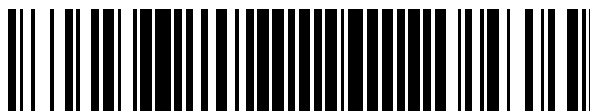


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 237**

51 Int. Cl.:

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

C08J 3/075 (2006.01)

C08L 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.04.2014 PCT/IB2014/060563**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2014 WO14167513**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2014 E 14726766 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2983727**

54 Título: **Hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano, preparación y aplicaciones biomédicas de los mismos**

30 Prioridad:

09.04.2013 PT 10689013

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

29.12.2017

73 Titular/es:

**ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF
TISSUE ENGINEERING AND CELL BASED
TECHNOLOGIES & THERAPIES (A4TEC) (100.0%)
Universidade do Minho-Departamento de
Engenharia de Polimeros 3B's Research group
Campus de Gualtar
4710-057 Braga, PT**

72 Inventor/es:

**PEREIRA DA SILVA, LUCÍLIA;
TEIXEIRA CERQUEIRA, MARIANA;
ROMERO AMANDI DE SOUSA, RUI PEDRO;
PINTO MARQUES, ALEXANDRA MARGARIDA;
CORRELO DA SILVA, VÍTOR MANUEL y
GONÇALVES DOS REIS, RUI LUÍS**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 648 237 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

Hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano, preparación y aplicaciones biomédicas de los mismos

Campo técnico

5 La presente solicitud se refiere a un material de goma de gelano adhesivo celular, a su método de preparación y a aplicaciones biomédicas de los mismos.

Antecedentes

10 La goma de gelano es un exopolisacárido bacteriano de origen natural preparado por fermentación sumergida aeróbica de *Sphingomonas elodea*. La goma de gelano es un polímero lineal y aniónico compuesto por unidades repetitivas de un tetrasacárido (1,3-β-D-glucosa, ácido 1,4-β-D-glucurónico, 1,4-β-D-glucosa, 1,4-α-L-ramnosa), similar a los glucosaminoglicanos existentes en la matriz extracelular.

15 Los hidrogeles de goma de gelano pueden formarse de dos maneras diferentes: por disminución de temperatura de solución crítica inferior y por adición de iones. Por lo tanto, los hidrogeles de goma de gelano se denominan hidrogeles termorreversibles ya que responden a la disminución de la temperatura con una transición sol-gel. De hecho, la goma de gelano tiene una forma de espiral térmicamente reversible a altas temperaturas que al disminuir la temperatura, cambia a doble hélice que se autoensamblan antiparalelas en forma de haces orientados. Estas, llamadas zonas de unión que se unen *per se* a las regiones desenrolladas de cadenas helicoidales extendidas, dan lugar a la formación de una red tridimensional, el hidrogel. Además, el uso de contraiones, específicamente cationes monovalentes o divalentes, promueve un enlace físico entre cationes y grupos carboxilato de la goma de gelano, particularmente fuerte cuando se trata de iones divalentes, lo que da lugar a la formación del hidrogel tridimensional y reticulado. Debido a este mecanismo de formación dual, los hidrogeles de goma de gelano tienen un gran potencial para aplicaciones biomédicas porque pueden gelificar *in situ in vivo*.

