

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 414**

51 Int. Cl.:

| | |
|-------------------|-----------|
| A61L 26/00 | (2006.01) |
| A61L 31/16 | (2006.01) |
| A61L 31/12 | (2006.01) |
| A61L 27/50 | (2006.01) |
| A61L 27/38 | (2006.01) |
| A61L 27/34 | (2006.01) |
| A61L 27/58 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2012 PCT/EP2012/056155**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012 WO12136701**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2012 E 12715344 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2694124**

54 Título: **Sistema de capas en gradiente biocompatible y biodegradable para medicina regenerativa y para soporte de tejidos**

30 Prioridad:

05.04.2011 EP 11002836

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.07.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG (50.0%)
Hugstetter Strasse 49
79095 Freiburg, DE y
ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**STEINBERG, THORSTEN;
TOMAKIDI, PASCAL;
SCHULZ, SIMON;
ANGARANO, MARCO;
MÜLHAUPT, ROLF y
FABRITIUS, MARTIN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 621 414 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

Sistema de capas en gradiente biocompatible y biodegradable para medicina regenerativa y para soporte de tejidos.

5 La presente invención se refiere a un sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable que comprende al menos un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y preferiblemente biodegradable y al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable, en el que, preferiblemente, se forma un gradiente con respecto a las propiedades mecánicas y/o físicas de una o más capas del al menos un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable y/o al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable. La al menos una capa de soporte preferiblemente comprende un polímero fusible biocompatible y preferiblemente biodegradable y/o un material biocompatible e incorporable. Este sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable se puede utilizar como biomaterial para medicina regenerativa, particularmente, como vendaje para heridas o para soporte de tejidos. La presente invención también proporciona medios que utilizan dicho sistema de capas en gradiente de la invención y métodos para producirlo.

15 En medicina regenerativa, los traumatismos por quemadura epitelial representan casos con una incidencia creciente. El tratamiento de dichas heridas extensas típicamente implica extraer el tejido dañado por completo. Posteriormente, se trasplanta piel sana de una región no afectada del paciente a la herida que se tratará. De forma inevitable, el trasplante de injertos cutáneos requiere cirugía invasiva e implica áreas extensas de la piel. Por lo tanto, estos tratamientos no solo son dolorosos, sino que también conllevan el riesgo de infección, la formación de cicatrices y pueden implicar una curación deteriorada de la herida debido al tamaño excesivo de las heridas.

20 Nuevos planteamientos han mostrado que dichas heridas se pueden tratar mediante nuevos biomateriales desarrollados para medicina regenerativa, en especial materiales de vendaje para heridas. En este contexto, los biomateriales para medicina regenerativa deben tener capacidades que incluyen la extracción de exudados y la protección de la herida, pero también suficientes propiedades mecánicas dado que deben resistir esfuerzos cortantes que típicamente se producen de forma local en tejidos y trasplantes. Existen diversas características adicionales del material de vendaje para heridas ideal que podrían satisfacer estos requisitos, tales como porosidad elevada para la permeación de gases y buena barrera para la protección de la herida de infección y deshidratación. En función de estos requisitos, los biomateriales candidatos desarrollados para medicina regenerativa, en especial materiales de vendaje para heridas, deben evaluarse para verificar que sean buenas barreras y que tengan buena permeabilidad de oxígeno. Además, dichos materiales, de forma ideal, darán soporte para el crecimiento de tejido nuevo en la herida y, por lo tanto, se parecen preferiblemente a la estructura base del tejido que se reemplazará o al menos a una estructura base que permite el crecimiento hacia el interior de células y/o la neovascularización de la estructura base.

35 Los biomateriales para medicina regenerativa, que pueden ser adecuados para dichos fines, están compuestos preferiblemente por materiales biocompatibles. En la técnica se muestran muchos ejemplos de materiales biocompatibles, de los cuales solo algunos pueden utilizarse de forma eficaz debido a las limitaciones mecánicas y físicas de los respectivos materiales.

40 En general, los materiales utilizados en la técnica se pueden diferenciar entre polímeros de origen natural y polímeros sintéticos. Los polímeros de origen natural típicamente exhiben buena biocompatibilidad y biodegradabilidad. Los polímeros sintéticos, en parte, también pueden exhibir una buena biocompatibilidad y, en parte, biodegradabilidad. Sin embargo, la preparación de dichos polímeros sintéticos a menudo requiere la aplicación de sustancias citotóxicas tales como catalizadores, disolventes citotóxicos, y/o dichos polímeros pueden comprender monómeros o disolventes orgánicos. Estas impurezas no se pueden extraer en su totalidad y, por lo tanto, pueden permanecer como componente citotóxico en el polímero final. Dichas impurezas, *inter alia*, pueden conducir a reacciones inflamatorias del tejido circundante, a reacciones inmunitarias indeseadas en el sitio del trasplante del paciente que se va a tratar e incluso a alergias o reacciones de rechazo del injerto trasplantado.

50 Un polímero de origen natural notorio, que proporciona muy buena biocompatibilidad e incluso, más preferiblemente, una buena biodegradabilidad, es la gelatina. La gelatina es una proteína que se utiliza ampliamente en las industrias farmacéutica y de alimentos, y se produce a gran escala a precios relativamente bajos. También exhibe una barrera limitada al vapor de agua, una característica que es particularmente ventajosa para la preparación de materiales de vendaje para heridas eficaces. Debido a sus propiedades funcionales, se ha utilizado además para la producción de películas comestibles y/o biodegradables. Sin embargo, al igual que la mayoría de las películas basadas en proteínas, tiene propiedades mecánicas limitadas y exhibe escasa estabilidad y resistencia a fuerzas cortantes, lo cual hace que sea difícil su aplicación como biomaterial para medicina regenerativa.

55 Por lo tanto, muchos abordajes en la técnica intentan proporcionar biomateriales mejorados basados en gelatina, para obtener una estabilidad mecánica buena o mejorada al mezclar la gelatina en una disolución polimérica combinada con un polímero sintético y mecánicamente más estable. Dichos polímeros sintéticos y mecánicamente más estables son, por ejemplo, policaprolactona (PCL), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-glicólico)

(PLGA), poliuretano (PU), etc. Sin embargo, dichos polímeros mixtos reducen de forma significativa las calidades superiores de la gelatina y de otros polímeros de origen natural, dado que reducen la barrera limitada al vapor de agua, disminuyen o incluso eliminan las propiedades de biocompatibilidad superiores de la gelatina e incluso pueden conducir a reacciones inflamatorias del tejido circundante, a reacciones inmunitarias indeseadas en el sitio del trasplante del paciente que se va a tratar e incluso a alergias o reacciones de rechazo del injerto trasplantado, debido al uso de disolventes citotóxicos que ya se describieron para los polímeros sintéticos solos.

Uno de dichos planteamientos se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente estadounidense US 2002/0090725 A1, que describe colágeno electroprocesado, pero también composiciones poliméricas mixtas electroprocesadas que comprenden colágeno en combinación con polímeros sintéticos tales como poli(uretanos), poli(siloxanos) o siliconas, poli(etileno), poli(pirrolidona vinílica), poli(2-hidroxi etil metacrilato), poli(N-pirrolidona vinílica), poli(metil metacrilato), poli(alcohol vinílico), poli(ácido acrílico), poli(acrilamida), poli(etileno-co-vinil acetato), poli(etilenglicol), policaciones sintéticos (tales como poli(etilenimina)), polianiones sintéticos (tales como poli(estireno sulfonato) y poli(ácido metacrílico)), poli(ácido metacrílico), ácido poliláctico (PLA), ácidos poliglicólicos (PGA), poli(láctido-co-glicólidos) (PLGA), náilonas, poliamidas, polianhídridos, poli(etileno-co-alcohol vinílico) (EVOH), policaprolactona, poli(acetato vinílico) (PVA), poli(óxido de etileno) (PEO) y poliortoésteres u otros polímeros sintéticos similares que se pueden desarrollar que son biológicamente compatibles. Desafortunadamente, solo algunos de estos polímeros sintéticos son biodegradables y, por lo tanto, deben extraerse tras su aplicación, si no pueden o no deben incorporarse al cuerpo de forma permanente. Dichos polímeros no biodegradables, por lo tanto, son adecuados para aplicaciones temporales. Además, aunque los polímeros mixtos de US 2002/0090725 A1 pueden exhibir propiedades mecánicas mejoradas, no eliminan la desventaja de posibles reacciones secundarias indeseadas, según se describieron anteriormente. Adicionalmente, dichos materiales y matrices poliméricas hechas con los mismos solo proporcionan capacidades limitadas con respecto al crecimiento hacia el interior de células, permeabilidad de agua y vapor, etc.

Un planteamiento adicional en US 2003/0232746 se refiere a una matriz de hidrogel reticulada estabilizada que comprende un primer componente de alto peso molecular y un segundo componente de alto peso molecular. Ambos componentes de alto peso molecular están reticulados de forma covalente, en los que el primer componente de alto peso molecular y el segundo componente de alto peso molecular se seleccionan cada uno del grupo que consiste en poliglicanos y polipéptidos, preferiblemente cualquier polipéptido derivado de tejido o producido sintéticamente, tal como colágenos y gelatinas derivadas de colágeno, más preferiblemente, dextrano y gelatina. La composición contiene además al menos un agente estabilizador o potenciador. Aunque se proporcionan para una multitud de funciones diferentes y con propiedades mecánicas mejoradas, las matrices de hidrogel reticuladas estabilizadas de US 2003/0232746, requieren reticuladores en la preparación de las matrices, que pueden no extraerse de forma suficiente tras la reticulación y, por consiguiente, se conservan en la matriz polimérica final. Como se mencionó anteriormente, dichos restos pueden conducir a reacciones alérgicas y reacciones inflamatorias del tejido circundante como ya se describió anteriormente, pero también pueden conducir a efectos citotóxicos debido a compuestos reticulados que no hicieron reacción.

Un documento adicional, Lelkes et al. (US 2006/0263417), divulga combinaciones de fibras poliméricas naturales y sintéticas electrohiladas como estructuras base para la ingeniería tisular. Como se describe inicialmente en Lelkes et al., un primer planteamiento pretendió cohilar con cada material en una jeringa diferente y aplicar los materiales al mismo tiempo sobre un soporte por medio de electrohilado para proporcionar matrices mecánicamente mejoradas, pero aún porosas. Sin embargo, los autores descartaron este planteamiento. En cambio, los autores percibieron que un material que exhibe una red de fibras menos densa puede ser ventajoso. Como solución para este problema, Lelkes et al. (US 2006/0263417) sugieren una fibra que comprende una combinación electroprocesada de al menos un polímero sintético y al menos dos polímeros naturales sin reticulación. Preferiblemente, uno de los al menos dos polímeros naturales es elastina o una proforma de elastina o un material similar a la elastina. Dichas matrices de Lelkes et al. (US 2006/0263417) pretendían exhibir una estructura base más porosa que las matrices de la técnica anterior y se observó que permanecían estables en un medio de cultivo celular. Sin embargo, una combinación de materiales naturales y sintéticos diferentes como prefieren Lelkes et al. (US 2006/0263417), altera significativamente y corrobora las calidades superiores de estos polímeros debido a la combinación de los mismos en una mezcla polimérica, como ya se describió anteriormente.

Otro planteamiento para mejorar las propiedades mecánicas de la gelatina lo informan Carvalho et al. (véase Carvalho et al., Boletín brasileño de ingeniería química, tomo 23, N.º 01, págs. 45 - 53, enero - marzo, 2006), aunque en otro contexto. Como se describe allí, se prepararon películas de gelatina para películas comestibles y/o biodegradables, en las que la gelatina se reticuló adicionalmente. Como resultado, el aumento en el grado de reticulación provoca una reducción en la permeabilidad del vapor de agua a través de la reducción de la difusividad y una mejora de las características mecánicas. Sin embargo, una relación de reticulación alta es menos preferible dado que resulta en poros particularmente pequeños y reduce significativamente un posible crecimiento hacia el interior de células.

Un planteamiento similar al descrito anteriormente se describe en Lee et al. (US 2008/0233162 A1). Lee et al. describe una estructura base de 3 dimensiones, porosa, fibrosa para la regeneración tisular que comprende un

polímero y/o una fibra de bajo peso molecular. Este polímero y/o fibra de bajo peso molecular es un polímero biodegradable compuesto por uno o más poliésteres alifáticos biodegradables sintéticos o uno o más polímeros naturales. Se da forma a los polímeros en una estructura de red de 3 dimensiones mediante electrohilado y se pueden usar solos o juntos en una mezcla de polímeros. Lee *et al.* (US 2008/0233162 A1), sin embargo, no proporcionan alternativas adicionales que puedan superar los problemas subyacentes.

Kim *et al.* (véase Kim et al., Biomed. Mater. 4, (2009) 044106 (11p)) describen una estructura base de nanofibras combinadas que utiliza polímeros sintéticos y naturales, poliuretano (PU) y gelatina, respectivamente, utilizando el método de electrohilado para preparar un material de vendaje para heridas. Determinaron las propiedades de esta estructura base de nanofibras combinadas de gelatina/PU y hallaron que el diámetro medio de estas nanofibras se electrohilaba uniformemente y variaba de 0,4 a 2,1 μm . Según los resultados, cuando la cantidad de gelatina en la disolución combinada disminuía, el ángulo de contacto aumentaba y la absorción de agua de la estructura base disminuía al mismo tiempo. En las pruebas mecánicas, las estructuras base nanofibrosas combinadas eran elásticas y la elasticidad aumentada a medida que la cantidad total de PU aumentaba. Además, a medida que la cantidad total de gelatina aumentaba, la proliferación celular aumentada en la misma cantidad que el tiempo de cultivo. Sin embargo, aunque esta estructura base de nanofibras combinadas de gelatina/PU tiene una aplicación potencial para uso como vendaje para heridas, las propiedades superiores de los polímeros naturales de la estructura base aun así se deterioran por su combinación con un polímero adicional.

El documento US 2010/0129450 se refiere a composiciones y métodos para preparar matrices electrohiladas que comprenden al menos un componente de material biológico natural y al menos un material de polímero sintético. El componente natural hace que las matrices sean altamente biocompatibles mientras que el componente de polímero de peso molecular puede impartir una resistencia mecánica adicional a la estructura base y/o mejorar la facilidad de producción al aumentar la viscosidad y las características de hilado de la disolución durante el electrohilado. De forma similar a lo descrito para otros métodos y estructuras base en la técnica, el documento US 2010/0129450 utiliza una combinación de diferentes polímeros en la preparación de la matriz electrohilada. Como ya se indicó, dichas combinaciones pueden deteriorar las propiedades superiores de los polímeros naturales de la estructura base al combinarlos con un polímero adicional y, por lo tanto, pueden proporcionar solo propiedades limitadas en relación con, por ejemplo, la permeación de gases y la deshidratación o pueden no permitir un crecimiento hacia el interior de células suficiente y la formación de una estructura de tejido nueva. El documento W 2010/084481 describe una estructura base de colágeno con múltiples capas que comprende tres capas secadas por congelamiento en las que una primera capa comprende colágeno tipo I y HA, una segunda capa comprende colágeno tipo I y un colágeno tipo II y HA, y una tercera capa comprende colágeno tipo I y tipo II y un polímero y/o sustancia biológica.

Resumiendo lo mencionado anteriormente, los biomateriales proporcionados por los métodos de la técnica anterior todavía presentan diversas desventajas, tales como escaso crecimiento celular hacia el interior, estabilidad mecánica insuficiente, citotoxicidad, etc. Por consiguiente, es objeto de la presente invención proporcionar biomateriales nuevos para medicina regenerativa, preferiblemente para vendajes para heridas y soporte para tejidos, que permiten cultivar células de forma eficaz en su estructura base, exhiben buenas propiedades mecánicas, una porosidad elevada para la permeación de gases y una barrera buena para la protección de la herida de infección y deshidratación, pero que no corroboran la calidad superior de los polímeros naturales o sintéticos aplicados. Además, dichos biomateriales darán soporte, de forma eficaz, para el crecimiento hacia el interior de células y para la formación de una estructura de tejido nueva, por ejemplo, una membrana extracelular o un tejido de un órgano funcional.

Este objeto que subyace a la presente invención se resuelve mediante las reivindicaciones adjuntas a la presente descripción.

Preferiblemente, según una primera realización, el objeto que subyace a la presente invención se resuelve mediante un sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable que comprende al menos un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y preferiblemente biodegradable y al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable, en el que preferiblemente se forma un gradiente con respecto a las propiedades mecánicas y/o físicas de una o más capas del al menos un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable y/o al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable. Preferiblemente, se forma un gradiente al alterar el diámetro de las fibras.

El sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable es preferiblemente insoluble en agua.

La presente invención permite de forma eficaz, debido al sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención, una adaptación del presente sistema a una multiplicidad de situaciones diferentes que se presentan en el tratamiento de heridas. El sistema de capas en gradiente de la invención proporciona un biomaterial nuevo y flexible con buena biocompatibilidad, con amplia aplicación en el tratamiento de quemaduras, en el tratamiento de lesiones o heridas debido a tratamientos quirúrgicos, cáncer u otras

enfermedades, pero también en el tratamiento de heridas crónicas y cirugía plástica reconstructiva. El sistema de capas en gradiente de la invención además puede adaptarse fácilmente a diferentes necesidades biomecánicas de, por ejemplo, una herida o lesión a tratar. El sistema de capas en gradiente de la invención puede complementarse además con múltiples compuestos diferentes, tales como factores de crecimiento, interleucinas, etc. Exhibe además una degradación retardada oportuna *in vivo* debido a la resistencia mecánica ajustable del sistema de capas en gradiente de la invención en sus diferentes capas o conjuntos de capas. Esto permite que un tejido, complementado con dicho sistema de capas en gradiente de la invención, reemplace de forma eficaz el sistema de capas en gradiente de la invención al crecer en dicho tejido o estructura base artificial durante tratamientos de heridas a corto o largo plazo. También permite una degradación lenta del sistema de capas en gradiente de la invención, preferiblemente para uso en estructuras de tejido blando, y/o una incorporación del sistema de capas en gradiente de la invención, preferiblemente para uso en estructuras de tejido duro. El sistema de capas en gradiente de la invención como tal también permite cultivar de forma eficaz y extensa los conjuntos de capas o capas con, por ejemplo, células autólogas, debido a la estructura consistente del sistema de capas en gradiente de la invención. Esto permite la preparación eficaz de construcciones de tejido artificiales e incluso de órganos artificiales que incluye establecer un sistema vascular funcional en dicha construcción de tejido u órgano artificial. Además, se pueden integrar polímeros antimicrobianos (AMP, por sus siglas en inglés) en los polímeros o las fibras poliméricas electrohiladas.

El sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede utilizar como biomaterial para medicina regenerativa, particularmente, como un vendaje para heridas o para soporte de tejidos, particularmente, para soporte de tejido blando y/o duro. Es preferiblemente biocompatible, biodegradable, insoluble en agua y sirve de forma eficaz como soporte para el crecimiento hacia el interior de células en su estructura base y para la formación de una estructura de tejido nueva, por ejemplo, una matriz y/o membrana extracelular, un tejido de un órgano funcional o cualquier tejido adicional. Además, exhibe buenas propiedades mecánicas y no corrobora la calidad superior de los polímeros naturales o sintéticos aplicados.

La primera realización de la presente invención define un sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable que comprende al menos un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y preferiblemente biodegradable.

En este contexto, la expresión «conjunto de capas» puede interpretarse, preferiblemente, como una disposición en 3 dimensiones de al menos una «capa simple», por ejemplo, de fibras poliméricas o cualquier otro compuesto. Por consiguiente, dicho «conjunto de capas» puede estar compuesto por una o más «capas simples», es decir, el conjunto de capas puede comprender, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1 a 15, 10 a 25, 15 a 30, 10 a 50 o 10 a 100 o incluso más «capas simples». Por lo tanto, un «conjunto de capas», en este contexto, puede entenderse como una especie de tela no tejida, una estera, o una estructura similar a una tela o similar a una estera que comprende una o más capas simples, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1 a 15, 10 a 25, 15 a 30, 10 a 50 o 10 a 100 o incluso más, debido a la producción de dicho «conjunto de capas».

Además, la expresión «sistema de capas en gradiente» preferiblemente se entenderá como un sistema de capas que comprende capas o conjuntos de capas, según se definieron en la presente, en el que estas capas o conjuntos de capas forman un gradiente con respecto al diámetro de las fibras.

Por consiguiente, dicho gradiente se puede alterar dentro de un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, de un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable a un conjunto de capas adicional que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, de al menos un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable a al menos una capa de soporte preferiblemente biodegradable, de al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable a al menos una capa de soporte adicional biocompatible y preferiblemente biodegradable, etc., y sus combinaciones.

Según un aspecto, dicho gradiente se forma dentro o entre uno o más conjuntos de capas que comprenden un polímero reticulado biocompatible y biodegradable al alterar el diámetro de las fibras de uno o más conjuntos de capas que comprenden un polímero reticulado biocompatible y biodegradable.

El al menos un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable preferiblemente sirve como una estructura base similar a un tejido, que permite el cultivo y el crecimiento hacia el interior de células y la formación de estructuras similares a tejidos o membranas tipo extracelulares.

Según un aspecto específico, se puede formar un gradiente debido a una alteración de las propiedades mecánicas y/o físicas dentro del al menos un conjunto de capas, según se definió anteriormente, para el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención. En este contexto, el gradiente puede formarse preferiblemente debido a un diámetro de fibra alterado (por ejemplo, aumentado o reducido) de las fibras poliméricas en uno y el mismo conjunto de capas, donde la resistencia de la fibra preferiblemente cambia de capa simple a capa simple. La alteración del diámetro de fibra puede lograrse mediante una alteración de la viscosidad y/o

de la relación de reticulación del polímero para este fin, preferiblemente, directamente antes de la aplicación o durante la aplicación, por ejemplo, al agregar directamente el reticulador antes de la aplicación, de manera que la reticulación continúe durante la aplicación y aumente la viscosidad y la relación de reticulación. Como ejemplo, se puede lograr aumentar la resistencia de la fibra al aumentar la relación de reticulación del polímero usado para este fin, en particular, preferiblemente durante el proceso de aplicación. Asimismo, se puede lograr aumentar el diámetro de la fibra al aumentar la viscosidad del polímero usado para este fin, en particular, preferiblemente durante el proceso de aplicación. Dicho aumento de la viscosidad y/o aumento de la relación de reticulación del polímero típicamente conduce a un aumento de la resistencia de la fibra, preferiblemente el ancho o diámetro, durante la preparación de las capas simples o el conjunto de capas. Asimismo, se puede lograr reducir el diámetro de la fibra al reducir la viscosidad y/o reducir la relación de reticulación del polímero usado para este fin. El proceso de preparación también se puede ajustar mecánicamente para producir una resistencia de fibra alternante, preferiblemente aumentada o reducida, durante la preparación de todo el conjunto de capas.

