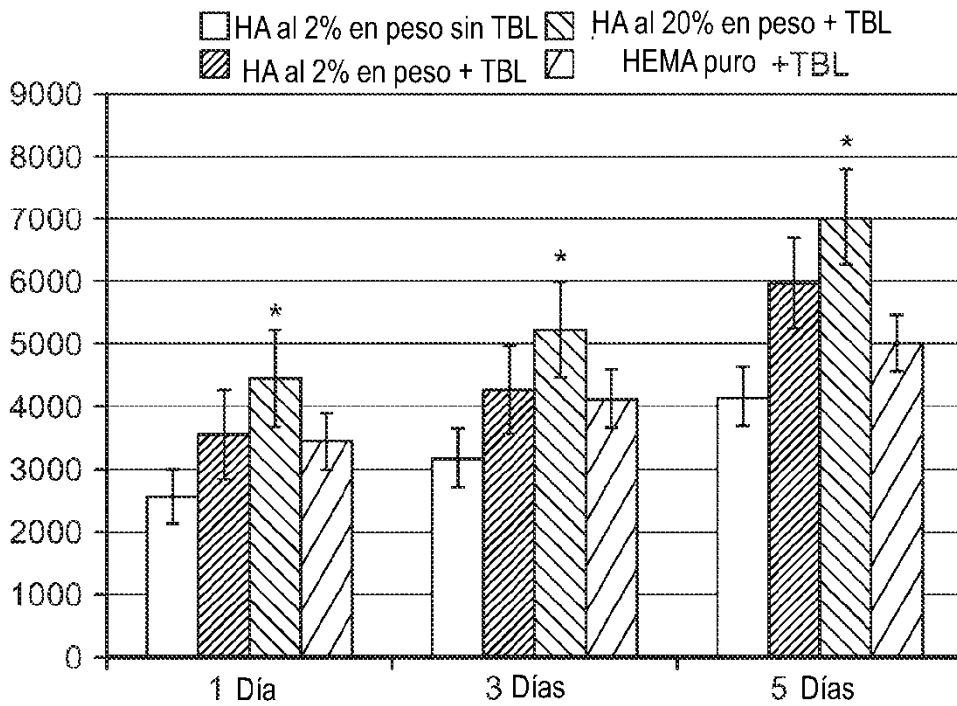


FIG. 21

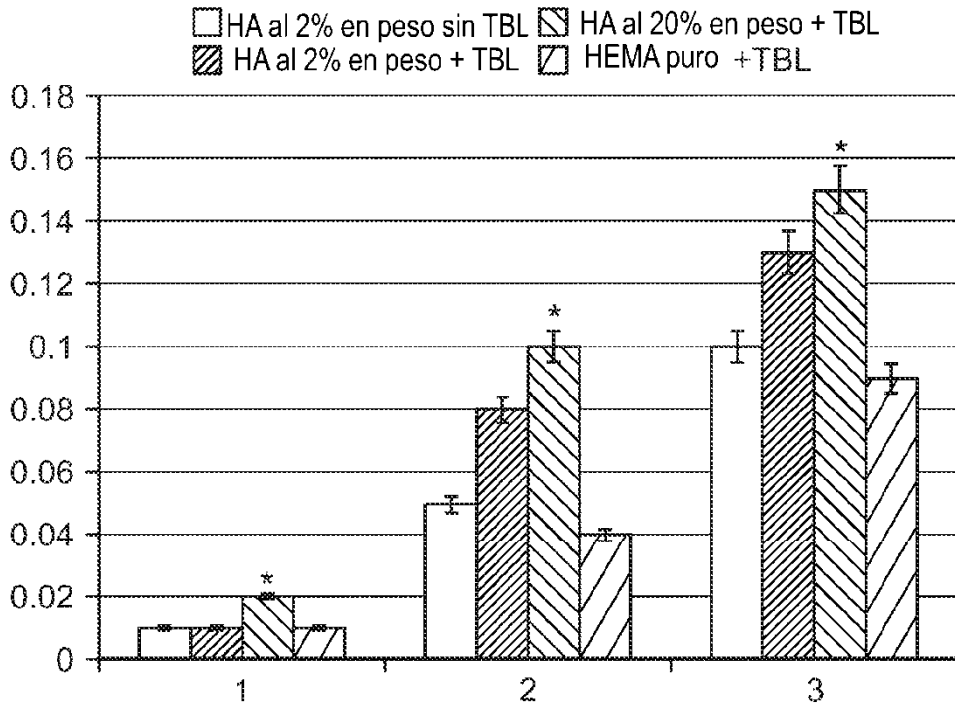


FIG. 22