20 La Patente WO 2009/101518 A2 del 20 de agosto de 2009 describe por primera vez el uso de hidrogeles de goma de gelano para medicina regenerativa y aplicaciones de ingeniería de tejidos, el sistema y los dispositivos de procesamiento. Se refiere a la posibilidad de utilizar agentes celulares/bioactivos dentro de los hidrogeles, al incluir estos componentes mientras se homogeneiza la matriz a lo largo de la gelificación. Por consiguiente, los hidrogeles de goma de gelano son particularmente atractivos para la ingeniería de tejidos debido a su posibilidad de encapsular células/moléculas bioquímicas. De manera similar a lo que sucede en la mayoría de los nichos celulares de la mayoría de las aplicaciones de ingeniería de tejidos, las células en hidrogeles deben unirse, formar contactos focales y organizar su propio citoesqueleto para propagarse y poder proliferar. Sin embargo, los hidrogeles, incluidos los hidrogeles de goma de gelano, apenas presentan propiedades de adhesión celular ya que carecen de puntos de anclaje celular y/o son altamente hidrofílicas que promueven que las moléculas de agua se unan a la cadena principal del polímero, lo que inhibe la adhesión celular (Chang y Wang 2011). Además, la mayoría de los hidrogeles están compuestos de polímeros cargados negativamente, conocidos por repeler las células cargadas negativamente y limitar la adsorción de proteínas adhesivas celulares. Para superar esta limitación de adhesión celular, se han propuesto diferentes enfoques. Una de las estrategias utilizadas incluye la incorporación, dentro de la matriz polimérica, de moléculas de matriz extracelular (ECM), tales como el colágeno, la trombospondina, la osteopontina, la fibronectina y la vitronectina, que se sabe promueven la adhesión celular. Por otra parte, la mejora de la adsorción de las glicoproteínas fibronectina y vitronectina a la cadena principal del polímero, así como otros componentes proteicos del suero, usados rutinariamente para el cultivo celular, ha sido otro enfoque utilizado para mejorar la adhesión celular a los hidrogeles (von der Mark, Park et al., 2010; Chang y Wang, 2011). De forma similar, las secuencias peptídicas, concretamente RGD, IKVAV o YIGSR, presentes en esas glicoproteínas, se han incorporado en la cadena principal de los polímeros, mediante modificación química antes de la formación de los hidrogeles. De hecho, la Patente estadounidense 2007/A1 del 19 de julio de 2009 describe el uso de la secuencia de péptido RGD para promover la adhesión de células dentro de hidrogeles. El uso de proteínas de fuentes animales introduce problemas de inmunogenicidad y transmisión de enfermedades que desde una perspectiva clínica y desde el punto de vista regulador nunca podrían superarse. Adicionalmente, las modificaciones de polímeros con secuencias de proteínas y/o péptidos no solo requieren mucho tiempo sino que también implican costes significativos asociados al uso de moléculas bioactivas recombinantes.

50 Las estructuras poliméricas secadas con goma de gelano (xerogeles) adquieren rápidamente propiedades de hidrogel de tipo esponjoso después de la rehidratación, que no se observan en los xerogeles hidratados (Patente de los Estados Unidos 2007/0031499 A1), hidrogeles de goma de gelano liofilizados hidratados (Patente de los Estados Unidos 7.147.885 B2), o xerogel/película hidratada que comprende éter de celulosa y goma de gelano (Patente WO2006/037606 A2). Estas patentes no hacen referencia al uso de células y/o moléculas bioactivas.

55 La Patente de los Estados Unidos 2007/0031499 A1 del 8 de febrero de 2009 describe el uso de xerogeles y la incorporación de productos farmacéuticos mientras se preparan los hidrogeles. No se hace referencia a la

rehidratación de los xerogeles, con el uso de células y/o agentes bioactivos. Los autores refieren la inclusión de productos farmacéuticos en xerogeles con técnicas para mantener la sequedad del xerogel y no en su estado hidratado. Debido a que las condiciones de procesamiento de secado pueden ser duras, las propiedades de los medicamentos pueden verse alteradas. En la presente invención, los fármacos y/o moléculas bioactivas se incorporan en las redes poliméricas secas (xerogeles) después de la liofilización, en el momento de la rehidratación, evitando alteraciones químicas que afectan su actividad. Esta patente no hace referencia al uso de células y/o moléculas bioactivas.

La Patente de Estados Unidos 7.147.885 B2 del 12 de diciembre de 2006 describe el uso de goma de gelano nativa, en función de su multifuncionalidad, como en los alimentos. La patente también hace referencia a que los geles y jaleas deshidratados se pueden preparar a partir de geles de goma de gelano, mediante corriente de aire caliente o liofilización. Sin embargo, cuando se añade agua a este hidrogel deshidratado (deshidrogel) y la mezcla se deja reposar, el deshidrogel absorbe fácilmente una gran cantidad de agua y se hincha mostrando propiedades físicas no muy diferentes de las propiedades del hidrogel original antes del secado. En la presente invención, los hidrogeles de tipo esponjoso, la estructura seca después de la rehidratación, logran propiedades físicas diferentes a las de los hidrogeles precursores previos. Esta patente no hace referencia a la rehidratación de los hidrogeles liofilizados con células y/o moléculas bioactivas.