El gradiente formado por un diámetro de fibra que se altera, preferiblemente aumenta o reduce, como se definió según la presente invención, puede corresponder a una alteración, preferiblemente un aumento o reducción, del diámetro de la fibra con la altura y/o cantidad de la capa o conjuntos de capas. Preferiblemente, el ancho o diámetro aumenta con la altura y/o cantidad de la capa o conjuntos de capas. Esta alteración, preferiblemente, un aumento o reducción del diámetro de la fibra con la altura de la capa o conjuntos de capas puede producirse dentro de una capa o conjunto de capas o incluso en todo el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención con sus diferentes capas o conjuntos de capas, según se definieron en la presente. Preferiblemente, el diámetro de fibra de las fibras se puede alterar, preferiblemente aumentar o reducir, por ejemplo, alrededor de 0,0001 μm a alrededor de 2 μm por μm de altura de la capa o conjunto de capas, preferiblemente, alrededor de 0,0001 μm a alrededor de 1 μm por μm de altura de la capa o conjunto de capas, más preferiblemente, alrededor de 0,001 μm a alrededor de 0,01 μm por μm de altura de la capa o conjunto de capas, incluso más preferiblemente, alrededor de 0,005 μm a 0,01 μm por μm de altura de la capa o conjunto de capas, dentro de una capa o conjunto de capas o incluso en todo el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención con sus diferentes capas o conjuntos de capas, según se definieron en la presente.

Alternativa o adicionalmente, dicho gradiente puede definirse mediante el proceso de preparación de la capa o conjunto de capas, por ejemplo, mediante un aumento o reducción del diámetro de fibra de las fibras, por tiempo durante dicha preparación. Por ejemplo, se puede definir un gradiente mediante el aumento o reducción del diámetro de fibra, preferiblemente el ancho o diámetro de las fibras, de al menos un conjunto de capas durante el proceso de preparación de alrededor de 1 μm / a alrededor de 500 nm/h, de alrededor de 100 μm /h a alrededor de 500 nm/h, de alrededor de 1 nm/h a alrededor de 500 nm/h o de alrededor de 10 nm/h a alrededor de 500 nm/h, preferiblemente, de alrededor de 100 nm/h a alrededor de 400 nm/h, por ejemplo, alrededor de 100, 150, 200, 250, 300, 350 o 400 nm/h, por ejemplo, 280 nm/h.

Alternativamente, se puede formar un gradiente mediante diferentes conjuntos de capas, cada conjunto de capas comprende preferiblemente un polímero reticulado biocompatible y biodegradable. En este contexto, el diámetro de fibra de las fibras poliméricas dentro de uno y el mismo conjunto de capas puede permanecer constante dentro de la definición anterior, pero se altera con respecto al conjunto de capas siguiente/adicional en el cual las fibras poliméricas preferiblemente exhiben una resistencia diferente.

Preferiblemente, las fibras poliméricas, como se definieron en la presente, preferiblemente de una capa o la al menos una capa que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable o de una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable, según se definió en la presente, pueden exhibir una resistencia, preferiblemente un ancho o diámetro, de entre alrededor de 1 nm a alrededor de 500 μm , alrededor de 1 nm a alrededor de 250 μm , alrededor de 1 nm a alrededor de 100 μm , alrededor de 1 nm a alrededor de 50 μm , alrededor de 10 nm a alrededor de 500 μm , alrededor de 10 nm a alrededor de 250 μm , alrededor de 10 nm a alrededor de 100 μm , alrededor de 10 nm a alrededor de 50 μm , alrededor de 50 nm a alrededor de 500 μm , alrededor de 50 nm a alrededor de 250 μm , alrededor de 50 nm a alrededor de 100 μm , alrededor de 50 nm a alrededor de 50 μm .

Según la primera realización, el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable comprende al menos un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y preferiblemente biodegradable. En este contexto, un polímero adecuado como polímero reticulado biocompatible y biodegradable típicamente se selecciona de cualquier polímero conocido por un experto en la técnica por ser biocompatible y biodegradable. Dicho polímero preferiblemente incluye cualquier polímero o polipéptido de origen natural, preferiblemente proteínas o polisacáridos de matriz extracelular. Las proteínas de matriz extracelular son una clase preferida de polipéptidos adecuados en este contexto. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, colágeno, fibrina, elastina, laminina y fibronectina, etc. Dichos polipéptidos se pueden obtener de fuentes naturales, tal como de animales, preferiblemente animales mamíferos, por ejemplo, vaca, cerdo, oveja, etc. Existen múltiples tipos de cada uno de estos polipéptidos y moléculas de origen natural. Asimismo, dichos polipéptidos pueden fabricarse sintéticamente o pueden producirse mediante ingeniería genética. Por ejemplo, el colágeno existe en muchas formas y tipos y todos estos tipos y subconjuntos se abarcan en la presente memoria.

Un grupo especialmente preferido de polipéptidos adecuados en este contexto es el colágeno de cualquier tipo o sus fragmentos o productos. El colágeno es un componente proteico principal de la matriz extracelular de los animales. El colágeno se ensambla en una organización fibrilar compleja. Las fibrillas se ensamblan en haces de fibrillas que forman las fibras. Las fibrillas están compuestas por cinco microfibrillas colocadas en una disposición escalonada. Cada microfibrilla es un grupo de varillas de colágeno. Cada varilla de colágeno es una hélice triple enrollada hacia la derecha, cada hebra es una hélice enrollada hacia la izquierda. Las fibrillas de colágeno se refuerzan por medio de retículos covalentes intra e intermoleculares que convierten a esta matriz de los animales maduros en insoluble en agua caliente. Preferiblemente, el colágeno dentro del significado completo del término, según se estableció anteriormente, puede incluir colágeno de longitud completa, fragmentos y/o análogos de colágeno, colágeno que comprende sustituciones de aminoácidos conservadoras, sustituciones de aminoácidos no conservadoras y/o sustituciones con aminoácidos o residuos de origen no natural con respecto a cualquier tipo o clase de colágeno. El colágeno utilizado en la presente invención puede derivar de una fuente natural, puede fabricarse de forma sintética, puede producirse a través de ingeniería genética o puede producirse a través de cualesquiera otros medios o sus combinaciones. Las fuentes naturales incluyen, pero no se limitan a, colágenos producidos por o contenidos dentro del tejido de organismos vivos. Por ejemplo, el colágeno usado en la presente invención puede incluir, pero no se limita a, colágeno autólogo, colágeno de un organismo conespecífico o colágeno de otra especie. Algunos colágenos que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, los tipos de colágeno I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII y XIX. Algunos colágenos preferidos incluyen los tipos I y III. El colágeno sintético puede incluir el producido mediante cualquier medio artificial. En la técnica se conocen numerosos métodos para producir colágenos y otras proteínas. El colágeno sintético se puede preparar utilizando secuencias específicas. Por ejemplo, se puede preparar colágeno manipulado por ingeniería genética con secuencias de aminoácidos deseadas específicas que difieren del colágeno natural. El colágeno manipulado por ingeniería puede producirse mediante cualquier medio, incluidos, por ejemplo, síntesis de péptido, polipéptidos o proteínas. Por ejemplo, las células se pueden manipular por ingeniería genética *in vivo* o *in vitro* para producir colágeno o moléculas capaces de formar colágeno o subdominios de colágeno, y el colágeno deseado se puede cosechar. En un aspecto ilustrativo, las secuencias deseadas que forman sitios de unión en la proteína colágeno para células o péptidos se pueden incluir en cantidades mayores que las que se encuentran en el colágeno natural. El colágeno, tal como se usa en la presente, también puede formarse a partir del propio colágeno o cualquier otro material que forme una estructura de colágeno durante la preparación de la capa respectiva, formada a partir del mismo. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos, péptidos, colágeno desnaturalizado tal como gelatina, polipéptidos y proteínas. El colágeno se puede formar antes, durante o después de la preparación de la capa respectiva. Por ejemplo, el colágeno se puede formar al combinar procolágeno con procolágeno peptidasa antes, durante o después de la preparación de la capa respectiva. Cuando se utilizan tratamientos adecuados, las varillas de colágeno se extraen y solubilizan y mantienen su conformación de hélice triple. Se trata de colágeno desnaturalizado y difiere de la forma natural del colágeno, pero no se ha sometido a un tratamiento térmico o químico suficiente para descomponer los enlaces covalentes estabilizantes intramoleculares que se encuentran en el colágeno. Cuando las disoluciones de colágeno se calientan en gran parte o cuando los tejidos que contienen colágeno natural se someten a tratamientos químicos o térmicos, el hidrógeno y los enlaces covalentes que estabilizan las hélices de colágeno se descomponen y las moléculas adoptan una conformación desordenada. Cuando se descomponen estos enlaces de hidrógeno, los grupos amina polar y ácido carboxílico quedan disponibles para unirse a grupos polares de otras fuentes o de ellos mismos. Este material es la gelatina, una forma de colágeno desnaturalizado, obtenido mediante la hidrólisis parcial del colágeno derivado de la piel, el tejido conjuntivo blanco y huesos de animales. La gelatina puede derivar de un precursor tratado con ácido o un precursor tratado con álcali. La gelatina derivada de un precursor tratado con ácido se conoce como Tipo A y la gelatina derivada de un precursor tratado con álcali se conoce como Tipo B. Los cambios estructurales macromoleculares asociados con la degradación del colágeno son básicamente los mismos para la hidrólisis química y térmica parcial. En el caso de la degradación térmica y catalizada por ácido, la escisión hidrolítica predomina dentro de las cadenas de colágeno individuales. En la hidrólisis alcalina, predomina la escisión de retículos inter e intramoleculares. Por consiguiente, los polipéptidos, tales como se usan en la presente, también pueden comprender gelatina seleccionada de gelatinas tipo A y tipo B. Los colágenos y gelatinas preparadas a partir de este, preferiblemente, tienen un intervalo de peso molecular de alrededor de 2.000 a alrededor de 5.000.000 Da, más preferiblemente, alrededor de 10.000 Da a alrededor de 1.000.000 Da, por ejemplo, alrededor de 20.000 Da a alrededor de 80.000 Da o alrededor de 30.000 Da a alrededor de 70.000 Da.

Asimismo, el polímero para el polímero reticulado biocompatible y biodegradable de al menos un conjunto de capas del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención puede seleccionarse de polisacáridos, preferiblemente, que incluyen glicosaminoglicanos (GAG, por sus siglas en inglés) o glucosaminoglicanos. Glicosaminoglicano significa cualquier glicano (es decir, polisacárido) que comprende una cadena de polisacárido no ramificada (o ramificada) con una unidad disacárido repetitiva, una de las cuales es siempre un azúcar amino. Estos compuestos como clase tienen una carga negativa alta, son fuertemente hidrófilos y se denominan comúnmente mucopolisacáridos. Este grupo de polisacáridos incluye heparina, sulfato de heparán, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, sulfato de queratán y ácido hialurónico. Estos GAG se encuentran predominantemente en las superficies celulares y en la matriz extracelular. Glucosaminoglicano significa cualquier glicano (es decir, polisacárido) que contiene predominantemente derivados de monosacárido en los que un grupo hidroxilo alcohólico ha sido reemplazado por un grupo amino u otro grupo funcional tal como sulfato o fosfato. Un

ejemplo de un glucosaminoglicano es poli-N-acetil glucosaminoglicano, comúnmente denominado quitosano. Los polisacáridos de ejemplo que pueden ser útiles en la presente invención incluyen dextrano, heparán, heparina, ácido hialurónico, alginato, agarosa, carragenano, amilopectina, amilosa, glicógeno, almidón, celulosa, quitina, quitosano y varios polisacáridos sulfatados tales como sulfato de heparán, sulfato de condroitina, sulfato de dextrano, sulfato de dermatán o sulfato de queratán. El componente de poliglicano, preferiblemente, tiene un intervalo de peso molecular de alrededor de 2.000 a alrededor de 8.000.000 Da, más preferiblemente, alrededor de 20.000 a alrededor de 1.000.000 Da.

Preferiblemente, el polímero reticulado biocompatible y biodegradable se selecciona de colágeno, gelatina, fibrina, elastina, laminina y fibronectina, polisacárido, glicanos o poliglicanos, o una combinación de estos.

El polímero biocompatible y biodegradable según se definió anteriormente, tal como se usa para la preparación de al menos un conjunto de capas del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede reticular mediante el uso de un reticulador. La selección de dicho reticulador preferiblemente depende del polímero que se reticulará, preferiblemente, un polipéptido o un polisacárido, según se definieron anteriormente. En general, los reticuladores adecuados en el contexto de la presente invención pueden comprender, pero no se limitan a, anhídridos, aziridinas, epóxidos, aldehídos, hexonas, aminoácidos, tales como, por ejemplo, alanina, arginina, asparagina, ácido asparagínico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina, L-leucina, L-metionina o sus derivados, o cualquier aminoácido de origen natural o no natural adicional, catecolaminas, tales como, por ejemplo, catecol, epinefrina, noradrenalina, norepinefrina, dopamina y cualquier compuesto adicional que incluya un resto catecol o 1,2-dihidroxibenceno, preferiblemente formaldehído, dialdehídos, tales como, glutaraldehído, glioxal, trímero dihidratado de glioxal, suberimidato de dimetilo y 3,3'-ditiobispropionimidatoglutaraldehído de dimetilo, epóxidos (por ejemplo, bis-oxiranos), dextrano oxidado, hidrazida de p-azidobenzoilo, éster de N-[[alfa]-maleimidoacetoxi]succinimida, p-azidofenil glioxal monohidrato, bis-[[beta]-(4-azidosalicilamido)etil]disulfuro, suberato de bis[sulfosuccinimidil], propionato de ditiobis[succinimidil], suberato de disuccinimidilo, clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida, aminoácidos diacilcloruros seleccionados de cisteína, histidina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, tirosina, valina, L-leucina, L-metionina o sus derivados, catecolaminas según se definieron anteriormente y otros reactivos reticulantes funcionales conocidos por los expertos en la técnica. El formaldehído, el glioxal y el glutaraldehído hacen reacción con la cadena lateral del aminoácido, particularmente con el grupo lisina ϵ -NH₂, formando enlaces similares a aquellos en la formación de la base de Schiff. Además, los reticuladores adecuados, preferiblemente, con uno o más polipéptidos según se definieron en la presente, incluyen, pero no se limitan a, agentes reticulantes tales como aldehídos, por ejemplo, glutaraldehído, carbodiimida EDC (1-etil-3(3 dimetil aminopropil)), materiales fotosensibles que se reticulan tras la exposición a longitudes de onda de luz o radiación específicas, tales como luz UV, seleccionados de tetróxido de osmio, clorhidrato de carbodiimida y NHS (n-hidroxisuccinimida) y el Factor XIIIa. El glutaraldehído es un agente reticulante deseable para el colágeno o gelatina. Alternativamente, el colágeno o gelatina se puede reticular mediante la adición de fibronectina y/o sulfato de heparina, o mediante la cascada enzimática de lisil oxidasa. Asimismo, preferiblemente, los polisacáridos se pueden reticular, por ejemplo, con diacilcloruros para formar retículos diéster. Además, se pueden utilizar compuestos fenólicos, incluidos compuestos monofenólicos y polifenólicos, preferiblemente compuestos polifenol como reticulador de polímeros, según se definió en la presente. Dichos compuestos fenol, preferiblemente compuestos polifenol, se seleccionan preferiblemente de (i) compuestos en general solubles en agua moderadamente, (ii) que tienen un peso molecular de alrededor de 500-4000 Da, (iii) que comprenden, preferiblemente, > de alrededor de 12 grupos hidroxilo fenólicos y (iv) que exhiben, preferiblemente, alrededor de 5 a 7 anillos aromáticos por 1000 Da. Los compuestos polifenol específicamente preferidos incluyen taninos, galotanino (Sigma-Aldrich), compuestos tales como se definen de acuerdo con la definición de White-Bate-Smith-Swain-Haslam (WBSSH), preferiblemente proantocianuros tales como procianidinas, taninos y flortaninos hidrolizables, pero también compuestos fenólicos, particularmente compuestos fenólicos que son capaces de formar complejos con colágeno y otras biomoléculas, por ejemplo, tal como se define en Quideau et al., *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011, 50(3):586-621. Los compuestos fenólicos también comprenden, por ejemplo, curcumina, resveratrol, sus derivados relacionados, ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico, carnosol, capsaicina, 6-shogaol, 6-gingerol y sus derivados correspondientes, flavonoides, flavanoles, neoflavonoides, ácidos fenólicos, etc., tales como, por ejemplo, arbutina, cinarina, apigenina, isocutelareína, luteolina, nobiletina, tangeretina, tectocrisina, galangina, caempferol, miricetina, quercetina, rutina, citrina, curcurocitrina, eriodictiol, hesperidina, naringina, naringina, pinocembrina, quercitrina, biocanina A, crisina, daidzeína, ecuol, formononetina, genisteína, gliceteína, ipriflavona, lactuina, lactuina, picnogenol, silimarina, lignina, etc., o un compuesto curcumoide, tal como curcumina, desmetoxicurcumina, bis-desmehoxicurcumina, etc. Además del enlace covalente, alternativa o adicionalmente, se puede producir también la formación de enlace hidrógeno e interacciones electrostáticas entre el compuesto fenólico y la proteína.

El al menos un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede preparar al reticular un polímero adecuado (biocompatible y biodegradable) según se definió anteriormente, preferiblemente un polipéptido o un polisacárido (biocompatible y biodegradable) según se definieron anteriormente, y formar un

conjunto de capas con el polímero reticulado mediante al menos una capa simple, preferiblemente una o más capas simples compuestas en un conjunto de capas.

Formar un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable con el polímero reticulado biocompatible y biodegradable puede llevarse a cabo a través de cualquier método adecuado y conocido por un experto, más preferiblemente a través de métodos de electroprocesamiento. En este contexto, el término «electroprocesamiento» se definirá ampliamente para incluir todos los métodos de electrohilado, electropulverización, electrorrociado, electrodeposición y electroaspersión de materiales, combinaciones de dos o más de dichos métodos, y cualquier otro método en el que los polímeros se pueden verter, pulverizar, asperjar o gotear a lo largo de un campo eléctrico y hacia un objetivo. Los polímeros reticulados biocompatibles y biodegradables electroprocesados se pueden electroprocesar a partir de uno o más reservorios conectados a tierra en la dirección de un sustrato preferiblemente cargado o a partir de reservorios preferiblemente cargados hacia un objetivo conectado a tierra. La «electrodeposición» incluye cualquier tipo de deposición de un polímero reticulado biocompatible y biodegradable según se definió en la presente a través de medios eléctricos sobre un objetivo. Con este fin, se forman fibras, preferiblemente, a partir de una disolución o fusión al verter una disolución o fusión preferiblemente cargada eléctricamente a través de un orificio y depositarla sobre un objetivo. «Electrohilado» significa, preferiblemente, un proceso en el que se forman fibras a partir de una disolución o fusión al verter una disolución o fusión preferiblemente cargada eléctricamente a través de un orificio. «Electroaspersión» significa, preferiblemente, un proceso en el que se forman gotas a partir de una disolución o fusión al verter una disolución o fusión de polímero reticulado biocompatible y biodegradable preferiblemente cargado eléctricamente a través de un orificio. El término electroprocesamiento no se limita a los ejemplos específicos establecidos en la presente e incluye cualquier medio que utiliza un campo eléctrico para depositar un material sobre un objetivo. Preferiblemente, formar un conjunto de capas con el polímero reticulado biocompatible y biodegradable se puede llevar a cabo a través de electrohilado.

Un aparato de electroprocesamiento adecuado para electroprocesar polímeros reticulados biocompatibles y biodegradables, según se definieron en la presente, a través de cualquiera de los métodos indicados anteriormente, en al menos una capa o conjunto de capas, incluye un mecanismo de electroprocesamiento y un objetivo. En aspectos preferidos, el mecanismo de electroprocesamiento incluye uno o más reservorios para alojar la una o más disoluciones que comprenden los polímeros reticulados biocompatibles y biodegradables, según se definieron en la presente, que se electroprocesarán, por ejemplo, se electrohilarán o electrodepositarán. El reservorio o reservorios tienen al menos un orificio, boquilla u otro medio para permitir que se vierta la disolución que comprende polímeros reticulados biocompatibles y biodegradables, según se definieron en la presente, desde los reservorios. El electroprocesamiento típicamente se produce debido a la presencia de una carga en los orificios o en un objetivo, mientras que el otro está conectado a tierra. El sustrato también se puede utilizar como una característica variable en el electroprocesamiento de materiales utilizados para producir la composición electroprocesada. De forma específica, el objetivo puede ser el propio sustrato para los materiales utilizados para producir la matriz electroprocesada o se deposita la propia matriz electroprocesada. Alternativamente, se puede disponer un sustrato entre el objetivo y las boquillas. El objetivo también puede estar específicamente cargado o conectado a tierra a lo largo de un patrón preseleccionado, de manera que la solución vertida desde el orificio se dirija en sentidos específicos. El campo eléctrico se puede controlar mediante un microprocesador para crear una capa o conjunto de capas electroprocesadas que comprenden el polímero reticulado biocompatible y biodegradable que tienen una geometría deseada. El objetivo y la boquilla o boquillas se pueden manipular para que sean móviles entre sí, permitiendo así un control adicional sobre la geometría de la capa o conjunto de capas electroprocesadas que se formarán. La presente invención permite formar una capa o conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable que tiene una forma predeterminada, por ejemplo, adaptado a una forma específica de, por ejemplo, una herida de un paciente que se tratará.

Formar un conjunto de capas con el polímero reticulado biocompatible y biodegradable para el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede llevar a cabo al preparar una o más capas simples paso a paso para formar un conjunto de capas que comprende el polímero reticulado (biocompatible y biodegradable) según se definió anteriormente, preferiblemente, en el que cada nueva capa se forma sobre una capa precedente, según se definió anteriormente, formando así un conjunto de capas.