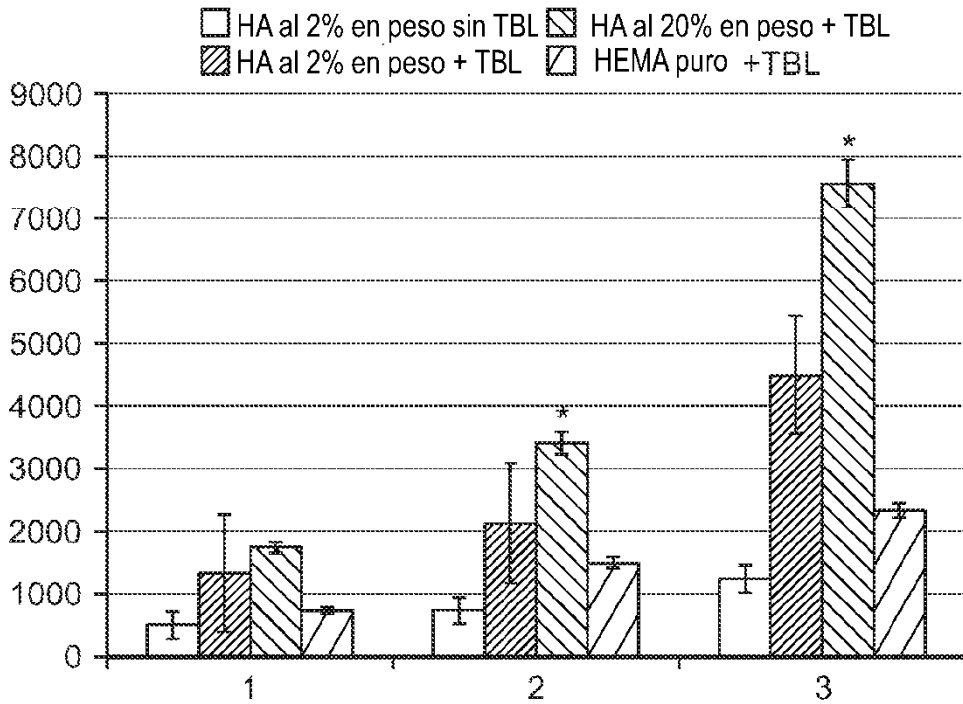


FIG. 23

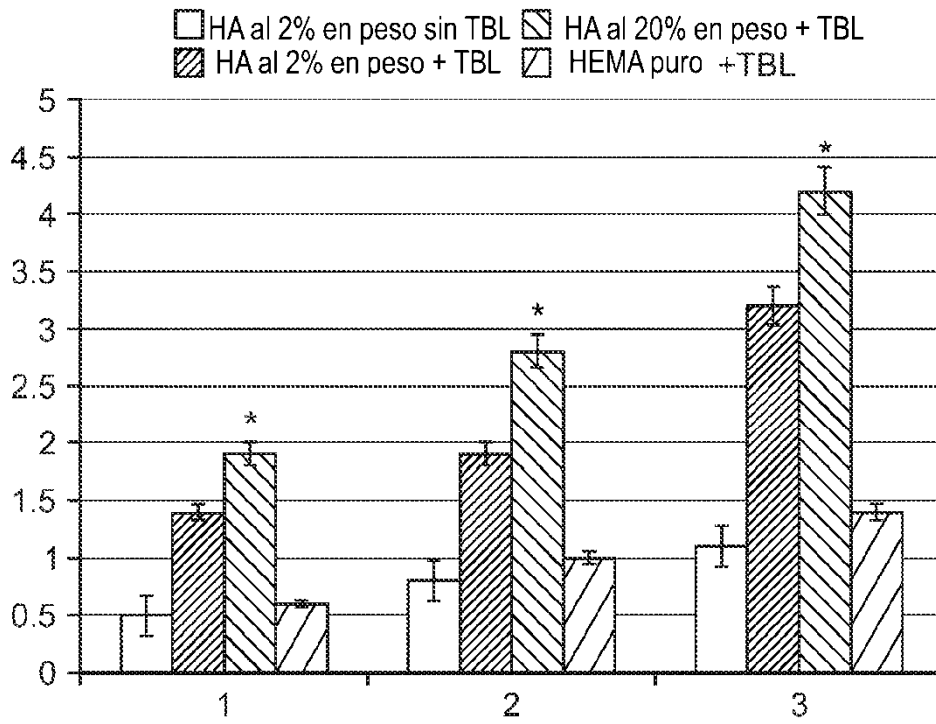


FIG. 24