La Patente WO2006/037606 A2 del 13 de abril de 2006 describe el uso de un xerogel/película que comprende éter de celulosa y goma de gelano que se puede usar como forma de almacenamiento en seco del gel o como hidrogel después de la hidratación con una solución acuosa que se puede cargar con los ingredientes activos para una tasa controlada, o en contacto con fluidos corporales acuosos. Nuevamente, el xerogel hidratado, como lo describen los autores, "se hinchan y forman hidrogeles cuando entran en contacto con soluciones acuosas", manteniendo las mismas propiedades observadas en los hidrogeles precursores. Los hidrogeles de tipo esponjoso tienen diferentes propiedades físicas en comparación con los hidrogeles, en términos de morfología, microestructura y propiedades mecánicas. Los hidrogeles de tipo esponjoso tienen mayor porosidad, tamaño de poro y paredes de poro más gruesas, menor contenido de agua, mayor estabilidad física y flexibilidad que da como resultado un carácter adhesivo celular. Además, la Patente WO2006/037606 A2 reivindica el uso de la mezcla tanto de éter de celulosa como de goma de gelano que "combinan sinérgicamente sus beneficios y se complementan entre sí para evitar que se observen sus desventajas cuando se usan solos". En el presente documento, alcanzamos las propiedades físicas principales de los hidrogeles de tipo esponjoso solo mediante el uso de goma de gelano, aunque también se pueden usar otros polímeros junto con la goma de gelano. Esta patente no hace referencia a la rehidratación de los hidrogeles liofilizados con células.

El manuscrito titulado "Propiedades in vitro de la esponja de goma de gelano como relleno dental para mantener el espacio alveolar" de Chang et al., 2012, describe una esponja de goma de gelano seca preparada mediante las siguientes etapas de disolución de goma de gelano, liofilización, reticulación postquímica y finalmente liofilización. El trabajo de Chang et al. de 2012 solo potenció el uso de las esponjas en su estado seco. No se hace referencia a la rehidratación de las esponjas de goma de gelano con células y/o moléculas bioactivas.

La absorción rápida de agua y la estabilidad mecánica de los hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano observados después de su rehidratación solo se observaron de manera similar en hidrogeles superporosos (documento US 2009/0291115 A1)

La Patente de Estados Unidos 2009/0291115 A1 del 26 de noviembre de 2006 describe el método de formación de hidrogel superporoso, que requiere la adición de agentes espumantes mientras se procesa, y la posibilidad de incorporar células viables mientras se prepara el hidrogel. Sin embargo, no se hace referencia al rendimiento celular, tal como la adhesión celular. Los hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano no necesitan ningún polímero/agente adicional y agente/condición de reticulación para crear la arquitectura polimérica final que permita una absorción de agua rápida, estabilidad mecánica y una mejor siembra celular, viabilidad, adhesión, proliferación y diferenciación.

La Patente WO 2009/101518 A2 del 20 de agosto de 2009 describe el uso de hidrogeles de goma de gelano para medicina regenerativa y aplicaciones de ingeniería de tejidos, el sistema y dispositivos de procesamiento. No se hace referencia a la rehidratación con células y/o moléculas bioactivas.

50 Sumario

El material de goma de gelano adhesivo celular se prepara a partir de un hidrogel de goma de gelano después de congelación, liofilización y rehidratación, sin usar prefuncionalización o postfuncionalización. Este material comprende propiedades físicas, morfológicas, mecánicas y biológicas diferentes y ajustables con respecto al hidrogel precursor y permite la adhesión de células que exhiben su fenotipo típico y el atrapamiento/encapsulación de moléculas bioactivas. Este material se puede aplicar en el contexto de la bioingeniería, la ingeniería de tejidos, la medicina regenerativa y las aplicaciones biomédicas, como la administración de fármacos y la regeneración de tejidos, y la ingeniería y reparación de la piel y de los tejidos conectivos.

Así, la presente descripción describe un material de goma de gelano adhesivo celular, que es un hidrogel de goma de gelano de tipo esponjoso con un diámetro de poro entre 10 μm y 900 μm , y un diámetro medio de poro entre 200 μm y 600 μm , un grosor de pared de poro que varía entre 50 μm y 100 μm y un contenido de agua entre el 1000 y el 2500 % (p/p).

- 5 En una realización preferida de la presente invención, el hidrogel de goma de gelano de tipo esponjoso presenta una recuperación de capacidad del 60-80 % de la deformación en 5-15 min y del 90-100 % de recuperación después de 3 horas.

En otra realización de la presente invención, las células atrapadas y adheridas al material de goma de gelano adhesivo celular mantienen su fenotipo.

- 10 En una realización preferida de la presente invención, las moléculas bioactivas están atrapadas en el material de goma de gelano adhesivo celular.

También es un objetivo de la presente invención describir el método para producir el material de goma de gelano adhesivo celular que comprende los siguientes pasos:

- 15
- preparación del hidrogel;
 - congelación, para cristalización en agua y sal en frío;
 - liofilización, para eliminar toda el agua;
 - rehidratación con un solvente o solución.

En una realización preferida de la presente invención, después de la preparación del hidrogel, este se estabiliza en una solución salina.