Formar un conjunto de capas que comprende el polímero reticulado biocompatible y biodegradable para el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede llevar a cabo en presencia de un disolvente específico. Dicho disolvente se puede utilizar ya preferiblemente para solubilizar los polímeros reticulados biocompatibles y biodegradables, o el polímero biocompatible y biodegradable, según se definió anteriormente, y opcionalmente un reticulador, según se definió en la presente, antes de formar el conjunto de capas, por ejemplo, a través de electroprocesamiento, preferiblemente, a través de electrohilado. Dicho disolvente se puede seleccionar de, pero no se limita a, disolventes útiles para disolver o suspender un polímero o polisacárido, según se definió en la presente. Dichos disolventes pueden comprender, pero no se limitan a, agua, etilacetato, ácido acético, mezclas de agua, etilacetato y/o ácido acético, 2,2,2-trifluoroetanol, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (también conocido como hexafluoroisopropanol o HFIP), urea, ácido acético, ácido monocloroacético, ácido trifluoroacético, anhídrido trifluoroacético, alcoholes de orden inferior, tales como, metanol,

etanol, propanol, isopropanol, butanol, etc., alcoholes halogenados, acetamida, N-metilformamida, N,N-dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida, N-metil pirrolidona (NMP), etil acetato, acetonitrilo, 1,1,1-trifluoroacetona, ácido maleico, hexafluoroacetona, cloroformo y trifluoroetanol (TFE) o sus combinaciones. Dado que las técnicas de electrohilado a menudo requieren condiciones de disolvente más específicas, los disolventes se pueden seleccionar dependiendo del polímero específico utilizado, por ejemplo, un polipéptido o polisacárido, según se definió en la presente. Por ejemplo, el colágeno y la gelatina se pueden electrohilar, por ejemplo, como una disolución o suspensión en agua, etilacetato, ácido acético, mezclas de agua, etilacetato y/o ácido acético, 2,2,2-trifluoroetanol, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (también conocido como hexafluoroisopropanol o HFIP), o sus combinaciones. Un monómero de fibrina se puede electrohilar, por ejemplo, a partir de disolventes tales como urea, ácido monocloroacético, agua, 2,2,2-trifluoroetanol, HFIP o sus combinaciones. La elastina se puede electrohilar, por ejemplo, como una disolución o suspensión en agua, 2,2,2-trifluoroetanol, isopropanol, HFIP o sus combinaciones, tal como isopropanol y agua, preferiblemente a partir de una disolución de 70 % de isopropanol y 30 % de agua que contiene 250 mg/ml de elastina. La preparación de una disolución correspondiente puede llevarse a cabo al disolver el al menos un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, según se definió en la presente, o el al menos un polímero biocompatible y biodegradable, según se definió en la presente, opcionalmente en presencia de un reticulador.

Formar un conjunto de capas que comprende el polímero reticulado biocompatible y biodegradable para el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención puede llevarse a cabo además en forma de una fusión de un polímero biocompatible y biodegradable, según se definió en la presente. Con este fin, típicamente se calienta un polímero biocompatible y biodegradable, según se definió en la presente, hasta su punto de fusión. La fusión puede contener un reticulador, según se definió en la presente. Alternativa o adicionalmente, se puede reticular un conjunto de capas que comprende el polímero reticulado biocompatible y biodegradable preparado a través de una fusión, después de la preparación del conjunto de capas.

El conjunto de capas formado con el polímero reticulado para el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención preferiblemente tiene una ultraestructura con una red tridimensional que sirve como soporte para la adhesión celular y la expansión, crecimiento, proliferación, diferenciación y desarrollo o migración. La distancia espacial entre las fibras simples del conjunto de capas tiene un papel importante en las células para que sean capaces de obtener nutrientes para el crecimiento, así como también para permitir la interacción célula a célula o para que se produzca la migración. Por lo tanto, según un aspecto específico de la presente invención, la distancia entre las fibras puede ser alrededor de 1 nm a alrededor de 500 μm , preferiblemente alrededor de 1 nm a alrededor de 100 μm , alrededor de 1 nm a alrededor de 500 nm, alrededor de 1 nm a alrededor de 100 nm, alrededor de 1 nm a alrededor de 50 nm, alrededor de 1 nm a alrededor de 30 nm, o incluso alrededor de 10 nm a alrededor de 30 nm, por ejemplo, alrededor de 50 nm, alrededor de 100 nm, alrededor de 150 nm, alrededor de 200 nm, alrededor de 250 nm, alrededor de 300 nm, alrededor de 350 nm, alrededor de 600 nm, alrededor de 750 nm, alrededor de 800 nm, alrededor de 850 nm, alrededor de 900 nm, alrededor de 950 nm, alrededor de 1000 nm (1 μm), 10 μm), 10 μm), 50 μm), alrededor de 100 μm), alrededor de 150 μm), alrededor de 200 μm), alrededor de 250 μm), alrededor de 300 μm), alrededor de 350 μm , alrededor de 400 μm), alrededor de 450 μm) o alrededor de 500 μm). Según un aspecto preferido, la distancia entre las fibras puede comprender cualquier longitud entre los intervalos mencionados o cualquier intervalo formado por dos de cualquiera de los valores mencionados anteriormente.

El tamaño de poro del conjunto de capas formado con el polímero reticulado para el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención también se puede controlar a través de la manipulación de los parámetros de electrohilado. Según un aspecto específico, el conjunto de capas formado con el polímero reticulado para el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención tiene un tamaño de poro que es suficientemente pequeño para ser impermeable a uno o más tipos de células. Dicho tamaño de poro puede ser preferiblemente para un conjunto de capas que puede utilizarse como una superficie externa del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención, por ejemplo, para protección de una herida, un órgano, un tejido específico del impacto exterior o para infiltración de células de tejido innatas del cuerpo. En un aspecto, el diámetro de poro promedio del conjunto de capas formado con el polímero reticulado para el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención es alrededor de 1 nm a alrededor de 500 μm , preferiblemente alrededor de 1 nm a alrededor de 100 μm , alrededor de 1 nm a alrededor de 500 nm, alrededor de 1 nm a alrededor de 100 nm, alrededor de 1 nm a alrededor de 50 nm, alrededor de 1 nm a alrededor de 30 nm o incluso alrededor de 10 nm a alrededor de 30 nm, por ejemplo, alrededor de 500 nm o menor. En otro aspecto, el diámetro de poro promedio del conjunto de capas es alrededor de 1 μm o menor. En otro aspecto, el diámetro de poro promedio del conjunto de capas es alrededor de 2 μm o menor. En otro aspecto, el diámetro de poro promedio del conjunto de capas es alrededor de 5 μm o menor. En otro aspecto, el diámetro de poro promedio del conjunto de capas es alrededor de 8 μm o menor. Algunos aspectos tienen tamaños de poro que no impiden la infiltración celular. En otro aspecto, el conjunto de capas tiene un tamaño de poro (área) entre alrededor de 1 nm^2 y alrededor de 500 μm^2 , alrededor 10 nm^2 a alrededor de 100 μm^2 , alrededor de 0,1 μm^2 y alrededor de 100 μm^2 , etc. En otro aspecto, el conjunto de capas tiene un tamaño de poro (área) entre alrededor de 0,1 μm^2 y alrededor de 50 μm^2 . En otro aspecto, el conjunto de capas tiene un tamaño de

poro entre alrededor de $1,0 \mu\text{m}^2$ y alrededor de $25 \mu\text{m}^2$. En otro aspecto, el conjunto de capas tiene un tamaño de poro (área) entre alrededor de $1,0 \mu\text{m}^2$ y alrededor de $5 \mu\text{m}^2$.

La porosidad del conjunto de capas formado con el polímero reticulado para el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención también se puede manipular al mezclar materiales porógenos con el polímero cuando se prepara el conjunto de capas. Dichos materiales porógenos pueden ser, por ejemplo, sales u otros agentes extraíbles, cuya disolución dejará agujeros de tamaños definidos en la matriz. El tamaño de poro también se puede controlar por medio de la cantidad de reticulación presente en la matriz. Asimismo, la porosidad del conjunto de capas se puede manipular mediante la reticulación posterior utilizando un reticulado, según se definió anteriormente, con el conjunto de capas electroprocesado, preferiblemente electrohilado que comprende un polímero biocompatible y biodegradable, según se definió en la presente anteriormente. Además, dicha manipulación del conjunto de capas se puede llevar a cabo a través de la adición de, por ejemplo, compuestos polifenol y a través de estos, de reticulación adicional. Dichos compuestos polifenol se seleccionan preferiblemente de (i) compuestos en general solubles en agua moderadamente, (ii) que tienen un peso molecular de alrededor de 500-4000 Da, (iii) que comprenden preferiblemente > de alrededor de 12 grupos hidroxilo fenólicos y (iv) que exhiben preferiblemente alrededor de 5 a 7 anillos aromáticos por 1000 Da. Los compuestos polifenol específicamente preferidos incluyen taninos, galotanino (Sigma-Aldrich), compuestos tales como se definen de acuerdo con la definición de White-Bate-Smith-Swain-Haslam (WBSSH), preferiblemente proantocianuros tales como procianidinas, taninos y florotaninos hidrolizables, pero también compuestos fenólicos, particularmente compuestos fenólicos que son capaces de formar complejos con colágeno y otras biomoléculas tales como se definen, por ejemplo, en Quideau et al., *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011, 50(3):586-621. La modificación del conjunto de capas con dichos compuestos polifenol conduce típicamente a un aumento significativo en la reticulación entre las fibras simples de la capa y, por lo tanto, a una mejor significativa de la resistencia mecánica de la capa. Dicho conjunto o conjuntos de capas modificados pueden utilizarse como medios de soporte (adicionales), por ejemplo, como una capa externa protectora, etc. La modificación del conjunto de capas puede llevarse a cabo en su totalidad o en parte, por ejemplo, en los bordes, límites o partes adicionales seleccionada del conjunto de capas.

Como se definió anteriormente, el conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención puede estar compuesto por una o más «capas simples», es decir, el conjunto de capas puede comprender, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1 a 15, 10 a 25, 15 a 30, 10 a 50 o 10 a 100 o incluso más «capas simples». Dicha capa o conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, según se definió anteriormente, puede comprender un espesor de varios nm hasta alrededor de varios μm o incluso mm, preferiblemente en el intervalo de alrededor de 1 nm a alrededor de 5 mm, alrededor de 1 nm a alrededor de 4 mm, alrededor de 1 nm a alrededor de 3 mm, alrededor de 1 nm a alrededor de 2 mm o alrededor de 1 nm a alrededor de 1 mm, más preferentemente alrededor de 10 nm a alrededor de 1 mm, alrededor de 100 nm a alrededor de 1 mm, alrededor de 1 μm a alrededor de 1 mm, alrededor de 1 μm a alrededor de 500 μm , alrededor de 1 μm a alrededor de 250 μm , alrededor de 1 μm a alrededor de 100 μm o alrededor de 100 nm a alrededor de 100 μm , etc.

El al menos un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, según se definió anteriormente, puede prepararse en un paso o de capa simple a capa simple en un modo continuo. Además, si se prepara más de un conjunto de capas que comprenden un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, según se definió anteriormente, cada conjunto de capas es, preferiblemente, según se definió anteriormente para el conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, según se definió anteriormente. Si se preparan más de un conjunto de capas que comprenden un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, según se definió anteriormente, cada conjunto de capas se puede preparar por separado o en un modo continua, una posterior a la otra. Un conjunto de capas, según se definió en la presente, se puede preparar sobre un soporte adecuado, un conjunto de capas ya preparado que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, según se definió anteriormente, sobre al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable, según se definió anteriormente, etc., o cualquier superficie o soporte adecuado para este fin, por ejemplo, una placa de acero, papel, vidrio, un portaobjetos de vidrio o cualquier portaobjetos, una placa de petri, una superficie de Teflón, por ejemplo, una lámina de Teflón, una parapelícula, una placa de aluminio, una lámina de aluminio, una lámina de plástico, etc. En este contexto, el soporte o superficie puede ser una forma o un molde, que se parece a la estructura en 3D de un fragmento de tejido que se reconstituirá, etc.

Si se preparan más de un conjunto de capas que comprenden un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, según se definió anteriormente, se puede preparar un primer conjunto de capas sobre un soporte, según se definió anteriormente. Tras la preparación de dicho primer conjunto de capas, se puede preparar un segundo conjunto de capas, en el que dicho segundo conjunto de capas puede prepararse asimismo sobre un soporte, según se definió anteriormente, o puede prepararse sobre el primer conjunto de capas para obtener una estructura escalonada de dos conjuntos de capas.

Dichos conjuntos de capas que comprenden un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, preferiblemente en una estructura escalonada, según se definió anteriormente, pueden orientarse entre sí, en cualquier orientación adecuada. Como ejemplo, si se preparan dos conjuntos de capas, el lado del segundo conjunto de capas que exhibe

una porosidad mayor, longitudes de fibra más largas y/o resistencias de fibra más bajas se puede colocar sobre el lado del primer conjunto de capas que exhibe una porosidad menor, longitudes de fibra más cortas y/o resistencias de fibra más altas. Asimismo, el lado del segundo conjunto de capas que exhibe una porosidad menor, longitudes de fibra más cortas y/o resistencias de fibra más altas se puede colocar sobre el lado del primer conjunto de capas que exhibe una porosidad mayor, longitudes de fibra más largas y/o resistencias de fibras más bajas, preferiblemente, con respecto al ancho o diámetro de las fibras. Alternativamente, el lado del segundo conjunto de capas que exhibe una porosidad menor, longitudes de fibra más cortas y/o resistencias de fibra más altas se puede colocar sobre el lado del primer conjunto de capas que exhibe una porosidad mayor, longitudes de fibra más largas y/o resistencias de fibra más bajas se puede colocar sobre el lado del primer conjunto de capas que exhibe una porosidad mayor, longitudes de fibra más largas y/o resistencias de fibras más bajas.

Se pueden preparar conjuntos de capas adicionales que comprenden un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, según se definió anteriormente, siguiendo el mismo principio, según se definió anteriormente, para la preparación de una estructura escalonada de dichos conjuntos de capas. Como ejemplo, se pueden preparar conjuntos de capas adicionales que comprenden un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, según se definió anteriormente, en consecuencia, sobre un conjunto de capas posterior para formar un conjunto de capas escalonado que comprende, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso 10 o más conjuntos de capas diferente, tales como se describieron en la presente, en los que cada conjunto de capas puede orientarse hacia la capa posterior, tal como se describió anteriormente, como ejemplo para un primer y un segundo conjunto de capas. Como ejemplo, todos los conjuntos de capas pueden comprender la misma orientación, es decir, el lado de un conjunto de capas que exhibe una porosidad mayor, longitudes de fibra más largas y/o resistencias de fibra más bajas se puede colocar sobre el lado de un conjunto de capas adicional que exhibe una porosidad menor, longitudes de fibra más cortas y/o resistencias de fibra más altas. Asimismo, el lado de un conjunto de capas que exhibe una porosidad menor, longitudes de fibra más cortas y/o resistencias de fibra más altas se puede colocar sobre el lado de un conjunto de capas adicional que exhibe una porosidad mayor, longitudes de fibra más largas y/o resistencias de fibra más bajas.

Dichos conjuntos de capas diferentes que comprenden el polímero reticulado biocompatible y biodegradable, según se definió anteriormente, pueden prepararse utilizando el mismo o diferentes de los polímeros reticulados biocompatibles y biodegradables definidos anteriormente, en los diferentes conjuntos de capas, por ejemplo, alrededor de 1, 2, 3, 4 o incluso 5 o más diferentes de los polímeros reticulados biocompatibles y biodegradables definidos anteriormente. Sin limitarse a estas, las combinaciones particularmente preferidas incluyen gelatina, una elastina.

Además, un conjunto de capas, según se definió anteriormente, que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, según se definió anteriormente, puede prepararse utilizando uno o más de un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, según se definió anteriormente, en cada conjunto de capas, por ejemplo, 2, 3, 4 o incluso 5 o más polímeros reticulados biocompatibles y biodegradables diferentes, según se definieron anteriormente. La preparación de dicho conjunto de capas puede llevarse a cabo a través de cualquier método, según se definió anteriormente, preferiblemente, a través de electroprocesamiento, tal como, por ejemplo, electrohilado o electrodeposición, más preferiblemente, a través de cohilado, es decir, electrohilado, según se definió anteriormente, en el que las capas simples se preparan utilizando diferentes polímeros reticulados biocompatible y biodegradable, según se definieron anteriormente, al mismo tiempo (por ejemplo, utilizando boquillas separadas para cada uno de los polímeros). Cualquiera de las definiciones de los conjuntos de capas, según se definieron anteriormente, también pueden aplicarse aquí, particularmente con respecto a la resistencia de las fibras poliméricas y la alteración de las propiedades mecánicas y/o físicas del conjunto de capas, pero también con respecto a la modificación del conjunto de capas, la orientación de los diferentes conjuntos de capas entre sí, etc.

Según un aspecto muy específico, se puede preparar un conjunto de capas, según se definió anteriormente, que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, según se definió anteriormente, utilizando los siguientes pasos:

(i) proporcionar y preparar una disolución polimérica para electroprocesamiento, preferiblemente al disolver un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, según se definió en la presente, preferiblemente en un disolvente, según se definió en la presente, opcionalmente en presencia de un reticulador, según se definió en la presente, al disolver un polímero biocompatible y biodegradable, según se definió en la presente y un reticulador, según se definió en la presente, preferiblemente en un disolvente, según se definió en la presente o al fundir un polímero biocompatible y biodegradable, según se definió en la presente, opcionalmente en presencia de un reticulador, según se definió en la presente; y

(ii) electroprocesar al menos un conjunto de capas a partir de la disolución polimérica, formando así un conjunto de capas de 3 dimensiones, en el que se forma un gradiente, según se definió en la presente, preferiblemente al alterar la resistencia de las fibras del conjunto de capas, según se definió en la presente, más preferiblemente, al aumentarla o reducirla, mientras se lleva a cabo el proceso de electroprocesamiento; y opcionalmente moldear el

conjunto de capas producido. Si se utilizó un disolvente, el disolvente preferiblemente se volatiliza en el paso (ii) durante el paso de electroprocesamiento de la disolución polimérica.

El al menos un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención puede tener cualquier forma adecuada. Las formas adecuadas comprenden, pero no se limitan a, cintas, hebras, telas, fibras, partículas, gotas o estructuras similares a redes o mallas. Las formas adecuadas también pueden comprender planchas, películas, láminas o laminados. Preferiblemente, la al menos una capa que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención está presente en forma de tela, una estructura similar a una red o malla. Cualquiera de estas estructuras puede producirse con o sin agujeros o cavidades.

Como componente adicional, el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable según la primera realización de la presente invención comprende al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable. Dicha capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable puede comprender un polímero fusible biocompatible y preferiblemente biodegradable y/o un material incorporable. Los polímeros fusibles biodegradables y preferiblemente biocompatibles en este contexto pueden incluir, pero no se limitan a, cualquier polímero fusible biocompatible y preferiblemente biodegradable adecuado para dicho fin, preferiblemente, por ejemplo, poliésteres, polianhídridos, polipéptidos o poliuretanos, por ejemplo, policaprolactona PCL, preferiblemente poli (épsilon-caprolactona) (PCL), poliláctido PLA, poliglicólido PGA, ácido poli(láctico-co-glicólico) PLGA, ácido polisebácico, etc., o biopolímeros tales como, por ejemplo, gelatina, alginato, colágeno, fibrina, etc. Los materiales biocompatibles e incorporables en este contexto pueden incluir, pero no se limitan a, cualquier material biocompatible e incorporable adecuado para dicho fin, preferiblemente, por ejemplo, cerámicas, tales como, por ejemplo, cerámicas hechas con hidroxilo apatita (HA), fosfato tricálcico (TCP, por sus siglas en inglés), etc. Una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable, según se definió en la presente, también puede comprender un polímero fusible biocompatible y preferiblemente biodegradable, según se definió en la presente, que contiene un material incorporable, según se definió en la presente. Dicha capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable preferiblemente actúa como aglutinante y/o como un soporte estructural para crear un material biocompuesto mecánicamente estable. Dependiendo de la aplicación deseada, dichos materiales biocompatibles incorporables se pueden utilizar como un soporte rígido, por ejemplo, para complemento o regeneración de tejido duro, reparación ósea, etc.

En este contexto, el término «fusible» preferiblemente significa que el polímero fusible biodegradable y biocompatible comprende un estado sólido o estado semisólido a temperatura ambiente de alrededor de 20 a 25 °C y/o a la temperatura corporal regular del paciente que se tratará, por ejemplo, de alrededor de 37 °C. Por consiguiente, un polímero fusible biodegradable y biocompatible, según se definió en la presente, puede seleccionarse con respecto a su punto de fusión y temperatura de transición vítrea. Si el polímero fusible biodegradable y biocompatible utilizado como capa de soporte en la presente debe ser flexible, la temperatura de transición vítrea de dicho polímero puede seleccionarse de manera que el polímero esté a la temperatura corporal regular del paciente que se tratará, por encima de su punto de transición vítrea T_g . De esta manera se permite el movimiento de las cadenas poliméricas entre sí y, por lo tanto, se proporciona cierta flexibilidad. Además, el polímero se selecciona preferiblemente de manera que su punto de fusión esté por encima de la temperatura ambiente de alrededor de 20 a 25 °C y/o a la temperatura corporal regular del paciente que se tratará, por ejemplo, de alrededor de 37 °C. Como ejemplo, el punto de fusión de PCL es de alrededor de 60 °C y su temperatura de transición vítrea T_g es de alrededor de -60 °C.

La al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención según la primera realización puede prepararse al proporcionar una fusión del polímero fusible biocompatible y preferiblemente biodegradable. Alternativamente, se puede proporcionar una suspensión o disolución de un material incorporable, según se definió anteriormente, por ejemplo, en un disolvente, según se definió en la presente, preferiblemente en alcohol polivinílico (PVA, por sus siglas en inglés). Según una alternativa adicional, se puede proporcionar una fusión del polímero fusible biocompatible y preferiblemente biodegradable, que comprende además un material incorporable, según se definió anteriormente. La preparación de la al menos una capa que comprende una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención a continuación puede llevarse a cabo al formar una capa con el polímero fundido, con la suspensión o disolución de un material incorporable, según se definió anteriormente, y/o se puede proporcionar con una fusión del polímero fusible biodegradable, que comprende además un material incorporable, según se definió anteriormente.

Formar la al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable con el polímero fundido, con la suspensión o disolución de un material incorporable, según se definió anteriormente, y/o con una fusión de un polímero fusible biodegradable, que comprende además opcionalmente un material incorporable, según se definió anteriormente, en el contexto del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido por un experto. Dichos métodos pueden comprender cualquiera de los métodos de electroprocesamiento, según se definieron anteriormente, preferiblemente

métodos de electrohilado, electropulverización, electrorrociado, electrodeposición y electroaspersión de materiales, combinaciones de dos o más de dichos métodos, y cualquier otro método en el que los polímeros se puedan verter, pulverizar, asperjar o gotear a lo largo de un campo eléctrico y hacia un objetivo. Los poliésteres electroprocesados se pueden electroprocesar a partir de uno o más reservorios conectados a tierra en la dirección de un sustrato preferiblemente cargado o a partir de reservorios preferiblemente cargados hacia un objetivo conectado a tierra.

Alternativamente y más preferiblemente, formar la al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable con el polímero fundido, con la suspensión o disolución de un material incorporable, según se definió anteriormente, y/o con una fusión de un polímero fusible biodegradable, que comprende, además, opcionalmente un material incorporable, según se definió anteriormente, en el contexto del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede llevar a cabo a través de técnicas de formación rápida de prototipos, preferiblemente a través de ploteo 3D, por ejemplo, utilizando un ploteador 3D (por ejemplo, 3D-BioPlotter de la empresa Envisiontec). En este contexto, la formación rápida de prototipos se entenderá, preferiblemente, como una construcción automática de objetos físicos utilizando tecnología de fabricación aditiva. Dicha tecnología, típicamente, utiliza fabricación aditiva de un polímero fusible para la formación rápida de prototipos de diseños virtuales a partir de diseño asistido por ordenador (CAD, por sus siglas en inglés) o programas informáticos de modelado por animación, los transforma en secciones transversales delgadas, virtuales, horizontales y luego crea capas sucesivas hasta completar el modelo.

Según un aspecto particularmente preferido, la al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable puede formarse a partir de un polímero fundido, con la suspensión o disolución de un material incorporable, según se definió anteriormente, y/o con una fusión de un polímero fusible biodegradable, que comprende además opcionalmente un material incorporable, según se definió anteriormente, preferiblemente utilizando un ploteador 3D. El ploteo 3D se puede llevar a cabo, por ejemplo, al fundir el polímero o preparar una suspensión o disolución de un material incorporable, según se definió en la presente, y proporcionar el polímero fundido o la suspensión o disolución sobre una superficie, por ejemplo, a través de un dispensador de un ploteador 3D, que forma una capa simple deseada tras el movimiento del dispensador. El dispensador generalmente prensa o bombea el polímero fundido o suspensión o disolución a través de una boquilla del dispensador sobre una superficie, según se definió en la presente, por ejemplo, a través de presión de aire. Preferiblemente, el dispensador se puede mover en cualquier sentido deseado (arriba, abajo, izquierda, derecha, hacia adelante, hacia atrás), preferiblemente con una velocidad ajustable, para formar una estructura deseada. Durante el movimiento del dispensador, el polímero fundido o suspensión o disolución sale, preferiblemente, a presión a través de la boquilla y proporciona, por ejemplo, fibras, cintas, puntos, etc., o cualquier forma que se desea u obtiene, preferiblemente, debido a la forma de la boquilla. Tras formar las fibras, cintas, puntos, etc., se forma, preferiblemente, una estructura en 3D predeterminada. Dicha estructura en 3D puede comprender una capa simple del polímero o material incorporable o puede estar compuesta por varias capas simples del polímero o material incorporable, tal como ya se describió en la presente. Dichas capas simples también pueden formar un conjunto de capas, tal como ya se definió anteriormente, para el al menos un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y preferiblemente biodegradable. Dicho conjunto de capas puede estar compuesto por una o más capas simples, es decir, el conjunto de capas puede comprender, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1 a 15, 10 a 25, 15 a 30, 10 a 50 o 10 a 100 o incluso más capas simples del polímero o el material incorporable. Dicha capa o conjunto de capas del polímero o material incorporable puede comprender un espesor de varios nm hasta alrededor de varios μm o incluso mm, preferiblemente en el intervalo de alrededor de 100 nm a alrededor de 5 mm, alrededor de 100 nm a alrededor de 4 mm, alrededor de 100 nm a alrededor de 3 mm, alrededor de 100 nm a alrededor de 2 mm o alrededor de 100 nm a alrededor de 1 mm, más preferiblemente alrededor de 1 μm a alrededor de 2 mm, alrededor de 1 μm a alrededor de 1 mm, alrededor de 1 μm a alrededor de 500 μm , alrededor de 1 μm a alrededor de 250 μm , alrededor de 10 μm a alrededor de 250 μm o alrededor de 10 μm a alrededor de 100 μm , etc.

Durante el ploteo 3D, la temperatura se puede ajustar según sea adecuado. Si se utiliza un polímero fusible biocompatible y preferiblemente biodegradable, opcionalmente complementado con un material incorporable, según se definió en la presente, el ploteo 3D se lleva a cabo, típicamente, a una temperatura en la que el polímero fusible biocompatible y preferiblemente biodegradable, según se definió en la presente, está presente en forma fundida, donde la temperatura típicamente se ajusta para mantener el polímero fundido hasta la extrusión a través de la boquilla o aguja. Asimismo, si se utiliza una suspensión o disolución de un material incorporable, según se definió anteriormente, típicamente no es necesario aplicar temperaturas elevadas. Por consiguiente, las temperaturas de aplicación y trabajo se seleccionan, típicamente, dependiendo de los requisitos específicos de cada polímero fusible biocompatible y preferiblemente biodegradable o material incorporable, según se definió anteriormente. Las temperaturas se pueden ajustar utilizando, por ejemplo, un cabezal/módulo de temperatura alta o de temperatura baja para la aplicación del polímero fundido y/o la suspensión o disolución de un material incorporable, según se definió anteriormente. El cabezal/módulo de temperatura baja puede, asimismo, enfriarse (por ejemplo, $<0\text{ }^{\circ}\text{C}$), mientras que el cabezal/módulo de temperatura alta puede calentarse hasta la temperatura deseada, por ejemplo, hasta los $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ o incluso $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ o incluso más. La boquilla o aguja se puede mover, por ejemplo, con una velocidad de propulsor de alrededor de 1 a alrededor de 1000 mm/minuto. La resolución del eje x/y/z puede ser de alrededor de 0,05 mm, por ejemplo, entre alrededor de 10 μm a alrededor de 1 mm. La presión

aplicada para la extrusión del polímero fundido o suspensión o disolución puede ser de alrededor de 0 a alrededor de 5 bar.

5 Formar al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable con el polímero fundido, con la suspensión o disolución de un material incorporable, según se definió anteriormente, y/o con una fusión del polímero fusible biodegradable, que comprende, además, opcionalmente un material incorporable, según se definió anteriormente, en el contexto del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede llevar a cabo sobre cualquier soporte adecuado, un conjunto de capas ya preparado que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, según se definió anteriormente, sobre al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable, según se definió anteriormente, etc., o cualquier superficie o soporte adecuado para este fin, por ejemplo, una placa de acero, papel, vidrio, un portaobjetos de vidrio o cualquier portaobjetos, una placa de petri, una superficie de Teflón, por ejemplo, una lámina de Teflón, una parapelícula, una placa de aluminio, una lámina de aluminio, una lámina de plástico, etc. En este contexto, el soporte o superficie puede ser una forma o un molde, que se parece a la estructura en 3D de un fragmento de tejido que se reconstituirá, etc. El ploteo 3D de polímeros fundidos se lleva a cabo, preferiblemente, sobre una lámina de Teflón, dado que la capa de polímero/soporte ploteada puede liberarse fácilmente de esta superficie.

La forma y espesor de la o las capas de la capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable pueden ajustarse adicionalmente según sea adecuado, preferiblemente, tal como ya se describió en la presente, para el al menos un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y preferiblemente biodegradable. En particular, cualquiera de dichos parámetros, por ejemplo, la distancia entre las fibras, si se producen fibras, el tamaño de poro, el espesor, etc. se puede aplicar a la capa de soporte o conjunto de capas, tal como ya se describió anteriormente para el al menos un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y preferiblemente biodegradable.

Según un aspecto adicional particularmente preferido, la al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable puede formarse a partir de un material incorporable biocompatible, según se definió anteriormente. Con este fin, el material incorporable biocompatible preferiblemente, se disuelve o suspende, en un disolvente y se proporciona sobre una superficie para formar una estructura 3D predeterminada. Según un ejemplo, se puede formar una capa de soporte de cerámica de hidroxiapatita al disolver alcohol polivinílico (PVA) (10 % (en peso), Mowiol 28-99, Clariant GmbH, Frankfurt a.M., Alemania) en agua destilada caliente. La disolución/suspensión obtenida de esta manera (por ejemplo, 2 partes) a continuación puede mezclarse con hidroxiapatita (por ejemplo, 1 parte, por ejemplo, polvo microfino Typ SF C13-09, Chemische Fabrik Budenheim, Mainz, Alemania). Después, la mezcla preferiblemente se tamiza para extraer los coágulos o aglomeraciones (100 µm, Retsch, Haan, Alemania). A continuación, la mezcla preferiblemente se aplica sobre una superficie, según se definió anteriormente, utilizando un ploteador 3D (Envisiontec, Gladbeck, Alemania). La temperatura de procesamiento puede ser alrededor de la temperatura ambiente. La estructura de soporte puede tener, por ejemplo, una forma, según se definió en la presente, por ejemplo, una estructura similar a una red o malla. La estructura de soporte se puede almacenar hasta el uso, por ejemplo, en forma congelada. El congelamiento, preferiblemente, se lleva a cabo, inmediatamente después de la preparación de la estructura de soporte, por ejemplo, a alrededor de -30 °C inicialmente, reduciendo de la temperatura, preferiblemente, hasta alrededor de -200 °C y secando por congelamiento la estructura de soporte (por ejemplo, en un Lyovac GT 2, Amsco/Finn-Aqua, Hürth, Alemania). A efectos de extraer el alcohol polivinílico (PVA) de la estructura de soporte, la estructura de soporte preferiblemente se sinteriza u hornea (por ejemplo, alrededor de 5 h (alrededor de 2 a alrededor de 10 h), a alrededor de 350 °C (alrededor de 200 °C a alrededor de 600 °C)) al menos una vez. En un paso adicional, la estructura de soporte se puede sinterizar nuevamente (por ejemplo, alrededor de 12 h (alrededor de 5 a alrededor de 20 h), a alrededor de 1100 °C (alrededor de 500 °C a alrededor de 2000 °C)), lo que conduce, preferiblemente, al sinterizado de las partículas de hidroxilo apatita hasta una capa de soporte cerámica.

La al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable se puede almacenar, secar por congelamiento, esterilizar, esterilizar con plasma, etc., antes del uso con al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable adicional o un polímero fusible biodegradable y biocompatible o material incorporable del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención.

La al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención puede tener cualquier forma adecuada. Las formas adecuadas comprenden, pero no se limitan a, cintas, hebras, telas, fibras, partículas, gotas o estructuras similares a redes o mallas. Las formas adecuadas también pueden comprender planchas, películas, láminas o laminados. Preferiblemente, la al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención está en forma de cintas, hebras, una tela, fibras, partículas, gotas, una estructura similar a una red o malla, una plancha, una película, una lámina o un laminado. Cualquiera de estas estructuras puede producirse con o sin agujeros o cavidades.

La preparación de la al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede llevar a cabo por separado e independientemente de la preparación del al menos un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, según se definió anteriormente.

5 Según un aspecto muy específico, la al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable, según se definió en la presente, se puede preparar utilizando los siguientes pasos:

10 (i) proporcionar un polímero fusible biocompatible y preferiblemente biodegradable fundido, según se definió en la presente, una suspensión o disolución de un material incorporable biocompatible, según se definió en la presente, y/o una fusión de un polímero fusible biocompatible y preferiblemente biodegradable, que comprende, además, opcionalmente un material incorporable biocompatible, según se definió en la presente; y

15 (ii) electroprocesar o plotear en 3D el polímero fusible biocompatible y preferiblemente biodegradable fundido, según se definió en la presente, una suspensión o disolución de un material incorporable biocompatible, según se definió en la presente, y/o una fusión de un polímero fusible biocompatible y preferiblemente biodegradable, que comprende, además, opcionalmente un material incorporable biocompatible, según se definió en la presente, sobre una superficie, según se definió en la presente.

20 En el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención el al menos un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado preferiblemente biodegradable y la al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable, según se definió en la presente, pueden disponerse juntos para formar el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención. Dicha disposición puede comprender cualquier cantidad de las capas o conjuntos de capas de cualquier tipo, según se definieron en la presente y según sea adecuado para un fin específico.

25 Por ejemplo, el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede formar al proporcionar, como primer elemento, al menos un conjunto de capas (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o incluso más conjuntos de capas), cada conjunto de capas comprende el mismo o un polímero reticulado biocompatible y biodegradable diferente, según se definió en la presente, y aplicar como segundo elemento al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable o conjunto de capas, según se definieron en la presente, sobre este primer elemento.

30 Asimismo, el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede formar al proporcionar, como primer elemento, al menos un conjunto de capas que comprende el mismo o un polímero reticulado biocompatible y biodegradable diferente, según se definió en la presente, aplicar como segundo elemento al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable o conjunto de capas, según se definieron en la presente, sobre este primer elemento y aplicar, como tercer elemento, nuevamente al menos un conjunto de capas que comprende el mismo o un polímero reticulado biocompatible y biodegradable diferente, según se definió en la presente, sobre el segundo elemento. La orientación de las capas puede ser según sea adecuada, por ejemplo, el primer y tercer conjunto de capas pueden orientarse entre sí en el mismo sentido o viceversa. Asimismo, la segunda capa o conjunto de capas puede orientarse hacia el primer o tercer conjunto de capas en el mismo sentido o viceversa.

Según un aspecto muy específico, el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede preparar utilizando los siguientes pasos:

40 (i) opcionalmente proporcionar y preparar una disolución polimérica para electroprocesamiento, preferiblemente al disolver un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, según se definió en la presente, preferiblemente en un disolvente, según se definió en la presente, opcionalmente en presencia de un reticulador, según se definió en la presente, al disolver un polímero biocompatible y biodegradable, según se definió en la presente y un reticulador, según se definió en la presente, preferiblemente en un disolvente, según se definió en la presente o al fundir un biocompatible y biodegradable, según se definió en la presente, opcionalmente en presencia de un reticulador, según se definió en la presente;

50 (ii) opcionalmente electroprocesar al menos un conjunto de capas a partir de la disolución polimérica, formando así un conjunto de capas de 3 dimensiones, en el que se forma un gradiente, según se definió en la presente, preferiblemente al alterar la resistencia de las fibras del conjunto de capas, según se definió en la presente, más preferiblemente, al aumentarla o reducirla, mientras se lleva a cabo el proceso de electroprocesamiento; y opcionalmente moldear el conjunto de capas producido. Si se utilizó un disolvente, el disolvente preferiblemente se volatiliza en el paso (ii) durante el paso de electroprocesamiento de la disolución polimérica;

55 (iii) proporcionar un polímero fusible biocompatible y preferiblemente biodegradable fundido, según se definió en la presente, una suspensión o disolución de un material incorporable biocompatible, según se definió en la presente, y/o una fusión de un polímero fusible biocompatible y preferiblemente biodegradable, que comprende, además, opcionalmente un material incorporable biocompatible, según se definió en la presente;

(iv) electroprocesar o plotear en 3D el polímero fusible biocompatible y preferiblemente biodegradable fundido, según se definió en la presente, una suspensión o disolución de un material incorporable biocompatible, según se definió en la presente, y/o una fusión de un polímero fusible biocompatible y preferiblemente biodegradable, que comprende, además, opcionalmente un material incorporable biocompatible, según se definió en la presente, sobre una superficie, según se definió en la presente;

(v) opcionalmente proporcionar y preparar una disolución polimérica para electroprocesamiento, preferiblemente al disolver un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, según se definió en la presente, preferiblemente en un disolvente, según se definió en la presente, opcionalmente en presencia de un reticulador, según se definió en la presente, al disolver un polímero biocompatible y biodegradable, según se definió en la presente, y un reticulador, según se definió en la presente, preferiblemente en un disolvente, según se definió en la presente o al fundir un biocompatible y biodegradable, según se definió en la presente, opcionalmente en presencia de un reticulador, según se definió en la presente; y

(vi) opcionalmente electroprocesar al menos un conjunto de capas a partir de la disolución polimérica, formando así un conjunto de capas de 3 dimensiones, en el que se forma un gradiente, según se definió en la presente, preferiblemente al alterar la resistencia de las fibras del conjunto de capas, según se definió en la presente, más preferiblemente, al aumentarla o reducirla, mientras se lleva a cabo el proceso de electroprocesamiento; y opcionalmente moldear el conjunto de capas producido. Si se utilizó un disolvente, el disolvente preferiblemente se volatiliza en el paso (ii) durante el paso de electroprocesamiento de la disolución polimérica.

Después de la preparación del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención, según se describió anteriormente, el sistema de capas en gradiente se lava, preferiblemente, al menos una vez, dos veces o incluso más (3, 4 o 5 veces o más), preferiblemente con agua, un tampón, tal como un tampón utilizado para cultivar las células descritas en la presente, etc.

El sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención, según se describió anteriormente, también se puede complementar mediante un conjunto de capas adicional que comprende un polímero biocompatible y biodegradable, según se definió en la presente, y/o mediante al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable adicional, donde la al menos una capa o conjunto de capas ha sido modificado con un compuesto polifenol, según se definió anteriormente.

Se puede llevar a cabo cualquier forma adicional del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención. Precisamente, cualquiera de las diferentes capas y/o conjuntos de capas, particularmente cualquiera del al menos un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y preferiblemente biodegradable y/o cualquiera de la al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable puede estar contenida en el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención en cualquier cantidad y cualquier orientación. Por lo tanto, cabe señalar que el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención no está restringido a ninguna disposición específica de las capas o conjuntos de capas.

El sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención puede comprender, además, células. Dichas células comprenden, preferiblemente, pero no se limitan a, células madre (de mamíferos, humanos o no humanos) seleccionadas de, células madre comprometidas, células diferenciadas, células madre adultas, células madre embrionarias, células madre de médula ósea y células madre de cordón umbilical, células madre manipuladas o no manipuladas, células madre primarias o inmortalizadas, preferiblemente, células madre mesenquimales. Otros ejemplos de células utilizadas en diversos aspectos incluyen, pero no se limitan a, células de cartílago, células epiteliales, células endoteliales, células endoteliales de tejido vascular y corneal, células cutáneas, osteocitos, osteoblastos, cementoblastos, células óseas, mioblastos, neuroblastos, células fibroblastos de todos los tejidos conjuntivos, fibroblastos gingivales y/o cutáneos y corneales, ya sean solo o junto con fibroblastos de ligamento periodontal, queratinocitos, por ejemplo, queratinocitos gingivales y queratinocitos de la cavidad oral y las vías aéreas digestivas superiores, así como también de la piel y la superficie ocular, glioblastos, células germinales no humanas, hepatocitos, condrocitos, células de músculo liso, células de músculo cardíaco, células de tejido conjuntivo, células gliales, células que secretan hormonas, células del sistema inmunitario y neuronas, pero también, por ejemplo, células del sistema nervioso central, células neuronales, pericitos, miocitos, adipocitos, astrocitos, melanocitos, etc. En algunos aspectos, no es necesario preseleccionar el tipo de célula madre que se utilizará, debido a que se puede inducir la diferenciación de muchos tipos de células madre en un patrón específico de un órgano, una vez que se suministran a un órgano dado. Por ejemplo, se puede inducir que una célula madre suministrada al hígado se convierta en una célula hepática simplemente al colocar la célula madre dentro del hígado. Las células en la matriz pueden servir para proporcionar una base o siembra, producir ciertos compuestos o ambos. Las células con el significado mencionado anteriormente también pueden comprender células de tejido viables para determinados usos terapéuticos. Es preferible, pero no necesario, que las células de tejido se originen del mismo tipo de tejido para el cual se utilizará el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención de forma terapéutica. Las células de tejido viables se pueden derivar de fuentes de tejido autólogas, fuentes de tejido alogénas o fuentes de tejido xenógenas. El término «autólogo/a» hace referencia

al tejido que se origina del mismo hospedador. El término «alógeno/a» hace referencia al tejido que se origina de una fuente que es de la misma especie (es decir, humana) pero no tiene una composición genética idéntica. El término «xenógeno/a» hace referencia al tejido que se origina de especies diferentes de la del hospedador. Los ejemplos no limitantes de los tipos de células que se pueden utilizar en combinación con el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención incluyen células madre, células óseas, tenocitos, adipocitos, cardiomiocitos, hepatocitos, células de músculo liso, células endoteliales y similares. Las células de tejido se pueden agregar al sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención antes, durante o después de que se lleve a cabo la reticulación. Las células, como se usan en la presente, también pueden comprender una mezcla de células, según se definieron anteriormente.

Las células, como se definieron anteriormente, preferiblemente se cultivan en el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención, según se definió en la presente, por ejemplo, en un medio de cultivo adecuado para el tipo de células específico. Las células también se pueden colocar en un lumen o espacio dentro de una construcción, o implantarse adyacentes al sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención para facilitar el crecimiento. Alternativamente, el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede colocar en un biorreactor. Existen varios tipos de biorreactores disponibles en el mercado, dispositivos diseñados para proporcionar un ambiente de perfusión con alto contenido de nutrientes y bajo nivel de cizallamiento. Hasta hace poco tiempo, la mayoría de los biorreactores mantenían las células en suspensión y suministraban nutrientes y oxígeno por medio de burbujeo, a través del uso de impulsores u otros medios de agitación.

El sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención puede comprender, además, células que se pueden cultivar *in vitro*, derivar de una fuente natural, manipular genéticamente o producir mediante cualquier otro medio. Se puede utilizar cualquier fuente natural de células procariontes o eucariontes, por ejemplo, células según se definieron anteriormente. Los aspectos en los que el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se implanta en un organismo pueden utilizar células del receptor, células de un donante conespecífico o un donante de una especie diferente, o bacterias o células microbianas. Se incluyen las células cosechadas a partir de una fuente y cultivadas antes del uso.

Según un aspecto particular, las células según se contienen en el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención pueden contener células que han sido manipuladas genéticamente. La manipulación implica programar la célula para expresar uno o más genes, reprimir la expresión de uno o más genes, o ambos. Un ejemplo de células manipuladas genéticamente útiles en la presente invención es una célula manipulada genéticamente que produce y secreta una o más moléculas deseadas. Cuando el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención comprende células manipuladas genéticamente y se implementa o trasplanta en un organismo, las moléculas producidas pueden producir un efecto local o un efecto sistémico y pueden incluir las moléculas identificadas anteriormente como sustancias posibles. Las células pueden producir también materiales antigénicos en aspectos en los que uno de los fines del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención es producir una respuesta inmunitaria. Las células pueden producir sustancias para auxiliar en la siguiente lista no taxativa de propósitos: inhibir o estimular la inflamación; facilitar la curación; resistir el inmunorechazo, proporcionar reemplazo hormonal; reemplazar neurotransmisores; inhibir o destruir células cancerosas; promover el crecimiento celular; inhibir o estimular la formación de vasos sanguíneos; aumentar el tejido; y complementar o reemplazar neuronas, piel, epitelio en general, líquido sinovial, tendones, cartílago, ligamentos, hueso, músculo, órganos, duramadre, vasos sanguíneos, médula ósea y matriz extracelular. La manipulación genética puede implicar, por ejemplo, agregar o extraer material genético a o desde una célula, alterar el material genético existente, o ambos. Los aspectos en los que las células se transfectan o manipulan de otra forma para expresar un gen pueden utilizar genes transfectados de forma transitoria o permanente, o ambos. Las secuencias génicas pueden ser completas o de longitud parcial, clonadas o de origen natural.