- 20 En otra realización de la presente invención, la goma de gelano se selecciona de un grupo que comprende goma de gelano con bajo contenido de acilo, goma de gelano con alto contenido de acilo, goma de gelano químicamente modificada o cualquier mezcla de estos polímeros de goma de gelano.

En una realización preferida de la presente invención, la goma de gelano se usa en combinación con otras moléculas que incluyen:

- 25
- moléculas orgánicas seleccionadas de un grupo que comprende polímeros de origen natural o sintético, químicamente modificados o copolímeros, tales como hialuronato, quitosano, colágeno, polietilenglicol y fibrinógeno, tales como péptidos, proteínas, lípidos, polisacáridos;
 - moléculas inorgánicas seleccionadas de un grupo que comprende vidrio bioactivo, hidroxiapatita, fosfato de calcio y hierro.

- 30 En otra realización de la presente invención, la goma de gelano se usa en diferentes cantidades, desde el 0,1 % (p/v) hasta el 10 % (p/v).

En una realización preferida de la presente invención, la preparación del hidrogel comprende la disolución de la goma de gelano en un disolvente y la reticulación mediante un mecanismo de reticulación.

- 35 En otra realización de la presente invención, el disolvente comprende agua, solución de tampón fosfato (PBS), solución salina o medio de cultivo celular.

En una realización preferida de la presente invención, la disolución de la goma de gelano se produce a temperaturas superiores a la temperatura de gelificación crítica del polímero o polímeros, preferentemente a 90 °C y durante 10 a 30 minutos.

- 40 En otra realización de la presente invención, el mecanismo de reticulación para la reticulación comprende mezclar la goma de gelano disuelta con un agente de reticulación, que incluye iones y la disminución de la temperatura por debajo de la temperatura de gelificación crítica de los polímeros.

En una realización preferida de la presente invención, la congelación se realiza durante 1 hora a 1 año, más preferentemente, durante 12 a 44 horas.

- 45 En otra realización de la presente invención, la congelación se realiza a una temperatura entre -4 °C y -196 °C y a diferentes relaciones de enfriamiento desde 0,1 °C por minuto hasta 20 °C por minuto.

En una realización preferida de la presente invención, la temperatura no se altera durante la congelación.

En otra realización de la presente invención, la liofilización se realiza durante un ciclo, a -80 °C y a 0 atm, durante 6 horas a 15 días, preferentemente durante 3-7 días.

5 En una realización preferida de la presente invención, la rehidratación se realiza con un disolvente polar que incluye agua, fluidos corporales simulados (SBF), solución de tampón fosfato (PBS) o medio de cultivo celular.

En otra realización de la presente invención, la rehidratación se realiza con medio de cultivo celular.

En una realización preferida de la presente invención, la rehidratación se realiza con uno o más tipos de células seleccionadas de un grupo que comprende líneas celulares, células primarias, células progenitoras y células madre, que incluyen células madre adiposas humanas (hASC) y células endoteliales microvasculares (hAMEC).

10 En otra realización de la presente invención, la rehidratación se realiza con uno o más tipos de moléculas bioactivas seleccionadas de un grupo que comprende factores de crecimiento, anticuerpos, antibióticos, antimicrobianos, antifúngicos, antimicóticos, factores antiinflamatorios, enzimas, elementos metálicos, hormona del crecimiento, citoquinas, interleuquinas, quimiocinas, factores angiogénicos, factores antiangiogénicos, anticoagulantes, agentes de contraste, agentes quimioterapéuticos, moléculas de la vía de señalización, receptores celulares y ligandos celulares.

15 También es un objetivo de la presente invención describir el uso del material de goma de gelano adhesivo celular en aplicaciones biomédicas, que incluyen la administración de fármacos y la regeneración de tejidos e ingeniería y reparación de piel y tejidos conectivos.

Descripción general

20 La presente solicitud presenta hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano que pueden atrapar/encapsular y soportar la adhesión de células adherentes, que se extienden dentro del material, manteniendo su fenotipo típico y que permanecen viables y proliferativas.

25 La metodología utilizada para obtener hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano implica la preparación del hidrogel, la congelación, la liofilización y la rehidratación con un disolvente/solución con/sin células y con/sin moléculas bioactivas.

No se realiza pre- y/o post-funcionalización con características de adhesivo celular, como se ha enunciado anteriormente para otros hidrogeles, para preparar hidrogeles de tipo esponjoso.

30 El carácter adhesivo celular de los hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano, no observados en los hidrogeles, se explica en parte por sus propiedades físicas, entre las esponjas y los hidrogeles, pero diferente de los hidrogeles precursores.