Se entenderá que el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención puede combinarse o complementarse con otros materiales y/o sustancias. Por ejemplo, un sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención puede combinarse o complementarse con un adyuvante para potenciar la inmunogenicidad cuando se implanta subcutáneamente. Asimismo, un sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención puede combinarse o complementarse con un agente farmacéutico. Como ejemplo adicional, un sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención que contiene células, puede combinarse o complementarse con, por ejemplo, interleucinas y/o factores de crecimiento para estimular el crecimiento y división de las células en el sistema de capas en gradiente.

Según un aspecto, el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención puede comprender un agente farmacéutico. Los agentes farmacéuticos adecuados en la presente pueden ser orgánicos o inorgánicos y pueden estar en fase sólida, semisólida, líquida o gaseosa. Las moléculas pueden estar presentes en combinaciones o mezclas con otras moléculas, y pueden estar en disolución, suspensión, o cualquier otra forma. Los ejemplos de clases de moléculas que pueden utilizarse incluyen sustancias terapéuticas para uso

humano o veterinario, cosméticos, nutracéuticos, productos agrícolas tales como herbicidas, pesticidas y fertilizantes, vitaminas, sales, electrolitos, aminoácidos, péptidos, polipéptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, glicoproteínas, lipoproteínas, glicolípidos, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores, feromonas, calonas, prostaglandinas, inmunoglobulinas, monocinas y otras citocinas, humectantes, metales, gases, minerales, plastificantes, iones, materiales eléctricamente y magnéticamente reactivos, materiales sensibles a la luz, antioxidantes, compuestos fenólicos, compuestos monofenólicos o compuestos polifenólicos, preferiblemente, según se definieron anteriormente, por ejemplo, curcumina, resveratrol, sus derivados relacionados, ácido gálico, ácido clorógeno, ácido cafeico, carnosol, capsaicina, 6-shogaol, 6-gingerol y sus derivados correspondientes, flavonoides, flavanoles, neoflavonoides, ácidos fenólicos, etc., tales como, por ejemplo, arbutina, cinarina, apigenina, isocutelareína, luteolina, nobiletina, tangeretina, tectocrisina, galangina, caempferol, miricetina, quercetina, rutina, citrina, curcucocitrina, eriodictiol, hesperidina, naringenina, naringina, pinocembrina, quercitrina, biocanina A, crisina, daidzeína, eculol, formononetina, genisteína, gliceteína, ipriflavona, lactuina, lactuina, picrogenol, silimarina, lignina, etc., o un compuesto curcumoide, tal como, curcumina, desmetoxicurcumina, bis-desmetoxicurcumina, etc., catecolaminas o catecolaminas, tales como, por ejemplo, catecol, epinefrina, noradrenalina, norepinefrina, dopamina, y cualquier otro compuesto que incluye un resto catecol o 1,2-dihidroxibenceno, moléculas que se pueden metabolizar como fuente de energía celular, antígenos, y cualesquiera moléculas que pueden provocar una respuesta celular o fisiológica. Se puede utilizar cualquier combinación de moléculas, así como agonistas o antagonistas de estas moléculas.

Los agentes farmacéuticos pueden incluir además cualquier molécula o sustancia terapéutica incluidos, sin limitación, cualquier sustancia farmacéutica o fármaco. Los ejemplos de agente farmacéuticos incluyen, pero no se limitan a, anestésicos, hipnóticos, sedativos e inductores del sueño, antipsicóticos, antidepresivos, antialérgicos, antianginales, antiartríticos, antiasmáticos, antidiabéticos, fármacos antidiarreicos, anticonvulsivos, fármacos antigota, antihistaminas, antipruríticos, eméticos, antieméticos, antiespasmódicos, supresores del apetito, sustancias neuroactivas, agonistas neurotransmisores, antagonistas, bloqueadores de receptores y moduladores de reabsorción, bloqueadores beta-adrenérgicos, bloqueadores de canales de calcio, disulfiram y fármacos similares a disulfiram, relajantes musculares, analgésicos, antipiréticos, estimulantes, agentes anticolinesterasa, agentes parasimpatomiméticos, hormonas, anticoagulantes, antitrombóticos, trombolíticos, inmunoglobulinas, inmunosupresores, agonistas/antagonistas hormonales, vitaminas, agentes antimicrobianos, antineoplásicos, antiácidos, digestivos, laxantes, catárticos, antisépticos, diuréticos, desinfectantes, fungicidas, ectoparasiticidas, antiparasitarios, metales pesados, antagonistas de metales pesados, agentes quelantes, gases y vapores, alcaloides, sales, iones, autacoides, digitálicos, glicósidos cardíacos, antiarrítmicos, antihipertensivos, vasodilatadores, vasoconstrictores, antimuscarínicos, agentes estimulantes ganglionares, agentes bloqueadores ganglionares, agentes bloqueadores neuromusculares, inhibidores de nervio adrenérgico, antioxidantes, vitaminas, cosméticos, antiinflamatorios, productos para cuidado de heridas, agentes antitrombógenos, agentes antitumorales, agentes antiangiogénicos, anestésicos, agentes antigénicos, agentes para curación de heridas, extractos vegetales, factores de crecimiento, emolientes, humectantes, fármacos para rechazo/antirrechazo, espermicidas, acondicionadores, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes antivíricos, antibióticos, tranquilizantes, fármacos reductores del colesterol, antitusivos, fármacos bloqueadores de la histamina, inhibidor de monoaminoxidasa. Todas las sustancias indicadas por la Farmacopea de los Estados Unidos también se incluyen dentro de las sustancias de la presente invención.

El sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención puede incluir además sustancias terapéuticas seleccionadas de, pero que no se limitan a, sustancias antineoplásicas, antimetabólicas, antiinflamatorias, antiplaquetarias, anticoagulantes, antifibrina, antitrombina, antiproliferativas, antibióticas, antioxidantes y antialérgicas, así como también sus combinaciones. Los ejemplos de dichos antineoplásicos y/o antimetabólicos incluyen paclitaxel (por ejemplo, TAXOL[®] de Bristol-Myers Squibb Co., Stamford, Conn.), docetaxel (por ejemplo, Taxotere de Aventis S. A., Frankfurt, Alemania), metotrexato, azatioprina, vincristina, vinblastina, fluorouracil, clorhidrato de doxorubicina (por ejemplo, Adriamycin[®] de Pharmacia & Upjohn, Peapack N.J.) y mitomicina (por ejemplo, Mutamycin[®] de Bristol-Myers Squibb Co., Stamford, Conn.). Los ejemplos de dichas antiplaquetarias, anticoagulantes, antifibrina y antitrombina incluyen heparina sódica, heparinas de bajo peso molecular, heparinoides, hirudina, argatroban, forskolina, vapirost, prostaciclina y análogos de prostaciclina, dextrano, D-fe-proargclorometilcetona (antitrombina sintética), dipiridamol, anticuerpo antagonista del receptor de la membrana plaquetaria de glicoproteína IIb/IIIa, hirudina recombinante e inhibidores de trombina tales como Angiomax[™] (Biogen, Inc., Cambridge, Mass.). Los ejemplos de dichos agentes citostáticos o antiproliferativos incluyen angiopeptina, inhibidores de enzima convertidora de angiotensina tales como captopril (por ejemplo, Capoten[®] y Capozide[®] de Bristol-Myers Squibb Co., Stamford, Conn.), cilazapril o lisinopril (por ejemplo, Prinivil[®] y Prinzide[®] de Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, N.J.), bloqueadores de canales de calcio (tales como nifedipina), colquicina, antagonistas del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés), aceite de pescado (ácido graso omega 3), antagonistas de histamina, lovastatina (un inhibidor de HMG-CoA reductasa, un fármaco que reduce el colesterol, nombre comercial Mevacor[®] de Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, N.J.), anticuerpos monoclonales (tales como aquellos específicos para receptores de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés)), nitroprusiato, inhibidores de fosfodiesterasa, inhibidores de prostaglandina, suramina, bloqueadores de serotonina, esteroides, inhibidores de tioproteasa, triazolopirimidina (un antagonista de

PDGF) y óxido nítrico. Un ejemplo de un agente antialérgico es potasio de permirolast. Otras sustancias o agentes terapéuticos que pueden utilizarse incluyen alfa-interferón, células epiteliales genéticamente manipuladas y dexametasona. En otros ejemplos, la sustancia terapéutica es un isótopo radiactivo para uso del dispositivo incorporable en procedimientos radioterapéuticos. Los ejemplos de isótopos radioactivos incluyen, pero no se limitan a, ácido fosfórico ($H_3P^{32}O_4$), paladio (Pd^{103}), cesio (CS^{131}) y yodo (I^{125}).

Además, el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención puede cultivarse con o puede complementarse con otros componentes o sustancias. Dichos componentes y sustancias pueden incluir, por ejemplo, cualquier molécula, por ejemplo, orgánica o inorgánica, en fase sólida, semisólida, líquida o gaseosa. Las moléculas pueden estar presentes en combinaciones o mezclas con otras moléculas, y pueden estar en disolución, suspensión, o cualquier otra forma. Los ejemplos de clases de moléculas que pueden utilizarse incluyen sustancias terapéuticas para uso humano o veterinario, nutracéuticos, vitaminas, sales, electrolitos, aminoácidos, péptidos, polipéptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, glicoproteínas, lipoproteínas, glicolípidos, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores, feromonas, calonas, prostaglandinas, inmunoglobulinas, monocinas y otras citocinas, humectantes, metales, gases, minerales, plastificantes, iones, materiales eléctricamente y magnéticamente reactivos, materiales sensibles a la luz, antioxidantes, moléculas que se pueden metabolizar como fuente de energía celular, antígenos, y cualesquiera moléculas que pueden provocar una respuesta celular o fisiológica. Se puede utilizar cualquier combinación de moléculas, así como agonistas o antagonistas de estas moléculas.

Otros componentes preferidos que pueden estar contenidos en el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención implican factores de crecimiento. Los factores de crecimiento útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento transformante α («TGF- α », por sus siglas en inglés), factor de crecimiento transformante β («TGF- β », por sus siglas en inglés), factores de crecimiento derivados de plaquetas incluidas las isoformas AA, AB y BB («PDGF»), factor de crecimiento de fibroblastos («FGF»), incluidas las isoformas ácidas de FGF 1 y 2, la forma básica de FGF 2 y FGF 4, 8, 9 y 10, factores de crecimiento nervioso («NGF», por sus siglas en inglés) incluidos NGF 2,5s, NGF 7,0s y beta NGF y neurotrofinas, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor derivado del cartílago, factores de crecimiento óseo (BGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento similar a insulina (IGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), factores estimulantes de colonias, tales como, por ejemplo, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés) o el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento similar a insulina (IGF, por sus siglas en inglés) I y II, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento neurotrófico glial (GDNF, por sus siglas en inglés), factor de células madre (SCF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF, por sus siglas en inglés), factores de crecimiento transformantes (TGF, por sus siglas en inglés), incluidos TGF alfa, beta, beta1, beta2 y beta3, factor de crecimiento esquelético, factores de crecimiento derivados de la matriz ósea y factores de crecimiento derivados del hueso y sus mezclas. Algunos factores de crecimiento preferidos incluyen VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), NGF (factores de crecimiento nervioso), PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, FGFb, FGFa y BGF.

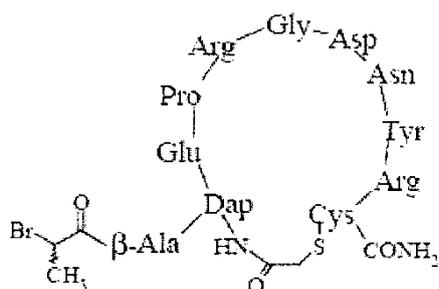
Las citocinas que pueden estar contenidas, asimismo, en el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención, incluyen, pero no se limitan a, cardiotrofina, factor derivado de célula estromal, quimiocina derivada de macrófago (MDC, por sus siglas en inglés), actividad estimulante de crecimiento de melanoma (MGSA, por sus siglas en inglés), proteínas inflamatorias de macrófagos 1 alfa (MIP-1 alfa, por sus siglas en inglés), 2, 3 alfa, 3 beta, 4 y 5, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17 e IL-18, TNF- α y TNF- β . Las inmunoglobulinas útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, IgG, IgA, IgM, IgD, IgE y sus mezclas. Otras moléculas que pueden estar contenidas en el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención incluyen, pero no se limitan a, leptina, factor inhibidor de leucemia (LIF, por sus siglas en inglés), GLP-1, endostatina, angiostatina, trombospondina, proteína osteogénica-1, proteínas morfogenéticas óseas 2 y 7, osteonectina, péptido similar a somatomedina, osteocalcina, interferón alfa, interferón alfa A, interferón beta, interferón gamma, interferón 1 alfa.

El sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención puede comprender, además, un péptido o secuencia RGD, preferiblemente un péptido de unión a RGD repetitivo, más preferiblemente que tiene la fórmula $(RGD)_n$, para unión o adhesión de células al mismo. Típicamente, dicho péptido de unión a RGD repetitivo de fórmula $(RGD)_n$ de la proteína de fusión multifuncional puede ser un péptido que contiene al menos una secuencia de péptido RGD, preferiblemente al menos dos secuencias de péptido RGD o incluso tres, cuatro, cinco o más secuencias de péptido de RGD, es decir, n puede ser 1, 2, 3, 4, 5 o incluso más, preferiblemente, n es 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 2 a 5, 2 a 4, 2 o 3 o 3 a 5, 3 a 4 o 4 a 5. En este contexto, la secuencia de péptido RGD es típicamente una secuencia que contiene los tres aminoácidos (consecutivos) RGD, que es la abreviatura para el código de aminoácidos de una letra para «Arginina-Glicina-Aspartato», preferiblemente en el orden indicado. Dicha secuencia RGD típicamente representa una parte de la secuencia de reconocimiento de integrinas para proteínas de matriz extracelular. En este contexto, las integrinas se conocen como receptores que median el acoplamiento entre una célula y los tejidos circundantes a la misma, es decir, otras células o la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés). Las integrinas también inciden en la señalización celular y, por lo tanto, definen la motilidad, la forma celular

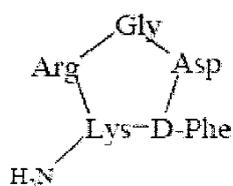
y regulan el ciclo celular. Las secuencias RGD, que pueden utilizarse para el propósito de la invención de permitir la unión de una célula a la proteína de fusión multivalente a través de las integrinas, típicamente derivan de una proteína o péptido ECM que comprende una secuencia de péptido RGD o una secuencia sintética, que en cada caso comprende la secuencia de aminoácidos Arginina-Glicina-Aspartato («RGD» en el código de aminoácidos de una letra). Dichas secuencias de adhesión de células específicas que podrían incorporarse en la proteína de fusión multifuncional de la invención fueron descritas e indicadas, por ejemplo, por Hersel *et al.* (2003) (véase Hersel *et al.*, Biomaterials 24 (2003), 4385-4415). La descripción respectiva en Hersel *et al.* (2003, supra) dirigida a dichas secuencias de péptido RGD específicas y las secuencias RGD específicas, según se describen en la misma, se incorporan preferiblemente en la presente en su totalidad por referencia. Incluso más preferiblemente, dichas secuencias RGD puede seleccionar entre, pero sin limitarse a, al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos: **RGD** (SEQ ID N.º: 1), **RGDS** (SEQ ID N.º: 2), **(RGDS)_n** (SEQ ID N.º: 3), donde n es preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o incluso más, **GRGD** (SEQ ID N.º: 4), **RGDV** (SEQ ID N.º: 5), **RGDT** (SEQ ID N.º: 6), **GRGDG** (SEQ ID N.º: 7), **GRGDS** (SEQ ID N.º: 8), **GRGDY** (SEQ ID N.º: 9), **GRGDF** (SEQ ID N.º: 10), **YRGDS** (SEQ ID N.º: 11), **YRGDG** (SEQ ID N.º: 12), **YGRGD** (SEQ ID N.º: 13), **GRGDSP** (SEQ ID N.º: 14), **GRGDSPG** (SEQ ID N.º: 15), **GRGDSP** (SEQ ID N.º: 16), **GRGDSY** (SEQ ID N.º: 17), **GRGDVY** (SEQ ID N.º: 18), **GRGDSPK** (SEQ ID N.º: 19), **CGRGDSPK** (SEQ ID N.º: 20), **CGRGDSY** (SEQ ID N.º: 21), **YAVTGRGDS** (SEQ ID N.º: 22) (estructura base de tirosina mimético de RGD), **AcCGGNGEPRGD** (SEQ ID N.º: 23), **YRAY-NH₂** (SEQ ID N.º: 24), **AcGCGYGRGDSPG** (SEQ ID N.º: 25), **RGDSPASSKP** (SEQ ID N.º: 26), **AcGRGDSPASSKG** (SEQ ID N.º: 27),

o puede seleccionarse de secuencias RGD cíclicas, tales como

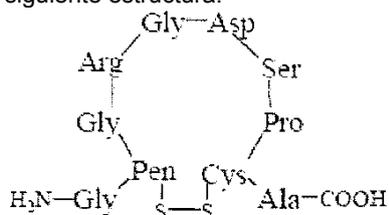
- 20 **βAXEPRGDNYRC** (SEQ ID N.º: 28), donde X representa el aminoácido modificado Dap (ácido 2,3-diamino propiónico), βA representa b-alanina y esta secuencia RGD cíclica tiene la siguiente estructura:



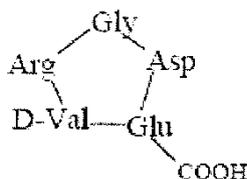
- 25 **KRGDf** (SEQ ID N.º: 29), donde f representa la variante D-aminoácido de fenilalanina, y donde esta secuencia RGD cíclica tiene la siguiente estructura:



- 30 **GPenGRGDSPCA** (SEQ ID N.º: 30), donde Pen representa Penicilina y donde esta secuencia RGD cíclica tiene la siguiente estructura:



- 35 **vRGDE** (SEQ ID N.º: 31), donde v representa la variante D-aminoácido de valina y donde esta secuencia RGD cíclica tiene la siguiente estructura:



5 o se puede seleccionar de una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 80 %, preferiblemente al menos 90 %, más preferiblemente al menos 95 % e incluso más preferiblemente al menos 97,5 % de identidad con respecto a la secuencia de cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 1 a 31.

Un aditivo adicional que puede estar contenido en el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención puede ser un agente antibacteriano. En este contexto, se puede utilizar cualquier agente antibacteriano conocido por un experto en la técnica. Los ejemplos no limitantes de agentes antibacterianos incluyen Amikacina, Amoxicilina, Amoxicilina-ácido clavulánico, Amfotericina-B, Ampicilina, Ampicilina-sulbactam, Apramicina, Azitromicina, Aztreonam, Bacitracina, Bencilpenicilina, Caspofungina, Cefaclor, Cefadroxilo, Cefalexina, Cefalotina, Cefazolina, Cefdinir, Cefepime, Cefixima, Cefmenoxima, Cefoperazona, Cefoperazona-sulbactam, Cefotaxima, Cefoxitina, CefpiromA, Cefpodoxima, Cefpodoxima-ácido clavulánico, Cefpodoxima-sulbactam, Cefbrozil, Cefquinoma, Ceftazidima, Ceftibutina, Ceftiofur, Ceftobiprol, Ceftriaxona, Cefuroxima, Cloranfenicol, 15 Florfenicol, Ciprofloxacin, Claritromicina, Clinafloxacin, Clindamicina, Cloxacilina, Colistina, Cotrimoxazol (Trimtoprim/sulfametoxazol), Dalbavancina, Dalfopristina/Quinopristina, Daptomicina, Dibecacina, Dicloxacilina, Doripenem, Doxiciclina, Enrofloxacin, Ertapenem, Eritromicina, Flucloxacilina, Fluconazol, Flucitossina, Fosfomicina, Ácido Fusídico, Garenoxacin, Gatifloxacin, Gemifloxacin, Gentamicina, Imipenem, Itraconazol, Kanamicina, Ketoconazol, Levofloxacin, Lincomicina, Linezolid, Loracarbef, Mecilinam (amdinocilina), Meropenem, Metronidazol, 20 Meziocilina, Mezlocilina-sulbactam, Minociclina, Moxifloxacin, Mupirocina, Ácido Nalidíxico, Neomicina, Netilmicina, Nitrofurantoina, Norfloxacin, Ofloxacin, Oxacilina, Pefloxacin, Penicilina V, Piperacilina, Piperacilina-sulbactam, Piperacilina-tazobactam, Rifampicina, Roxitromicina, Sparfloxacin, Espectinomina, Espiramicina, Estreptomicina, Sulbactam, Sulfametoxazol, Teicoplanina, Telavancina, Telitromicina, Temocilina, Tetraciclina, Ticarcilina, Ticarcilina-ácido clavulánico, Tigeciclina, Tobramicina, Trimetoprima, Trovafloxacin, Tilosina, Vancomicina, 25 Virginiamicina y Voriconazol.

Se puede dar forma específicamente al sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención, por ejemplo, forma de un guía para nervio, parche cutáneo, cubierta facial o injerto vascular para el uso posterior *in vivo*. Asimismo, se puede dar forma al sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención para adaptarlo a un defecto o sitio que se debe rellenar, 30 preferiblemente como un implante de tejido duro o tejido blando. Los ejemplos incluyen un sitio del cual se ha extraído un tumor, un sitio de lesión cutánea (un corte, un sitio de biopsia, un agujero u otro defecto) y una pieza de hueso faltante o rota. Se puede dar forma al sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención en formas útiles para el suministro de sustancias, por ejemplo, un parche cutáneo o epitelial distinto, una gragea para ingestión, un implante intraperitoneal, un implante subdérmico, el revestimiento interior o exterior de una endoprótesis («stent»), una válvula cardiovascular, un tendón, una córnea, un ligamento, una prótesis dental, un implante muscular o un guía para nervio. La preparación del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención permite gran flexibilidad y permite la adaptación de la construcción a prácticamente cualquier forma necesaria. Muchos de dichos sistemas de capas en gradiente son 40 suficientemente flexibles para permitir que se les dé prácticamente cualquier forma. Al dar forma a dichos sistemas de capas en gradiente, las porciones del sistema de capas en gradiente pueden sellarse entre sí, por ejemplo, por sellado térmico, sellado químico y aplicación de presión mecánica o una combinación de estos. Un ejemplo de sellado térmico es el uso de técnicas de reticulación descritas en la presente para formar la reticulación entre dos capas o conjuntos de capas del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención. El sellado también se puede utilizar para cerrar una abertura en una matriz con forma. También se puede 45 utilizar sutura para acoplar porciones de matrices entre sí o para cerrar una abertura en una matriz. Puede ser preferible que la inclusión de polímeros sintéticos potencie la capacidad del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención para el sellado térmico.

En este contexto, la geometría del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede modificar para producir una matriz o forma deseada. Al variar la geometría de la conexión a tierra, por ejemplo, al tener una conexión a tierra plana o lineal o de múltiples puntos, se puede variar el sentido de los componentes del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención y adaptarlo a una aplicación específica. Por ejemplo, un objetivo conectado a tierra que comprende una serie de líneas paralelas se puede utilizar para preparar el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención para orientar el material electrohilado en un sentido específico. El objetivo conectado a tierra puede ser un mandril cilíndrico a través del cual se formar una matriz tubular. Más preferiblemente, la 55

conexión a tierra es una superficie variable que se puede controlar mediante un microprocesador que indica una geometría de la conexión a tierra específica que se programa en la misma. Alternativamente, por ejemplo, la conexión a tierra se puede montar sobre un marco que se mueve en los planos x, y, z con respecto a una fuente de fibra o una puntera de micropipeta estática que vierte colágeno.

- 5 El sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede aplicar en una amplia gama de usos potenciales. Los usos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: fabricación de tejido u órganos manipulados, incluidas estructuras tales como parches, tapones o tejidos o estructuras de material de matriz. Estas y otras construcciones se pueden complementar con células o se pueden utilizar sin el complemento celular. Los usos adicionales incluyen los siguientes: prótesis y otros implantes; estructura base para tejidos; 10 reparación o vendaje de heridas; dispositivos hemostáticos; dispositivos o estructuras para uso en reparación y soporte tisular tales como suturas, adhesivos, recubrimientos naturales o componentes para implantes sintéticos; implantes y soportes cosméticos; reparación o soporte estructural para órganos o tejidos; suministro de sustancias; plataformas de biomanipulación; plataformas para evaluación del efecto de sustancias sobre células; cultivo celular; y diversos otros usos.
- 15 En cada uno de los usos terapéuticos señalados a continuación, se utiliza una cantidad terapéuticamente eficaz del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención. La cantidad de dosificación terapéuticamente eficaz del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención variará, de cierto modo, de sistema de capas en gradiente en sistema de capas en gradiente, de paciente en paciente, de uso en uso y dependerá de factores tales como la afección del paciente, la 20 naturaleza de la afección que se tratará y la vía de suministro. Por ejemplo, un defecto dérmico pequeño de 1 cm de diámetro y 0,5 cm de profundidad requeriría aproximadamente 0,4 cm³ del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención para rellenar el vacío, estimular la vasculogénesis y la regeneración tisular y tener eficacia terapéutica. En cambio, una úlcera por decúbito de 20 cm de diámetro y 5 cm de profundidad requeriría aproximadamente 1600 cm³ del sistema de capas en gradiente biocompatible y 25 preferiblemente biodegradable de la invención para tener una eficacia similar. Como propuesta general, la cantidad de sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención requerida para la eficacia terapéutica puede ser de 0,1 a 2000 cm³, preferiblemente de alrededor de 0,5 a 100 cm³.

En particular, el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede utilizar como biomaterial para medicina regenerativa, particularmente, como vendaje para heridas o como 30 soporte tisular o para la preparación del mismo. Dicho sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención también se puede utilizar para la preparación de construcciones vasculares o una construcción de tejido u órgano, o como una construcción correspondiente para el suministro de sustancias, por ejemplo, el suministro localizado de agentes terapéuticos/biológicos, así como también la liberación controlada de dichos agentes en el sitio objetivo en un sujeto, etc.

35 Según un aspecto, el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede utilizar para construir vasos sanguíneos. Una aplicación del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención es la formación de construcciones vasculares de diámetro medio y pequeño. Algunos materiales preferidos para este aspecto son la gelatina, el colágeno y la elastina, especialmente el colágeno tipo I y el colágeno tipo III. Los ejemplos de construcciones vasculares, que se pueden preparar según la 40 invención, incluyen, pero no se limitan a, vasos coronarios para derivación o injerto, arteria femoral, arteria poplítea, arteria braquial, arteria tibial, arteria radial o las venas correspondientes. El sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención es útil especialmente cuando se combina con células endoteliales y células de músculo liso, así como también con pericitos. También se pueden construir formas más complicadas que incluyen vasos ahusados y/o ramificados. Se necesita un mandril de forma diferente para enrollar 45 las fibras largas alrededor del mismo o para orientar el polímero electrohilado.

Algunas de las complicaciones con matrices vasculares son (1) la formación de trombos y (2) la incapacidad de monitorizar cuantitativamente la integración del injerto vascular *in vivo*. Los problemas con la formación de trombos son algunos de los desafíos más difíciles que resultan en la falla frecuente de los injertos vasculares. La heparina, un agente anticoagulante potente, comúnmente se administra clínicamente para evitar la formación de trombos. Sin embargo, el uso sistémico de la heparina conlleva un cierto riesgo y, por lo tanto, se prefiere la heparina 50 administrada de manera local. Por lo tanto, se puede utilizar el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención para superar la falta de control de la liberación del fármaco mediante la incorporación de heparina a la estructura.

55 Asimismo, el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede utilizar para construir construcciones de tejidos u órganos manipulados o partes de construcciones de órganos, por ejemplo, un corazón, válvulas del corazón, hígado, riñón y similares. La capacidad de uso del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención para biomanipular tejido u órganos crea una amplia variedad de aplicaciones de reemplazo de tejido biomanipulado. Los ejemplos de componentes biomanipulados incluyen, pero no se limitan a, vasos sanguíneos, corazón, hígado, riñón, músculo

esquelético, piel y otros epitelios, músculo cardíaco y guías para nervios. En algunos aspectos, dicho sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención puede combinarse con agentes terapéuticos que mejoran la función del implante. Por ejemplo, se pueden agregar antibióticos, antiinflamatorios, anestésicos locales, factores de crecimiento y citocinas o sus combinaciones, al sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención de un órgano biomaniplado para acelerar el proceso de curación y reducir el malestar.

El sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención también se puede utilizar para suministrar uno o más agentes terapéuticos a una ubicación deseada.

El sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede utilizar, por ejemplo, para tratamientos en el campo de la implantología, dermatología y de carcinomas en la cavidad oral, en las vías aéreas digestivas superiores (por ejemplo, en otorrinolaringología o medicina para oídos, nariz y garganta) así como también para heridas de la cavidad oral (por ejemplo, durante cirugía oral y maxilofacial). Más precisamente, dichas aplicaciones clínicas incluyen, por ejemplo, vendajes para heridas, aplicaciones de soporte tisular o regeneración tisular en el campo de la medicina regenerativa, medicina dental y odontología. Entre dichas aplicaciones, por ejemplo, se pueden tratar heridas lacerantes crónicas dentro del campo de la dermatología, así como también heridas en el campo de la medicina regenerativa, en particular, heridas que se pueden producir durante la escisión quirúrgica de carcinomas de las vías aéreas digestivas superiores (por ejemplo, en otorrinolaringología o medicina para oídos, nariz y garganta) así como también para heridas de la cavidad oral (por ejemplo, durante cirugía oral y maxilofacial). En el caso de heridas lacerantes, que se producen frecuentemente en la parte más bajas de las extremidades inferiores de los pacientes con diabetes, se pueden cultivar queratinocitos autólogos *in vitro* de la invención en el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención en presencia de fibroblastos inactivos correspondientes con división celular irradiada, hasta obtener un epitelio preformado. Dichos queratinocitos autólogos se originan, típicamente, en la vaina de la raíz capilar y, por lo tanto, están disponibles de inmediato. A continuación, el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención que se ha cultivado en consecuencia con dichas células autólogas, preferiblemente, se administra sobre una herida, preferiblemente, pretratada del mismo paciente del cual se derivaron las células. La administración del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención sobre la herida del paciente se produce, típicamente, en una densidad y tamaño que inicia, preferiblemente, la curación de la herida y permite, preferiblemente, el mantenimiento de las células con nutrientes del tejido y fluidos circundantes. La administración del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención también mantiene la oclusión de la herida debido a una degradación dirigida y sistemática del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención y la liberación resultante de proteínas específicas, tales como factores de crecimiento que promueven queratinocitos, tales como EGF o FGF-7 (KGF). En relación con los carcinomas de las vías aéreas digestivas superiores (por ejemplo, en otorrinolaringología o medicina para oídos, nariz y garganta) según se mencionó en la presente, los queratinocitos aplicados con el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención derivan, típicamente, de un llamado «colgajo del antebrazo». En este caso, se extrae una porción de la piel entera de una parte del lado interno del antebrazo y se cultivan los fibroblastos del tejido conjuntivo y los queratinocitos epiteliales *in vitro*. Dado que los pacientes con tales tumores padecen, típicamente, curación de heridas deficiente y, por consiguiente, exhiben un tejido fibroso problemático correspondiente, el tratamiento de dichos pacientes y el vendaje quirúrgico, se produce, de forma ventajosa, con la administración del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención, preferiblemente, con células epiteliales sembradas y fibroblastos correspondientes.

Las aplicaciones clínicas adicionales ventajosas del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención en forma de medicamento, vehículo médico, dispositivo médico o producto médico, incluyen prevención de cresta alveolar tras la extracción de un diente en un paciente que se tratará. Dichas aplicaciones pueden contribuir, de forma decisiva, a la aplicación estética y funcionalmente exitosa de implantes dentales en la medicina dental y odontología. En Alemania, se extraen más de 14 millones de dientes por año. Después de la extracción dental o pérdida dental, el hueso de soporte del diente perdido más o menos colapsa en cierta medida (atrofia). Por consiguiente, se pueden observar diferentes grados de pérdida ósea o atrofia en este contexto. Cuando se produce una atrofia del hueso alveolar, puede haber una alteración del aspecto estético. Incluso en un caso peor, puede haber alteración de los prerrequisitos para la implantología y la rehabilitación protésica adicional. Por lo tanto, se necesitan, generalmente, medidas de aumento para mejorar la función y el aspecto estético y, por lo tanto, generalmente aumentan los gastos y el trabajo quirúrgico en relación con los procedimientos de operación invasivos. Por consiguiente, la aplicación específica del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención, directamente después de la extracción o pérdida del diente, representa una herramienta adecuada y rentable para evitar dichos gastos y tratamientos posteriores.

Las aplicaciones clínicas adicionales ventajosas del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención en forma de medicamento, vehículo médico, dispositivo médico o producto médico, incluyen el tratamiento de enfermedades de la córnea humana en un paciente que se tratará. Dichas aplicaciones se pueden llevar a cabo en el tratamiento de enfermedades de la córnea, es decir, epitelio, tejido conjuntivo/fibroblastos

y endotelio. En enfermedades del limbo («insuficiencia de células madre limbares»), el vaso que transporta el epitelio nublado del tejido conjuntivo (conjuntiva) crece en la córnea transparente y resulta en ceguera del paciente afectado. El tratamiento convencional de dichas enfermedades típicamente requiere el reemplazo de las células madre limbares, que representan células precursoras del epitelio corneal transparente. En casos de enfermedades unilaterales del limbo, el tratamiento puede llevarse a cabo al transferir el tejido limbar vital del ojo no afectado al ojo afectado. En casos de enfermedad ambilateral, dicho tratamiento no es posible y es mucho más problemática. En estos casos, siempre que haya una función limbar restante en al menos un ojo, se puede cultivar una capa celular confluyente sobre una matriz portadora adecuada, tal como un sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención, basada en una pequeña muestra celular. La capa celular confluyente, a continuación, se puede transferir al ojo afectado. Hasta la fecha, se utilizaba una membrana de amnios humana o un gel de fibrina como matriz portadora, donde la cantidad de células proliferantes (células madre) cultivada a partir de la muestra celular extraída representaba el aspecto más esencial de dicho cultivo *ex vivo*. Infelizmente, las observaciones a largo plazo revelaron una cantidad escasa de células madre en ambas matrices portadoras utilizadas en la actualidad, es decir, la membrana de amnios humana y el gel de fibrina. El motivo para esta falla es, más probablemente, es el hecho de que ninguna de estas matrices portadoras proporciona un ambiente extracelular óptimo para dichas células madre. Por consiguiente, estas células madre no pueden formar un hábitculo necesario para el crecimiento celular óptimo. En este contexto, el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención proporciona un ambiente óptimo debido a sus propiedades individualmente adaptables que se pueden diseñar en relación con la necesidad de estas células madre.

Otra aplicación clínica del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención en forma de dispositivo médico incluye el tratamiento de heridas crónicas extensas, heridas provocadas por una enfermedad, tal como, por ejemplo, cáncer, diabetes, etc., por ejemplo, como un reemplazo de volumen, etc., en particular para el tratamiento de lesiones y pérdida de tejido y estructuras tisulares, por ejemplo, en el campo de la dermatología. En este contexto, el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención proporciona un candidato superior para la preparación de equivalentes dérmicos o en combinación con fibroblastos se puede utilizar, de forma ventajosa, como sistema portador o estructura base para queratinocitos epiteliales, todos estos se incluyen en la presente. Las aplicaciones pueden comprender el tratamiento de heridas de (i) pacientes con heridas lacerantes, por ejemplo, en las extremidades debido a la diabetes tipo II, o (ii) tras disecciones de tumores. El sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención estimula, de forma eficaz, la curación de la herida y, por lo tanto, acelera el proceso de curación después del trasplante.

Las aplicaciones clínicas adicionales del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención en forma de dispositivo médico incluyen el tratamiento de enfermedades del endotelio de la córnea. Una aplicación específica, en este contexto, es, por ejemplo, el tratamiento de la distrofia endotelial de la córnea de Fuchs. En esta enfermedad, pero también en el contexto de otras enfermedades, se produce una reducción drástica de las células del endotelio corneal debido a la apoptosis que conduce a una córnea nublada. La presente terapia incluye el trasplante de la córnea, que incluye el trasplante o reemplazo de todas las capas de la córnea. Un tratamiento alternativo incluye el reemplazo de células enfermas mediante un trasplante específico de la capa endotelial de un donante. Dado que el material de trasplante no es un material de HLA idéntico, el injerto de tejido puede ser rechazado, lo cual resulta en un daño significativo de la capa endotelial. En este contexto, el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención proporciona la posibilidad de extraer células endoteliales del paciente que se tratará y enriquecer estas células endoteliales, de forma similar a lo mencionado anteriormente, mediante el cultivo de una capa celular confluyente sobre una matriz portadora adecuada, tal como el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención, basado en una muestra celular pequeña. Nuevamente, el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención proporciona un ambiente óptimo para estas células debido a sus propiedades individualmente adaptables, que se pueden diseñar en relación con la necesidad de estas células madre. A continuación, las células se pueden transferir junto con el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable como un vehículo hacia el lado posterior de la córnea y, por lo tanto, evitar el rechazo del injerto.

El sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención, preferiblemente, en forma de medicamento, vehículo médico, dispositivo médico o producto médico, se puede utilizar, además, por ejemplo, en vendajes para quemaduras, parches homeostáticos, en el tratamiento de lesiones, en vendajes quirúrgicos para el tratamiento de heridas, para regeneración de tejido blando o duro, por ejemplo, en el campo de la implantología, para el tratamiento de heridas en la cavidad oral, por ejemplo, debido a enfermedades tumorales, en el campo de la oftalmología, en el campo de defectos periodontales, incluido el ligamento periodontal, etc., para preparar un implante celular para regenerar o reconstruir, de forma integral o parcial, tejidos dañados o enfermos o extraídos, en particular, tejido muscular, de miocardio, conjuntivo, óseo, de tendón o ligamentoso, hepático, renal, corneal, dérmico o epidérmico y otro tejido epitelial, tejido articular cartilaginoso, para preparar un implante para células del sistema nervioso central, como células neuronales para regenerar o reconstruir, de forma integral o parcial, tejido neuronal, en particular, tejido del sistema nervioso central, tejido nervioso, tal como tejido neuronal

dañado como resultado de enfermedad de Parkinson o daños de la médula espinal o patologías oncológicas o enfermedad de Alzheimer, tejido nervioso, tal como tejido neuronal extraído o destruido después de una operación quirúrgica. El sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención puede utilizarse además en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, en el tratamiento de enfermedades o lesiones traumatológicas, en el tratamiento de enfermedades o trastornos en el campo ortopédico, para tratamiento, regeneración o reconstrucción de cartílago, enfermedades o trastornos del cartílago, condropatía, constitución de cartílago en la rodilla y el tratamiento de enfermedades articulares o como dispositivo de suministro de fármacos, matrices celulares para aplicaciones *in vitro*, *in vivo* y/o *ex vivo*, o para la preparación de modelos de tejido y como matrices de trasplante celular.

Por consiguiente, el objeto subyacente a la presente invención se resuelve además mediante un biomaterial, que comprende un sistema de capas en gradiente, según se definió en la presente, en el que el biomaterial se selecciona de un biomaterial para medicina regenerativa, para vendaje para heridas o para soporte de tejidos o para preparación del mismo, un tejido o construcción de órgano o una parte de construcciones de órgano biomanipulado, un corazón biomanipulado, una válvula cardíaca biomanipulada, un hígado biomanipulado, un riñón biomanipulado, un vaso sanguíneo biomanipulado, un músculo esquelético biomanipulado, un músculo cardíaco biomanipulado, un guía para nervio biomanipulado, un vendaje para quemaduras, un vendaje para heridas, un vendaje quirúrgico, un parche cutáneo, un parche oral o cualquier otro parche epitelial, una cubierta facial, una construcción vascular, un injerto vascular, un vaso sanguíneo, un vaso coronario para derivación o injerto, una arteria femoral, una arteria poplítea, una arteria braquial, una arteria tibial, una arteria radial o vena correspondiente, una endoprótesis, el revestimiento interior o exterior de una endoprótesis, una válvula cardiovascular, un parche cutáneo, una gragea para ingestión, un implante intraperitoneal, un implante subdérmico, un tendón, una córnea, un ligamento, una prótesis dental, un implante muscular o un guía para nervios, un tejido u órgano manipulado, prótesis, una estructura base tisular, un dispositivo hemostático, un dispositivo o estructuras para reparación de tejido y adhesivos de soporte, un recubrimiento natural o componente para implantes sintéticos; un implante o soporte cosmético, un biomaterial para suministro de sustancias, una plataforma de biomanipulación o una plataforma para evaluación del efecto de sustancias sobre células.

Según otra realización específica, el objeto subyacente a la presente invención se resuelve, además, mediante el uso del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención en el tratamiento de enfermedades, estados de enfermedad o en tratamientos en general, según se definieron en la presente, según se mencionaron anteriormente. Más preferiblemente, el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención, según se definió en la presente, se puede utilizar (por ejemplo, en la preparación de un medicamento, un vehículo médico, un dispositivo médico o un producto médico) para el tratamiento de enfermedades, según se definieron anteriormente.

El sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede almacenar y utilizar poco antes de la implantación al sembrarlo con células. El sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede secar una vez que está preparado y se puede almacenar en un estado seco o congelado. Las condiciones de almacenamiento dependerán del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención usado y de si se incorpora un agente terapéutico sobre o en el sistema de capas en gradiente. En aspectos donde se incorpora un agente terapéutico, el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede almacenar a temperaturas por debajo de 0 °C, al vacío o en un estado liofilizado. Se pueden utilizar otras condiciones de almacenamiento, por ejemplo, a temperatura ambiente, en la oscuridad, al vacío o a presión reducida, en atmósferas inertes, a temperatura de refrigerador, en disoluciones acuosas o de otros líquidos, o en forma de polvo, dependiendo de los materiales en y sobre el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención.

El sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención también se puede esterilizar a través de medios convencionales conocidos por un experto en la técnica, tal como radiación y calor. El sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención también se puede combinar con agentes bacteriostáticos, tales como timerosal, para inhibir el crecimiento bacteriano. En algunos aspectos, las composiciones se pueden tratar con productos químicos, disoluciones o procesos que pueden conferir estabilidad en almacenamiento y transporte.

El sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención se puede proporcionar tal como o en forma de medicamento, vehículo médico, dispositivo médico o producto médico para cualquiera de los usos definidos anteriormente.

En la presente invención, si no se indica de otra forma, las diferentes características de las alternativas, aspectos y realizaciones se pueden combinar entre sí, si es adecuado. Además, la expresión «que comprende» no se interpretará con el significado de «que consiste en», si no se menciona específicamente. Sin embargo, en el contexto de la presente invención, la expresión «que comprende» puede sustituirse por la expresión «que consiste en», según sea aplicable.

Figuras

Las figuras que se muestran a continuación son meramente ilustrativas y describirán la presente invención de manera adicional. No deberá interpretarse que estas figuras limitan la presente invención a las mismas.

Figura 1:

5 ilustra un sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención de ejemplo y su estructura. Como se puede observar, el sistema de capas en gradiente de la invención comprende diferentes conjuntos de capas que comprenden un polímero reticulado biocompatible y preferiblemente biodegradable en una estructura similar a una tela y al menos una capa de soporte biocompatible y preferiblemente biodegradable presente en una estructura similar a una red o malla.

10 Figura 2:

muestra una microscopía electrónica de barrido (REM, por sus siglas en inglés) de un sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención, donde se cultivaron fibroblastos de la dermis y se propagaron con éxito *in vitro*. Las imágenes de la microscopía electrónica de barrido (REM) de la Figura 2 muestran adicionalmente el precultivo de fibroblastos de la dermis en el fondo / superficie inferior (inserto) del sistema de capas en gradiente de la invención y el establecimiento de un compartimiento de queratinocitos epidérmicos sobre la superficie del sustrato.

Figura 3:

representa una microscopía electrónica de barrido (REM) de un sistema de capas en gradiente de la invención, donde se cultivó un cocultivo interactivo de fibroblastos de la dermis y queratinocitos epiteliales y se propagó con éxito *in vitro* sobre el sistema de capas en gradiente de la invención (véase la Figura 3 y el inserto).

Ejemplos

Los ejemplos que se muestran a continuación son meramente ilustrativos y describirán la presente invención de manera adicional. No deberá interpretarse que estos ejemplos limitan la presente invención a los mismos.