Las propiedades físicas que son principalmente diferentes son la morfología; la microestructura, tal como la porosidad, el tamaño de poro y el grosor de la pared del poro; el contenido de agua; el rendimiento mecánico tal como la visco-elasticidad, la rigidez, la estabilidad física, la flexibilidad y la capacidad de recuperación.

35 Las propiedades físicas de los hidrogeles de tipo esponjoso y, per se, su rendimiento biológico, se pueden ajustar simplemente manipulando los parámetros implicados en la formación de hidrogeles de tipo esponjoso.

Los parámetros que se pueden variar son, entre otros, el tipo y la cantidad de polímero o polímeros, el tipo y la cantidad de reticulante o reticulantes, el tipo y la composición del disolvente, y el uso de iones/sales utilizados en la preparación de los hidrogeles; las condiciones de congelación (tipo, temperatura, tiempo); las condiciones de liofilización (tiempo, temperatura, presión, número y tiempo de ciclos).

40 Las propiedades físicas que se pueden variar incluyen, pero no se limitan a, la morfología, la microestructura, la forma, la viscoelasticidad, la rigidez, la absorción y el contenido de agua, la adsorción de proteínas, la fragilidad, la ductilidad, la elasticidad, la fluidez, la viscosidad, la permeabilidad, la plasticidad, la estabilidad física y la flexibilidad.

45 El rendimiento biológico que puede variarse o mejorarse incluye, pero no se limita a, la velocidad de viabilidad celular, la proliferación, la adhesión, la propagación, la diferenciación y la señalización de las células adherentes encapsuladas/atrapadas.

El uso de moléculas bioactivas dentro de los hidrogeles de tipo esponjoso permite modular el rendimiento biológico de los materiales al conferir funcionalidades que afectan a la reparación y la regeneración tisular que incluyen, pero no se limitan a, la inflamación, la angiogénesis, la remodelación de la matriz.

La patente propuesta en este documento innova en algunos aspectos distintos y fundamentales de otros.

5 Breve descripción de los dibujos

Sin pretender limitar la descripción en este documento, esta aplicación presenta dibujos adjuntos de las realizaciones ilustradas para una comprensión más fácil.

Figura 1: Ilustra un esquema de la metodología de procesamiento para obtener hidrogeles de tipo esponjoso a partir de hidrogeles precursores (desde hidrogeles de goma de gelano a redes poliméricas secas hasta hidrogeles de tipo esponjoso, a través de la preparación de los hidrogeles y estabilización de la red polimérica en una solución salina, congelación, liofilización y rehidratación con células y con/sin moléculas bioactivas) e ilustra la propagación celular dentro de los materiales.

Figura 2: Muestra (201) la representación esquemática del hidrogel y de la microestructura de la red polimérica del hidrogel de tipo esponjoso (izquierda) e imágenes de microscopía de fluorescencia del citoesqueleto de células madre adiposas humanas (hASC) dentro de hidrogeles de GG al 1,25 % e hidrogeles de tipo esponjoso, después de tinción con Phalloidin-TRITC (rojo) (derecha). (204) Carácter adhesivo celular de hASC dentro de hidrogeles de tipo esponjoso de GG al 1,25 %. (205) Microscopía confocal de unión y diseminación de hASC, después de tinción con Phalloidin-TRITC (rojo) y (206) impresión de la forma celular respectiva después de 14 días de cultivo celular. (207) Viabilidad y estado proliferativo de hASC dentro de hidrogeles de tipo esponjoso de GG al 1,25 %, después de 14 días de cultivo celular. (208) Microscopía de fluorescencia de células muertas (rojas) y vivas (verdes), respectivamente teñidas con yoduro de propidio (PI) y calceína AM, y (209) expresión del marcador Ki-67, indicativo de su estado proliferativo. (210) Influencia del suero en el carácter adhesivo de hASC dentro de hidrogeles de tipo esponjoso de GG al 1,25 %, después de 3 días de cultivo. Imágenes de microscopía de fluorescencia del citoesqueleto de hASC después de tinción con Phalloidin-TRITC (rojo) en medio completo (211) y medio (212) sin suero. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala = 100 μm . 1 - Hidrogel; 2 - Hidrogel de tipo esponjoso. Los números de referencia muestran:

202 - hidrogel; y
203 - hidrogel de tipo esponjoso.

Figura 3: Ilustra la dependencia del carácter adhesivo del hidrogel de tipo esponjoso de goma de gelano con las especificidades de las células. (313) Representación de la eficiencia de atrapamiento de hASC, células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (hDMEC) y queratinocitos humanos (hKC) dentro de hidrogeles de tipo esponjoso de GG al 1,25 % determinados por cuantificación de ADN bicatenario después de 24 h de cultivo. (314) Imágenes representativas de microscopía confocal de hKC (arriba) y células similares a osteoblastos SaOs-2 (abajo), después de tinción Phalloidin-TRITC (rojo), dentro de hidrogeles de GG al 1,25 % (izquierda) e hidrogeles de tipo esponjoso (derecha) después 14 días de cultivo celular que muestra la organización del citoesqueleto celular debido a la adhesión. (315) Imagen de microscopía de fluorescencia representativa de hKC, después de tinción con queratina 14 (verde) y Phalloidin-TRITC (rojo), en hidrogeles de tipo esponjoso de GG al 1,25 % que confirman el mantenimiento del fenotipo de hKC.

Figura 4: Ilustra la siembra de células zonal de células endoteliales dérmicas humanas (hDMEC) y fibroblastos dérmicos humanos (hDFb) dentro de un área específica y confinada de hidrogeles de tipo esponjoso de GG. Las hDMEC se marcaron con el marcador de células endoteliales Dil AcLDL (rojo), las hASC y hDFb se marcaron con el marcador de viabilidad calceína (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala = 100 μm .

Figura 5: Ilustra las propiedades físicas de los hidrogeles de GG y los respectivos hidrogeles de tipo esponjoso que confirman las diferencias entre ellos. (516) Perfil de captación de agua de redes poliméricas secas a lo largo de 7 días de inmersión en PBS. (517) Aspecto macroscópico y micrografías crio-SEM representativas de la microestructura de hidrogeles e hidrogeles de tipo esponjoso de GG al 0,75 % (p/v) (arriba) y de GG al 1,25 % (p/v) (abajo), que muestra el lineamiento de la pared de los poros (azul). (518) Contenido de agua de hidrogeles e hidrogeles de tipo esponjoso. (519) Demostración macroscópica secuencial del carácter quebradizo del hidrogel en contraste con la ductilidad del hidrogel de tipo esponjoso durante el proceso de deformación. (520) Capacidad de recuperación de hidrogeles de tipo esponjoso después de la deformación de la fuerza de compresión. Los números de referencia muestran:

502 - hidrogel; y
503 - hidrogel de tipo esponjoso.

Figura 6: Muestra el efecto de (621) una solución de reticulación, (622) la concentración de polímero, (623) el tiempo de estabilización durante la formación del hidrogel, (624) la temperatura de congelación del hidrogel y el tiempo sobre las propiedades físicas/mecánicas de hidrogeles de goma de gelano de tipo esponjoso. (625)

Módulo compresivo de hidrogeles de GG al 1,25 % reticulados con PBS, medio de cultivo celular y CaCl₂ confirmando la influencia de la solución de reticulación sobre la rigidez de los hidrogeles. (626) Espectros del tamaño de poro de redes poliméricas secas obtenidas a partir de hidrogeles de GG al 1,25 % reticulados con PBS, medio de cultivo celular y CaCl₂ congelado durante 18-20 h, confirmando la influencia de la solución de reticulación sobre la distribución del tamaño de poro de las redes poliméricas secas, determinada por microtomografía de rayos X. (627) Módulo compresivo de hidrogeles de GG al 0,75 % y GG al 1,25 % reticulados con medio de cultivo celular, que demuestra la correlación directa entre la concentración de polímero y la rigidez de los hidrogeles. (628) Representación del porcentaje de pérdida de masa de hidrogeles de GG al 1,25 % reticulados con PBS, medio de cultivo celular y CaCl₂, a lo largo del periodo de estabilización de 48 h en PBS. (629) Efecto del tiempo de estabilización en PBS de hidrogeles de GG al 1,25 % reticulados en diferentes condiciones, sobre el tamaño de poro medio de las respectivas redes poliméricas secas, determinado por microtomografía de rayos X. (630) Efecto de la temperatura de congelación sobre el tamaño medio de los poros y la microestructura de las redes poliméricas secas obtenidas a partir de hidrogeles de GG al 1,25 % reticulados con CaCl₂, determinado por microtomografía de rayos X. (631) Efecto del tiempo de congelación de los hidrogeles de GG al 1,25 % (p/v) reticulados en diferentes condiciones, sobre el tamaño de poro medio de las respectivas redes poliméricas secas, determinado por microtomografía de rayos X.