Ejemplo 1 - Preparación de capas de gelatina

25 Se solubilizó gelatina (tipo B de piel bovina; Sigma-Aldrich) en una mezcla de disolventes de ácido acético (Merck), acetato de etilo (Fluka) y agua (5:3:2 vol). La concentración estuvo en un intervalo de alrededor de 5 y 20 % (en peso). Se mezclaron cantidades diferentes de reticulador glioxal (0,0005-0,1 g/g de disolución de gelatina) con la disolución de gelatina. La mezcla de gelatina/glioxal se cargó en una jeringa y se montó en una bomba de jeringa (Modelo: KDS100 oder KDS101, KD scientific), la tasa de flujo fue entre alrededor de 0,1 y 1,0 ml/h. Entre la cánula y el colector se estableció un campo eléctrico con dos generadores de potencia de alto voltaje (Heinzinger® LNC 30000-2 neg. y LNC 30000-2 pos.) con fuerzas de campo entre 0,4 y 8 kV/cm.

a) Electrohilado/Electropulverización

Después de depositar un conjunto de capas similar a una tela, de espesor suficiente, de las fibras de gelatina/glioxal sobre el sustrato, se electrohiló o electropulverizó una capa delgada de PCL sobre el conjunto de capas similar a una tela formado por fibras de gelatina/glioxal. A continuación, se aplicaron conjuntos de capas adicionales que comprendían gelatina. Durante el tratamiento con temperatura posterior (60-100 °C; 0,5-24h) se produjo una reticulación (adicional) de la gelatina con glioxal. Esto incluyó que los conjuntos de capas similares a una tela tomaran un color marrón debido a la formación de bases de Schiff. Además, el tratamiento con temperatura condujo a una fusión (parcial) de la capa de PCL. La fusión rodea puntualmente o laminarmente las fibras de gelatina y, por lo tanto, proporciona propiedades mecánicas significativamente mejoradas del conjunto de capas similar a una tela hinchado de fibras de gelatina/glioxal.

b) Ploteo 3D

Una construcción de capa de PCL ploteada se aplicó sobre el conjunto de capas similar a una tela de fibras de gelatina/glioxal en lugar de la capa de PCL, según se describió en la sección a).

45 Para a) y b), cabe señalar que la disposición de las capas o conjuntos de capas se puede variar de forma arbitraria. Como ejemplo, asimismo, es posible utilizar una construcción en 3D como un objetivo para electrohilado. Es posible proporcionar una disposición diferente de las capas o conjuntos de capas, una orientación de las diferentes capas o conjuntos de capas y una cantidad diferente de capas o conjuntos de capas. Opcionalmente, las construcciones, tales como las capas de PCL, etc., pueden aplicarse sobre un soporte o directamente sobre el conjunto de capas similar a una tela de fibras de gelatina/glioxal utilizando una pistola térmica o compresor de aire caliente. Se utilizó una posibilidad adicional para mejorar las propiedades mecánicas del sistema de capas en gradiente biocompatible

5 y preferiblemente biodegradable de la invención, basada en una reticulación adicional de las fibras de gelatina con compuestos polifenol, preferiblemente, galotanino (Sigma-Aldrich). El conjunto de capas similar a una tela de fibras de gelatina/glioxal se sumergió o incubó en una disolución acuosa o alcohólica (0,01-10 % (en peso)) de compuestos polifenol y se agitó ligeramente entre 0,5 y 24 h a temperaturas de alrededor de 20 a 40 °C. El exceso de compuestos polifenol se extrajo a través de varios pasos de lavado (agua destilada, tampón, alcohol).

Ejemplo 2 - Preparación de capas de policaprolactona

Abreviaturas:

PCL = policaprolactona

TCP = fosfato tricálcico

10 $D_{interior}$ = diámetro interior de la boquilla

RPM = vueltas por minuto

Parte experimental de 3D-Bioplotting™

1. Policaprolactona - construcciones similares a una malla

15 Las construcciones similares a una malla se imprimieron directamente con un ploteador 3D (3ª Generación, Envisiontec, Alemania) utilizando datos de CAD. Para este fin, se cargó policaprolactona (PCL, $M_n = 80,000$ g/mol, Aldrich, St. Louis, EE. UU.) en un cabezal de impresora a alta temperatura del Bioploteador 3D y se fundió (90 °C). El material fundido se imprimió en forma de rectángulos (4 x 4 cm). Una lámina de teflón sirve como soporte para la impresión. Todos los parámetros experimentales se indican tabla 1.

| Material | Medio ploteo | de $T_{(material)}(°C)$ | $T_{(medio de ploteo)}(°C)$ | de Boquilla | Boquilla $D_{interior}$ (mm) |
|-----------------------------|--------------------------------------|---|---------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| PCL ($M_n = 80,000$ g/mol) | Aire | 90 | 20 | Stahl | 0,45 |
| | presión aplicada ($\times 10^5$ Pa) | velocidad de funcionamiento cabezal de impresora (mm/s) | de distancia de las hebras (mm) | espesor de la capa (mm) | retraso de las esquinas (s) |
| | 3,6 - 3,8 | 100 | 4,5 | 0,3 | 0,1 |

20 Tabla 1: Parámetros experimentales del proceso de ploteo para construcciones similares a una malla hechas con PCL pura.

2. Construcciones similares a una malla de policaprolactona / Fosfato tricálcico:

25 Se proporcionaron policaprolactona (PCL, $M_n = 80,000$ g/mol, Aldrich, St. Louis, EE. UU.) y fosfato tricálcico (10 Pes.-%, Budenheim, Alemania) en un contenedor de vidrio con tapa ajustable y se mezclaron. La mezcla se amasó con un microamasador (Daca Instruments, Santa Bárbara, EE. UU.) (100 °C, 100 RPM, tiempo de retención 2 min). El material obtenido se procesó tal como se indicó en la sección a. anterior. Todos los parámetros experimentales se indican tabla 2.

| Material | Medio ploteo | de $T_{(material)}(°C)$ | $T_{(medio de ploteo)}(°C)$ | Boquilla | Boquilla $D_{interior}$ (mm) |
|----------------------------------|--------------------------------------|---|---------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| PCL /TCP ($M_n = 80,000$ g/mol) | Luft | 90 | 20 | Stahl | 0,45 |
| | presión aplicada ($\times 10^5$ Pa) | velocidad de funcionamiento cabezal de impresora (mm/s) | de distancia de las hebras (mm) | espesor de la capa (mm) | retraso de las esquinas (s) |
| | 3,5 | 100 | 4,5 | 0,3 | 0,1 |

Tabla 2: Parámetros experimentales del proceso de ploteo para construcciones similares a una malla hechas con PCL y TCP.

Ejemplo 3 - Preparación de un sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable

5 Para la preparación de un sistema de capas en gradiente de la invención de ejemplo, se prepararon gelatina o combinaciones de gelatina con otros polímeros, según se describieron anteriormente, antes de la síntesis de las
 10 fibras de gelatina poliméricas y se mezclaron con glicol como reticulador. En un primer paso del método de la invención, las fibras de gelatina poliméricas después se sintetizaron a través de un procedimiento de electrohilado, según se describió anteriormente, que condujo a una capa de fibras de gelatina poliméricas reticuladas. Las fibras se sintetizaron utilizando combinaciones de gelatina en presencia del reticulador glicol para potenciar las
 15 propiedades mecánicas. Además, se ajustó la resistencia de fibra de las fibras de gelatina poliméricas durante el procedimiento de electrohilado debido al aumento de la viscosidad tras la reticulación del polipéptido con glicol. El glicol preferiblemente vuelve a la estructura insoluble en agua y, por lo tanto, mejora las propiedades mecánicas del sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable. La viscosidad aumentada condujo a una resistencia de fibra aumentada y resultó en un gradiente en la capa producida con fibras de gelatina poliméricas. Las resistencias de fibra graduales presentaron un intervalo, según se definió anteriormente, típicamente, en el intervalo de alrededor de 50 a 1500 nm o 100 a 800 nm.

20 Después de la síntesis de una capa de fibras de gelatina poliméricas reticuladas según el primer paso, dichas capas de fibras graduales de fibras de gelatina poliméricas se identificaron y exhibieron una estabilidad suficiente en medio acuoso. Los valores de pH estuvieron alrededor de 5,5 a alrededor de 8,5. Se evitaron las condiciones alcalinas excesivas y ácidas excesivas para evitar la degradación de la gelatina. Estas capas de fibras graduales, a continuación, se utilizaron como base en un segundo paso en un procedimiento de electroploteo 3D. En el procedimiento de electroploteo 3D, la policaprolactona compuesto poliéster se ploteó sobre la capa de fibras graduales de fibras de gelatina poliméricas para obtener el sistema de capas en gradiente polimérico de la invención como una estructura o estructura base de red de polímero biohíbrido tridimensional que estabilizó significativamente
 25 la capa de fibras graduales de fibras de gelatina poliméricas. La estructura base resultante conservó las propiedades superiores de los polímeros utilizados en los pasos simples. La Figura 1 muestra un sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable de la invención de ejemplo y su estructura.

30 El sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable obtenido según el paso 2, según se describió anteriormente, a continuación, se cultivó con células objetivo en un paso 3 adicional. El paso 3 se llevó a cabo al cultivar células objetivo, preferiblemente, fibroblastos de la dermis, sobre la superficie del sistema de capas en gradiente polimérico de la invención. Las células objetivo se cultivaron en medio de cultivo celular. Los cultivos de fibroblastos dérmicos primarios se mantuvieron para cultivo celular de rutina en medio DME (PAA, Pasching, Austria) que contenía suero de ternero fetal al 10 % (Seromed, Biochrom, Berlín, Alemania) y 50 µg/ml de kanamicina (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Los queratinocitos epidérmicos se mantuvieron en medio de crecimiento de queratinocitos con bajo contenido de calcio (medio de base para queratinocitos, KGM, con complementos proporcionados, Promocell, Heidelberg, Alemania), que contenía 50 µg/ml de kanamicina (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

40 El establecimiento de los respectivos tipos celulares sobre el sistema de capas en gradiente biocompatible y preferiblemente biodegradable se llevó a cabo mediante un precultivo de 24 horas de fibroblastos dérmicos en el lado inferior del sustrato y posteriormente la siembra de queratinocitos epidérmico en la parte superior del dispositivo. Este sistema de cocultivo ha sido cultivado durante 14 días adicionales.

45 Según se determinó mediante microscopía electrónica de barrido (REM) (véase la Figura 2) los fibroblastos de la dermis se cultivaron y propagaron con éxito *in vitro*. Las imágenes de la microscopía electrónica de barrido (REM) de la Figura 2 muestran adicionalmente el precultivo de fibroblastos de la dermis en el fondo / superficie inferior (inserto) del sistema de capas en gradiente polimérico de la invención y el establecimiento de un compartimiento de queratinocitos epidérmicos sobre la superficie del sustrato. Además, fue posible cultivar con éxito cocultivos interactivos que consistían en fibroblastos y queratinocitos epiteliales del sistema de capas en gradiente polimérico de la invención (véase la Figura 3 y el inserto).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Basilea Pharmaceutica AG
- <120> Uso de BUBR1 como un biomarcador de respuesta a fármacos
- <130> P50415EP00
- 5 <160> 6
- <170> PatentIn version 3.4
- <210> 1
- <211> 1050
- <212> PRT
- 10 <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 621 414 T3

Met Ala Ala Val Lys Lys Glu Gly Gly Ala Leu Ser Glu Ala Met Ser
 1 5 10 15

Leu Glu Gly Asp Glu Trp Glu Leu Ser Lys Glu Asn Val Gln Pro Leu
 20 25 30

Arg Gln Gly Arg Ile Met Ser Thr Leu Gln Gly Ala Leu Ala Gln Glu
 35 40 45

Ser Ala Cys Asn Asn Thr Leu Gln Gln Gln Lys Arg Ala Phe Glu Tyr
 50 55 60

Glu Ile Arg Phe Tyr Thr Gly Asn Asp Pro Leu Asp Val Trp Asp Arg
 65 70 75 80

Tyr Ile Ser Trp Thr Glu Gln Asn Tyr Pro Gln Gly Gly Lys Glu Ser
 85 90 95

Asn Met Ser Thr Leu Leu Glu Arg Ala Val Glu Ala Leu Gln Gly Glu
 100 105 110

Lys Arg Tyr Tyr Ser Asp Pro Arg Phe Leu Asn Leu Trp Leu Lys Leu
 115 120 125

Gly Arg Leu Cys Asn Glu Pro Leu Asp Met Tyr Ser Tyr Leu His Asn
 130 135 140

Gln Gly Ile Gly Val Ser Leu Ala Gln Phe Tyr Ile Ser Trp Ala Glu
 145 150 155 160

Glu Tyr Glu Ala Arg Glu Asn Phe Arg Lys Ala Asp Ala Ile Phe Gln
 165 170 175

ES 2 621 414 T3

Glu Gly Ile Gln Gln Lys Ala Glu Pro Leu Glu Arg Leu Gln Ser Gln
 180 185 190

His Arg Gln Phe Gln Ala Arg Val Ser Arg Gln Thr Leu Leu Ala Leu
 195 200 205

Glu Lys Glu Glu Glu Glu Glu Val Phe Glu Ser Ser Val Pro Gln Arg
 210 215 220

Ser Thr Leu Ala Glu Leu Lys Ser Lys Gly Lys Lys Thr Ala Arg Ala
 225 230 235 240

Pro Ile Ile Arg Val Gly Gly Ala Leu Lys Ala Pro Ser Gln Asn Arg
 245 250 255

Gly Leu Gln Asn Pro Phe Pro Gln Gln Met Gln Asn Asn Ser Arg Ile
 260 265 270

Thr Val Phe Asp Glu Asn Ala Asp Glu Ala Ser Thr Ala Glu Leu Ser
 275 280 285

Lys Pro Thr Val Gln Pro Trp Ile Ala Pro Pro Met Pro Arg Ala Lys
 290 295 300

Glu Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Trp Asn Thr Gly Arg Ser Leu Glu
 305 310 315 320

His Arg Pro Arg Gly Asn Thr Ala Ser Leu Ile Ala Val Pro Ala Val
 325 330 335

Leu Pro Ser Phe Thr Pro Tyr Val Glu Glu Thr Ala Gln Gln Pro Val
 340 345 350

Met Thr Pro Cys Lys Ile Glu Pro Ser Ile Asn His Ile Leu Ser Thr
 355 360 365

Arg Lys Pro Gly Lys Glu Glu Gly Asp Pro Leu Gln Arg Val Gln Ser
 370 375 380

His Gln Gln Ala Ser Glu Glu Lys Lys Glu Lys Met Met Tyr Cys Lys
 385 390 395 400

Glu Lys Ile Tyr Ala Gly Val Gly Glu Phe Ser Phe Glu Glu Ile Arg
 405 410 415

Ala Glu Val Phe Arg Lys Lys Leu Lys Glu Gln Arg Glu Ala Glu Leu
 420 425 430

ES 2 621 414 T3

Leu Thr Ser Ala Glu Lys Arg Ala Glu Met Gln Lys Gln Ile Glu Glu
435 440 445

Met Glu Lys Lys Leu Lys Glu Ile Gln Thr Thr Gln Gln Glu Arg Thr
450 455 460

Gly Asp Gln Gln Glu Glu Thr Met Pro Thr Lys Glu Thr Thr Lys Leu
465 470 475 480

Gln Ile Ala Ser Glu Ser Gln Lys Ile Pro Gly Met Thr Leu Ser Ser
485 490 495

Ser Val Cys Gln Val Asn Cys Cys Ala Arg Glu Thr Ser Leu Ala Glu
500 505 510

Asn Ile Trp Gln Glu Gln Pro His Ser Lys Gly Pro Ser Val Pro Phe
515 520 525

Ser Ile Phe Asp Glu Phe Leu Leu Ser Glu Lys Lys Asn Lys Ser Pro
530 535 540

Pro Ala Asp Pro Pro Arg Val Leu Ala Gln Arg Arg Pro Leu Ala Val
545 550 555 560

Leu Lys Thr Ser Glu Ser Ile Thr Ser Asn Glu Asp Val Ser Pro Asp
565 570 575

Val Cys Asp Glu Phe Thr Gly Ile Glu Pro Leu Ser Glu Asp Ala Ile
580 585 590

Ile Thr Gly Phe Arg Asn Val Thr Ile Cys Pro Asn Pro Glu Asp Thr
595 600 605

Cys Asp Phe Ala Arg Ala Ala Arg Phe Val Ser Thr Pro Phe His Glu
610 615 620

Ile Met Ser Leu Lys Asp Leu Pro Ser Asp Pro Glu Arg Leu Leu Pro
625 630 635 640

Glu Glu Asp Leu Asp Val Lys Thr Ser Glu Asp Gln Gln Thr Ala Cys
645 650 655

Gly Thr Ile Tyr Ser Gln Thr Leu Ser Ile Lys Lys Leu Ser Pro Ile
660 665 670

Ile Glu Asp Ser Arg Glu Ala Thr His Ser Ser Gly Phe Ser Gly Ser
675 680 685

ES 2 621 414 T3

Ser Ala Ser Val Ala Ser Thr Ser Ser Ile Lys Cys Leu Gln Ile Pro
690 695 700

Glu Lys Leu Glu Leu Thr Asn Glu Thr Ser Glu Asn Pro Thr Gln Ser
705 710 715 720

Pro Trp Cys Ser Gln Tyr Arg Arg Gln Leu Leu Lys Ser Leu Pro Glu
725 730 735

Leu Ser Ala Ser Ala Glu Leu Cys Ile Glu Asp Arg Pro Met Pro Lys
740 745 750

Leu Glu Ile Glu Lys Glu Ile Glu Leu Gly Asn Glu Asp Tyr Cys Ile
755 760 765

Lys Arg Glu Tyr Leu Ile Cys Glu Asp Tyr Lys Leu Phe Trp Val Ala
770 775 780

Pro Arg Asn Ser Ala Glu Leu Thr Val Ile Lys Val Ser Ser Gln Pro
785 790 795 800

Val Pro Trp Asp Phe Tyr Ile Asn Leu Lys Leu Lys Glu Arg Leu Asn
805 810 815

Glu Asp Phe Asp His Phe Cys Ser Cys Tyr Gln Tyr Gln Asp Gly Cys
820 825 830

Ile Val Trp His Gln Tyr Ile Asn Cys Phe Thr Leu Gln Asp Leu Leu
835 840 845

Gln His Ser Glu Tyr Ile Thr His Glu Ile Thr Val Leu Ile Ile Tyr
850 855 860

Asn Leu Leu Thr Ile Val Glu Met Leu His Lys Ala Glu Ile Val His
865 870 875 880

Gly Asp Leu Ser Pro Arg Cys Leu Ile Leu Arg Asn Arg Ile His Asp
885 890 895

Pro Tyr Asp Cys Asn Lys Asn Asn Gln Ala Leu Lys Ile Val Asp Phe
900 905 910

Ser Tyr Ser Val Asp Leu Arg Val Gln Leu Asp Val Phe Thr Leu Ser
915 920 925

Gly Phe Arg Thr Val Gln Ile Leu Glu Gly Gln Lys Ile Leu Ala Asn

ES 2 621 414 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|
| 930 | | 935 | | 940 | | | | | | | | | | | |
| Cys | Ser | Ser | Pro | Tyr | Gln | Val | Asp | Leu | Phe | Gly | Ile | Ala | Asp | Leu | Ala |
| 945 | | | | | 950 | | | | | 955 | | | | | 960 |
| His | Leu | Leu | Leu | Phe | Lys | Glu | His | Leu | Gln | Val | Phe | Trp | Asp | Gly | Ser |
| | | | | 965 | | | | | 970 | | | | | 975 | |
| Phe | Trp | Lys | Leu | Ser | Gln | Asn | Ile | Ser | Glu | Leu | Lys | Asp | Gly | Glu | Leu |
| | | | 980 | | | | | 985 | | | | | 990 | | |
| Trp | Asn | Lys | Phe | Phe | Val | Arg | Ile | Leu | Asn | Ala | Asn | Asp | Glu | Ala | Thr |
| | | 995 | | | | | 1000 | | | | | 1005 | | | |
| Val | Ser | Val | Leu | Gly | Glu | Leu | Ala | Ala | Glu | Met | Asn | Gly | Val | Phe | |
| 1010 | | | | | | 1015 | | | | | 1020 | | | | |
| Asp | Thr | Thr | Phe | Gln | Ser | His | Leu | Asn | Lys | Ala | Leu | Trp | Lys | Val | |
| 1025 | | | | | | 1030 | | | | | 1035 | | | | |
| Gly | Lys | Leu | Thr | Ser | Pro | Gly | Ala | Leu | Leu | Phe | Gln | | | | |
| 1040 | | | | | | 1045 | | | | | 1050 | | | | |

<210> 2

<211> 3749

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 621 414 T3

```

<400> 2
aggggcgtgg ccacgtcgac cgcgcgggac cgtaaattt gaaacttggc ggctaggggt      60
gtgggcttga ggtggccggt ttgttaggga gtcgtgtacg tgccttggtc gcttctgtag      120
ctccgagggc aggttgcgga agaaagccca ggcggtctgt ggcccagagg aaaggcctgc      180
agcaggacga ggacctgagc caggaatgca ggatggcggc ggtgaagaag gaagggggtg      240
ctctgagtga agccatgtcc ctggagggag atgaatggga actgagtaaa gaaaatgtac      300
aacctttaag gcaagggcgg atcatgtcca cgcttcaggg agcactggca caagaatctg      360
cctgtaacaa tactcttcag cagcagaaac gggcatttga atatgaaatt cgattttaca      420
ctggaaatga ccctctggat gtttgggata ggtatatcag ctggacagag cagaactatc      480
ctcaaggtgg gaaggagagt aatatgtcaa cgttattaga aagagctgta gaagcactac      540
aaggagaaaa acgatattat agtgatcctc gatttctcaa tctctggctt aaattagggc      600
gtttatgcaa tgagcctttg gatatgtaca gttacttgca caaccaaggg attggtgttt      660
cacttgctca gttctatatc tcatgggcag aagaatatga agctagagaa aactttagga      720
aagcagatgc gatatttcag gaagggattc aacagaaggc tgaaccacta gaaagactac      780