Figura 7: Ilustra la versatilidad de procesamiento de los hidrogeles de tipo esponjoso de GG. Las redes poliméricas secas se pueden preparar con diferentes formas de acuerdo con la aplicación de medicina regenerativa prevista. Barra de escala = 10 mm.

Figura 8: Ilustra la morfología de hASC dentro de hidrogeles de tipo esponjoso de GG al 1,25 % (p/v), formados a partir de las redes poliméricas secas almacenadas disponibles en el mercado para su uso, durante un periodo de 12 meses. Una imagen de microscopía de fluorescencia representativa de la morfología de hASC dentro de hidrogeles de tipo esponjoso de GG al 1,25 % (p/v), después de 3 días de cultivo, y después de tinción con Phalloidin-TRITC (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala = 100 µm.

Figura 9: Muestra reacción tisular 3 días después del trasplante de (932) hidrogel de tipo esponjoso de goma de gelano/ácido hialurónico, (933) hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano/ácido hialurónico con células madre adiposas humanas y (934) hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano/ácido hialurónico con células madre adiposas humanas y células endoteliales microvasculares adiposas humanas, en heridas por escisión de grosor completo en ratones sin pelo. (935) Representa la condición de control, que solo contiene PBS. El análisis histológico de los explantes teñidos con H&E reveló la absorción de los exudados por los hidrogeles de tipo esponjoso (flechas) y el tejido de granulación significativo (GT, limitado por la línea punteada) en las condiciones experimentales (932-934) en comparación con el control (935).

Figura 10: Muestra la microestructura distintiva de hidrogeles de tipo esponjoso de GG al 1,25 % (p/v) congelados en diferentes condiciones de congelación, obtenidos por microtomografía de rayos X. (1036) Temperatura de congelación de -196 °C mediante el uso de nitrógeno líquido (1037) Temperatura de congelación de -80 °C (1038) Temperatura de congelación de -20 °C.

Descripción de las realizaciones

Con referencia a los dibujos, en la presente invención se describen realizaciones opcionales con más detalle, que sin embargo no pretenden limitar el alcance de la presente solicitud.

Las siguientes definiciones sirven para aclarar y comprender algunas de las terminologías utilizadas en la descripción de esta patente. Las excepciones a estas definiciones se definen a lo largo del texto.

La terminología "hidrogel" tal como se usa en el presente documento se refiere a estructuras de red de polímeros reticulados con grupos o dominios hidrófilos que confieren a los hidrogeles la capacidad de absorber y retener un alto contenido de agua, adquiriendo un carácter viscoelástico y facilitando el transporte de oxígeno, nutrientes y residuos.

La terminología "esponja" tal como se usa en el presente documento se refiere a armazones porosos, con alta capacidad de absorción de agua, y altamente elásticos.

La terminología "redes poliméricas secas" tal como se usa en el presente documento se refiere a estructuras secas, después de la preparación, la congelación y la liofilización del hidrogel.

La terminología "hidrogeles de tipo esponjoso" tal como se usa en el presente documento se refiere a redes poliméricas secas rehidratadas con un disolvente/solución con/sin células y con/sin moléculas bioactivas. Los "hidrogeles de tipo esponjoso" presentan características de esponjas e hidrogeles.

La terminología "material de goma de gelano" tal como se usa en este documento, a menos que se describa de otra manera, se refiere a cualquier estructura preparada con goma de gelano, sola o en combinación con otro polímero o polímeros o copolímero o copolímeros naturales/sintéticos/modificados, péptidos, proteínas, lípidos y polisacáridos, sin excluir otras moléculas. La goma de gelano incluye, pero no se limita a, goma de gelano con bajo contenido de acilo, goma de gelano con alto contenido de acilo, goma de gelano químicamente modificada o cualquier mezcla de

estos polímeros de goma de gelano. Otros polímeros o copolímeros naturales/sintéticos/modificados incluyen, pero no se limitan a, hialuronato, quitosano, colágeno, polietilenglicol y fibrinógeno.

La terminología "xerogel" como se usa en el presente documento se refiere a las estructuras secas obtenidas después de secar los hidrogeles.

5 El término "propiedades físicas" como se usa en el presente documento es cualquier propiedad que se pueda medir y cuyo valor designa el estado de un sistema físico. Las propiedades físicas incluyen, pero no se limitan a, la morfología, la microestructura, la forma, la viscoelasticidad, la rigidez, la absorción de agua, la adsorción de proteínas, la fragilidad, la ductilidad, la elasticidad, la fluidez, la viscosidad, la permeabilidad, la plasticidad, la estabilidad física y la flexibilidad.