```

ES 2 621 414 T3

agtcccagca ccgacaattc caagctcgag tgtctcggca aactctgttg gcacttgaga 840
 aagaagaaga ggaggaagtt tttgagtctt ctgtaccaca acgaagcaca ctagctgaac 900
 taaagagcaa agggaaaaag acagcaagag ctccaatcat cCGTgtagga ggtgctctca 960
 aggctccaag ccagaacaga ggactccaaa atccatttcc tcaacagatg caaaataata 1020
 gtagaattac tgtttttgat gaaaatgctg atgaggcttc tacagcagag ttgtctaagc 1080
 ctacagtcca gccatggata gcacccccca tgcccagggc caaagagaat gagctgcaag 1140
 caggcccttg gaacacaggc aggtccttgg aacacaggcc tcgtggcaat acagcttcac 1200
 tgatagctgt acccgctgtg cttcccagtt tcaactcata tgtggaagag actgcacaac 1260
 agccagttat gacacatgt aaaattgaac ctagtataaa ccacatccta agcaccagaa 1320
 agcctggaaa ggaagaagga gatcctctac aaagggttca gagccatcag caagcgtctg 1380
 aggagaagaa agagaagatg atgtattgta aggagaagat ttatgcagga gtaggggaat 1440
 tctcctttga agaaattcgg gctgaagttt tccggaagaa attaaaagag caaagggaag 1500
 ccgagctatt gaccagtgca gagaagagag cagaaatgca gaaacagatt gaagagatgg 1560
 agaagaagct aaaagaaatc caaactactc agcaagaaag aacaggtgat cagcaagaag 1620
 agacgatgcc tacaaggag acaactaac tgcaaattgc ttccgagtct cagaaaatac 1680
 caggaatgac tctatccagt tctgtttgtc aagtaaactg ttgtgccaga gaaacttcac 1740
 ttgCGGagaa catttgGcag gaacaacctc attctaaagg tcccagtgtc cttttctcca 1800
 tttttgatga gtttcttctt tcagaaaaga agaataaaag tcctcctgca gatccccac 1860
 gagttttagc tcaacgaaga ccccttgCag ttctcaaac ctCagaaagc atcacctcaa 1920
 atgaagatgt gtctccagat gtttgtgatg aatttacagg aattgaacc ttgagcgagg 1980
 atgccattat cacaggcttc agaaatgtaa caatttgtcc taaccCagaa gacacttgTg 2040
 actttgCag agcagctcgt tttgtatcca ctCcttttca tgagataatg tccttgaagg 2100
 atctcccttc tgatcctgag agactgttac cGgaagaaga tctagatgta aagacctctg 2160
 aggaccagca gacagcttgt ggcactatct acagtCagac tctCagcatc aagaagctga 2220
 gcccaattat tgaagacagt cgtgaagcca cacactctc tggcttctct ggttcttctg 2280
 cctcgttgC aagcacctcc tccatcaaat gtcttcaaat tcctgagaaa ctagaactta 2340
 ctaatgagac ttcagaaaac cctactcagt caccatggTg ttcacagtat cgCagacagc 2400
 tactgaagtc cctaccagag ttaagtgcct ctgCagagtt gtgtatagaa gacagaccaa 2460
 tgcctaagtt ggaaattgag aaggaaattg aattaggtaa tgaggattac tgcattaaac 2520
 gagaatacct aatatgtgaa gattacaagt tattctgggt ggcGccaaga aactctgCag 2580
 aattaacagt aataaaggtc tcttctcaac ctgtcccatg ggacttttat atcaacctca 2640
 agttaaagga acgtttaaat gaagatTTTg atcattttTg cagctgttat caatatcaag 2700

ES 2 621 414 T3

atggctgtat tgtttggcac caatatataa actgcttcac ccttcaggat cttctccaac 2760
 acagtgaata tattacccat gaaataacag tgttgattat ttataacctt ttgacaatag 2820
 tggagatgct acacaaagca gaaatagtcc atggtgactt gagtccaagg tgtctgattc 2880
 tcagaaacag aatccacgat ccctatgatt gtaacaagaa caatcaagct ttgaagatag 2940
 tggacttttc ctacagtgtt gaccttaggg tgcagctgga tgtttttacc ctcagcggct 3000
 ttcggactgt acagatcctg gaaggacaaa agatcctggc taactgttct tctccctacc 3060
 aggtagacct gtttggata gcagatttag cacatttact attggtcaag gaacacctac 3120
 aggtctctg ggatgggtcc ttctggaaac ttagccaaaa ttttctgag ctaaaagatg 3180
 gtgaattgtg gaataaattc tttgtgcgga ttctgaatgc caatgatgag gccacagtgt 3240
 ctgttcttgg ggagcttgca gcagaaatga atggggtttt tgacactaca ttccaaagtc 3300
 acctgaacaa agccttatgg aaggtaggga agttaactag tcctggggct ttgctctttc 3360
 agtgagctag gcaatcaagt ctcacagatt gctgcctcag agcaatgggt gtattgtgga 3420
 aactgaaac tgtatgtgct gtaatttaat ttaggacaca tttagatgca ctaccattgc 3480
 tgttctactt tttggtacag gtatattttg acgtcactga tttttttat acagtgatat 3540
 acttactcat ggccttgtct aacttttgtg aagaactatt ttattctaaa cagactcatt 3600
 acaaatggtt accttggtat ttaaccatt tgtctctact tttccctgta cttttcccat 3660
 ttgtaatttg taaaatgttc tcttatgatc accatgtatt ttgtaaataa taaaatagta 3720
 tctgttaaatt ttgtgcttct aaaaaaaaa 3749

<210> 3

<211> 19

5 <212> ARN

<213> construcción artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 3

10 gauggugaau uguggaaua 19

<210> 4

<211> 19

<212> ARN

<213> construcción artificial

15

<220>

<223> construcción sintética

<400> 4

gaaacgggca uuugaauau 19

<210> 5
<211> 19
<212> ARN
5 <213> construcción artificial

<220>
<223> construcción sintética
 <400> 5
 gcaaugagcc uuuggauau 19

10
<210> 6
<211> 19
<212> ARN
<213> construcción artificial

15
<220>
<223> construcción sintética

<400> 6
20 caauacagcu ucacugaua 19

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de capas en gradiente biocompatible que comprende.
 - a) al menos un conjunto de capas que comprende fibras de un polímero reticulado biocompatible y biodegradable, y
 - b) al menos una capa de soporte biocompatible,
- 5 en el que se forma un gradiente al alterar el diámetro de las fibras poliméricas dentro del al menos un conjunto de capas del sistema de capas en gradiente de la invención, en el que el diámetro de las fibras poliméricas del al menos un conjunto de capas o conjuntos de capas es entre alrededor de 1 nm a alrededor de 500 µm.
2. Un sistema de capas en gradiente según la reivindicación 1, en el que se aumenta o reduce el diámetro de fibra de alrededor de 0,0001 µm - a alrededor de 2 µm por µm de altura del conjunto de capas, ya sea, dentro del al menos un conjunto de capas o entre diversos conjuntos de capas del sistema de capas en gradiente.
- 10 3. Un sistema de capas en gradiente según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el polímero reticulado biocompatible y biodegradable se selecciona de colágeno, gelatina, fibrina, elastina, laminina y fibronectina, polisacárido, glicanos o poliglicanos, o una combinación de estos.
4. Un sistema de capas en gradiente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la al menos una capa de soporte biocompatible comprende un polímero fusible biodegradable y biocompatible seleccionado de la clase de poliésteres, policaprolactona (PCL), poliláctido (PLA), poliglicólido (PGA), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), polianhídridos, ácido polisebácico, polipéptidos, gelatina, alginato, colágeno, fibrina o mezclas o poliuretano, y/o un material incorporable seleccionado de material cerámico incorporable, un material cerámico incorporable hecho de fosfato tricálcico (TCP) o un material cerámico incorporable hecho de hidroxilo apatita (HA).
- 15 5. Un sistema de capas en gradiente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el polímero reticulado biocompatible y biodegradable y/o el polímero fusible biocompatible se reticulan utilizando un reticulador seleccionado de anhídridos, aminoácidos, aziridinas, catecolaminas, epóxidos, aldehídos, formaldehído, dialdehídos, glutaraldehído, glioxal, trímero dihidrato de glioxal, glutaraldehído, hexonas, suberimidato de dimetilo y 3,3'-ditiobispropionimidatoglutaraldehído de dimetilo, epóxidos, bis-oxiranos, dextrano oxidado, hidrazida de p-azidobenzilo, éster de N-[[alfa]-maleimidoacetoxi]succinimida, p-azidofenil glioxal monohidrato, bis-[[beta]-(4-azidosalicilamido)etil]disulfuro, suberato de bis[sulfosuccinimidilo], propionato de ditiobis[succinimidilo], suberato de disuccinimidilo, clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida, diacilcloruros, compuestos monofenólicos y compuestos polifenólicos.
- 20 6. Un sistema de capas en gradiente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que al menos un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable se presenta en forma de una tela, una estructura similar a una red o malla.
- 25 7. Un sistema de capas en gradiente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la al menos una capa de soporte biocompatible se presenta en forma de cintas, hebras, fibras, partículas, gotas, estructuras similares a una red o malla, una plancha, una película, una lámina o un laminado.
- 30 8. Un sistema de capas en gradiente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el sistema de capas en gradiente se siembra con células.
9. Un sistema de capas en gradiente según la reivindicación 8, en el que las células se seleccionan de células madre (de mamíferos, humanos o no humanos) seleccionadas de células madre comprometidas, células diferenciadas, células madre adultas, células madre de médula ósea y células madre de cordón umbilical, células madre manipuladas o no manipuladas, células madre primarias o inmortalizadas, células madre mesenquimales, células de cartílago, células epiteliales, células endoteliales, células endoteliales de tejido vascular y corneal, células cutáneas, osteocitos, osteoblastos, cementoblastos, células óseas, mioblastos, neuroblastos, células fibroblastos de todos los tejidos conjuntivos, fibroblastos gingivales y/o cutáneos y corneales, ya sean solos o junto con fibroblastos de ligamento periodontal, queratinocitos, queratinocitos gingivales, glioblastos, células germinales no humanas, hepatocitos, condrocitos, células de músculo liso, células de músculo cardíaco, células de tejido conjuntivo, células gliales, células que secretan hormonas, células del sistema inmunitario, neuronas, células del sistema nervioso central, células neuronales, pericitos, miocitos, adipocitos, astrocitos, melanocitos, células tisulares, células tisulares de fuentes de tejido autólogas, fuentes de tejido alógenas o fuentes de tejido xenógenas, células autólogas, células alógenas, células xenógenas, células tisulares, células óseas, tenocitos, adipocitos, cardiomiocitos, hepatocitos, células de músculo liso, células endoteliales o una mezcla de células, según se definió anteriormente.
- 40 10. Un sistema de capas en gradiente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el sistema de capas en gradiente comprende, además, citocinas, interleucinas, factores de crecimiento, inmunoglobulinas, péptidos RGD, agentes antibacterianos y agentes farmacéuticos adicionales.
- 45 50

11. Un sistema de capas en gradiente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que al menos un conjunto de capas que comprende un polímero reticulado biocompatible y biodegradable se reticula adicionalmente utilizando un compuesto fenólico.

5 12. Un sistema de capas en gradiente, según se definió, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para uso en el tratamiento de lesiones por quemaduras, tratamiento de heridas debido a lesiones quirúrgicas, lesiones del tejido blando o duro, tratamiento de heridas debido a enfermedades tumorales, tratamiento de heridas crónicas extensas, heridas causadas por una enfermedad, tal como, cáncer, diabetes tipo II, tratamiento de heridas lacerantes, tratamiento de heridas en la cavidad oral, tratamiento de heridas o lesiones en el campo de la oftalmología, en el campo de los defectos periodontales, incluido ligamento periodontal, para regenerar o reconstruir tejidos dañados o enfermos o extraídos, para regenerar o reconstruir tejidos dañados o enfermos o extraídos como resultado de enfermedad de Parkinson o daños de la médula espinal o patologías oncológicas o enfermedad de Alzheimer, tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tratamiento de enfermedades o lesiones traumatólogicas, tratamiento de enfermedades o trastornos en el campo ortopédico, tratamiento, regeneración o reconstitución de cartílago, enfermedades del cartílago o trastornos del cartílago, condropatía, constitución de cartílago en la rodilla y tratamiento de enfermedades articulares.

13. Un biomaterial que comprende un sistema de capas en gradiente, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el biomaterial se selecciona de un biomaterial para medicina regenerativa, para vendaje para heridas o para soporte de tejidos o para preparación del mismo, un tejido o construcciones de órgano o una parte de construcciones de órgano biomanipulado, un corazón biomanipulado, una válvula cardíaca biomanipulada, un hígado biomanipulado, un riñón biomanipulado, un vaso sanguíneo biomanipulado, un músculo esquelético biomanipulado, un músculo cardíaco biomanipulado, un guía para nervio biomanipulado, un vendaje para quemaduras, un vendaje para heridas, un vendaje quirúrgico, un parche cutáneo, una cubierta facial, una construcción vascular, un injerto vascular, un vaso sanguíneo, un vaso coronario para derivación o injerto, una arteria femoral, una arteria poplítea, una arteria braquial, una arteria tibial, una arteria radial o vena correspondiente, una endoprótesis, el revestimiento interior o exterior de una endoprótesis, una válvula cardiovascular, un parche cutáneo, una gragea para ingestión, un implante intraperitoneal, un implante subdérmico, un tendón, una córnea, un ligamento, una prótesis dental, un implante muscular o un guía para nervios, un tejido u órgano manipulado, prótesis, una estructura base tisular, un dispositivo hemostático, un dispositivo o estructuras para reparación de tejido y adhesivos de soporte, un recubrimiento natural o componente para implantes sintéticos; un implante o soporte cosmético, un biomaterial para suministro de sustancias, una plataforma de biomanipulación o una plataforma para evaluación del efecto de sustancias sobre células.

14. Un uso de un sistema de capas en gradiente, según se definió, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la preparación de un biomaterial según se definió en la reivindicación 13.

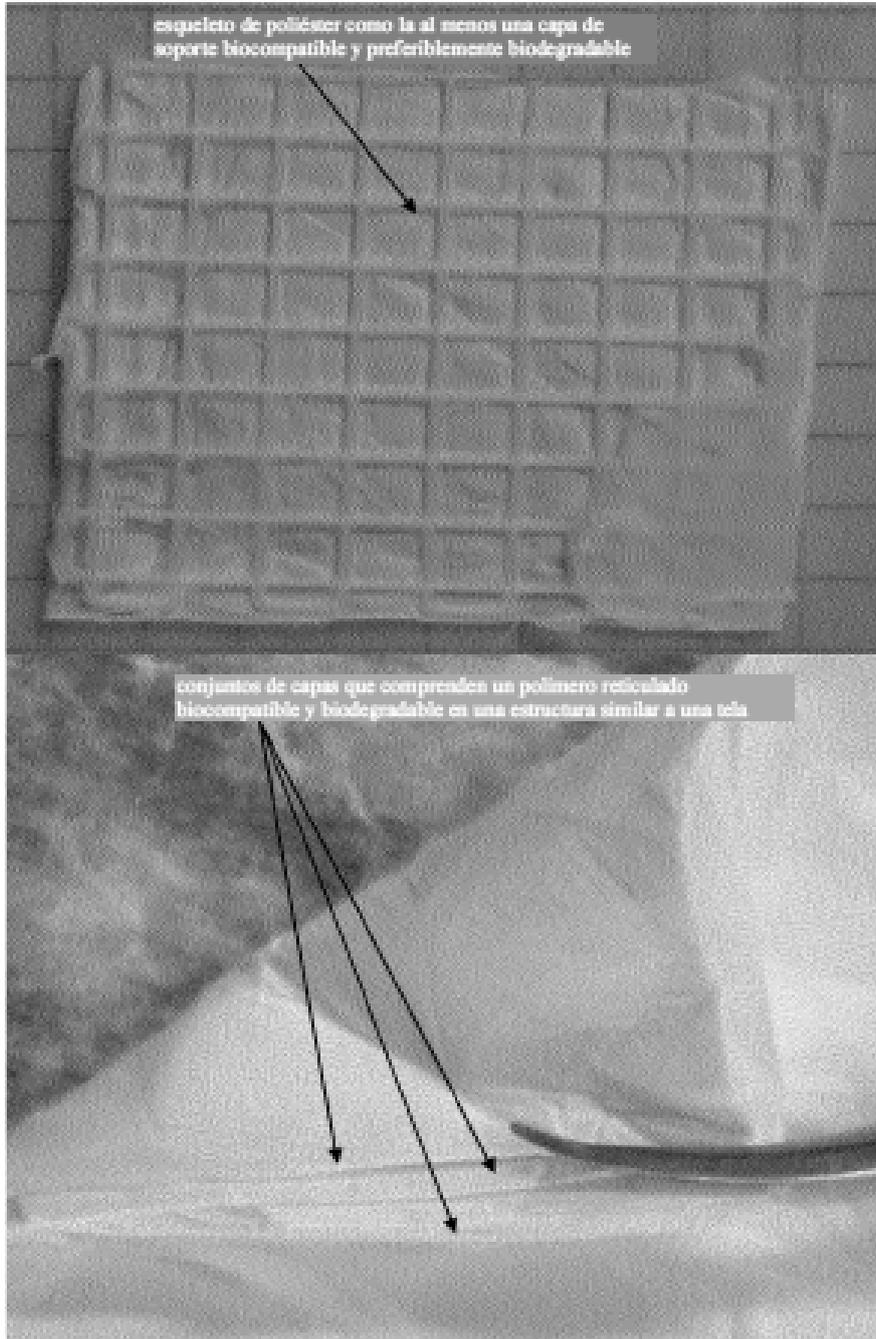


Figura 1

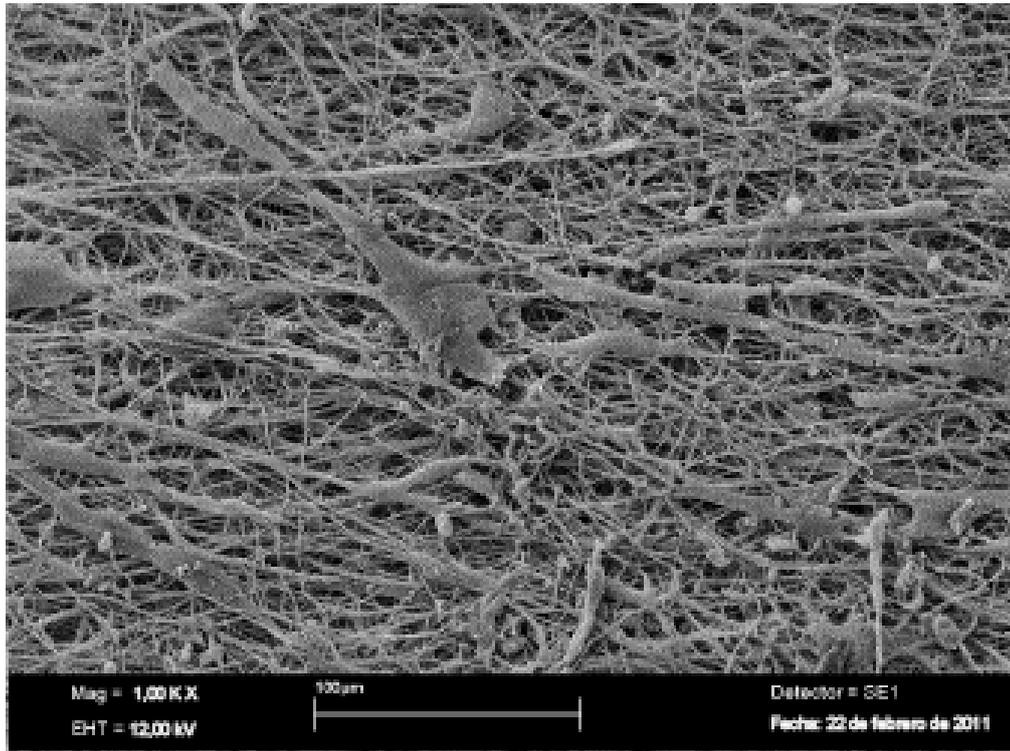


Figura 2

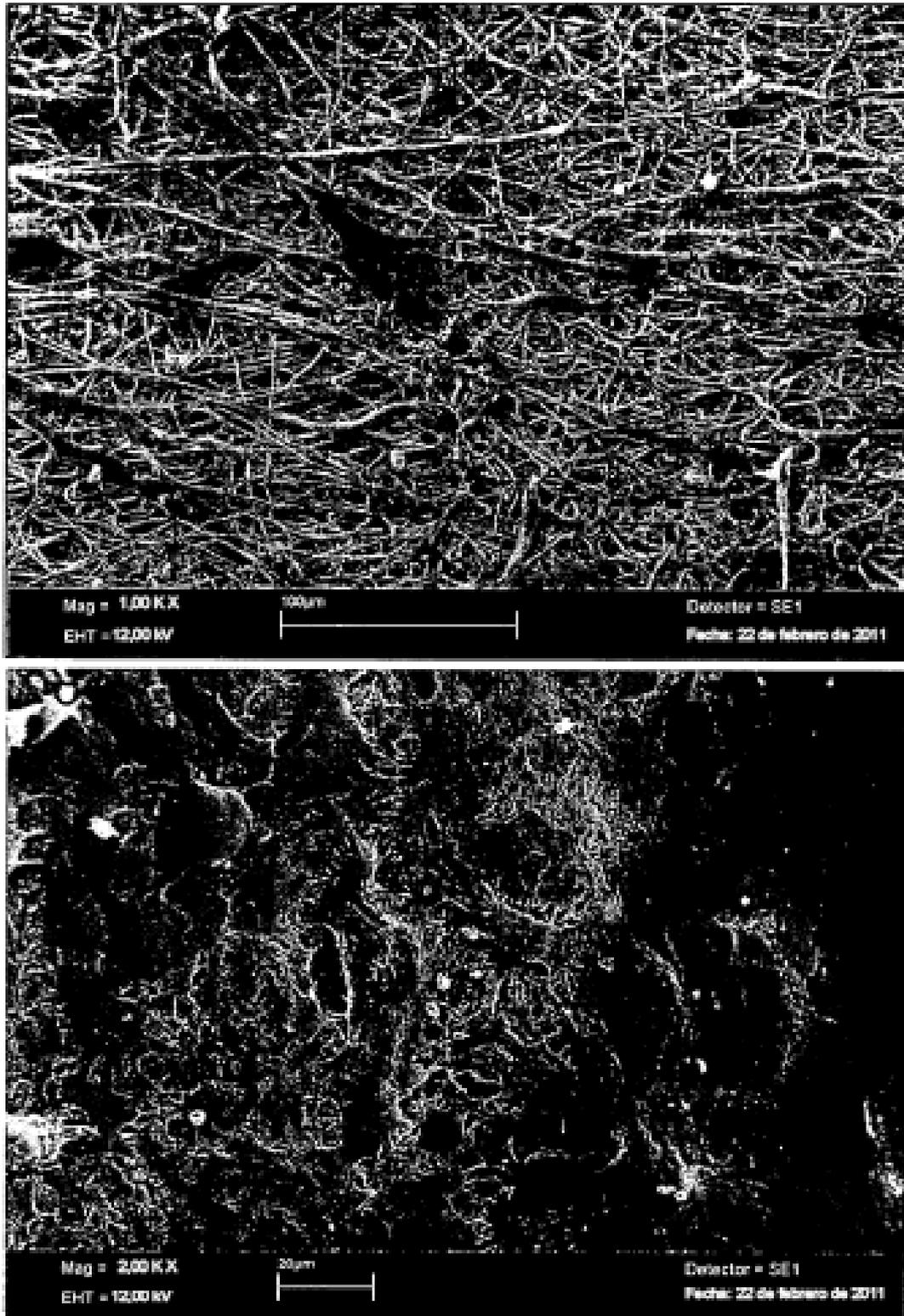


Figura 3