10 El término "comportamiento biológico" como se usa en el presente documento se refiere a la actividad celular que incluye, pero no se limita a, la viabilidad, la proliferación, la adhesión, la diseminación, la diferenciación, la señalización y reparación y la regeneración de tejidos incluyendo procesos tales como, pero no limitados a, la inflamación, la angiogénesis, la remodelación de la matriz.

15 La terminología "moléculas bioactivas" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier molécula que tenga algún efecto beneficioso o adverso sobre una célula, tejido u organismo vivo. Las moléculas incluyen, entre otras, factores de crecimiento, anticuerpos, antibióticos, antimicrobianos, antifúngicos, antimicóticos, factores antiinflamatorios, enzimas, elementos metálicos, hormona del crecimiento, citoquinas, interleuquinas, quimiocinas, factores angiogénicos, factores antiangiogénicos, anticoagulantes, agentes de contraste, agentes quimioterapéuticos, una molécula de la vía de señalización, un receptor celular y un ligando celular.

20 Otras terminologías, tales como todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento, han sido descritas previamente por otros y tienen el mismo significado. Esta terminología es entendida habitualmente por alguien que se encuentre dentro del campo científico de la presente invención.

25 Las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a "un hidrogel" incluye una pluralidad de dichos hidrogeles y la referencia a "el polímero" incluye la referencia a uno o más polímeros y equivalentes.

Los hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano son capaces de atrapar/encapsular células adherentes, que se diseminan dentro del material, manteniendo su fenotipo y permaneciendo viables y proliferativas.

30 El carácter adhesivo celular de los hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano, no observados en los hidrogeles, se explica en parte por sus propiedades físicas, entre las esponjas y los hidrogeles, a diferencia de los hidrogeles precursores.

Las propiedades físicas que son diferentes principalmente son la morfología, la microestructura, tal como la porosidad y el tamaño de poro; el contenido de agua; el rendimiento mecánico, tal como la visco-elasticidad, la rigidez, la estabilidad física y la flexibilidad.

35 El hidrogel de goma de gelano de tipo esponjoso se caracteriza por que tiene un diámetro de poro entre 10 μm y 900 μm , y un diámetro medio de poro entre 200 μm y 600 μm ; el grosor de la pared del poro oscila entre 50 μm y 100 μm y un contenido de agua entre el 1000 y el 2500 %, determinado por la diferencia entre el peso de los materiales en estado húmedo (W_w) y el peso de los materiales en estado seco (W_d), según a la siguiente expresión: Contenido de agua (%) = $(W_w - W_d) / W_d \times 100$; y la capacidad de recuperación del 60-80 % de la deformación en 5-15 min y del 90-100 % de recuperación después de 3 horas.

40 Las propiedades físicas de los hidrogeles de tipo esponjoso y, per se, su rendimiento biológico, se pueden ajustar simplemente manipulando los parámetros implicados en la formación de hidrogeles de tipo esponjoso.

El uso de moléculas bioactivas dentro de los hidrogeles de tipo esponjoso modifica el rendimiento biológico de los materiales.

45 La metodología utilizada para obtener hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano implica los siguientes pasos de preparación del hidrogel, congelación, liofilización y rehidratación con cualquier solución salina con/sin células y con/sin moléculas bioactivas.

La preparación de los hidrogeles de goma de gelano comprende la disolución de goma de gelano sola o en combinación con otras en un disolvente y el uso de un mecanismo de reticulación para la reticulación.

- Los hidrogeles de goma de gelano se forman con goma de gelano, solos o en combinación con otros polímeros o copolímeros naturales/sintéticos/modificados, péptidos, proteínas, lípidos y polisacáridos, sin excluir otras moléculas. La goma de gelano incluye, pero no se limita a, goma de gelano con bajo contenido de acilo, goma de gelano con alto contenido de acilo, goma de gelano químicamente modificada o cualquier mezcla de estos polímeros de goma de gelano. Otros polímeros o copolímeros naturales/sintéticos/modificados incluyen, pero no se limitan a, hialuronato, quitosano, colágeno, polietilenglicol y fibrinógeno.
- 5
- En una realización preferida, no existe una limitación particular a la concentración de polímero, aunque esto se debería seleccionar con respecto a su viscosidad para fabricar los hidrogeles más homogéneos, en las condiciones de disolución del polímero o polímeros.
- 10
- En una realización preferida, la goma de gelano se usa en diferentes cantidades, desde el 0,1 % (p/v) hasta el 10 % (p/v).
- En una realización preferida, el disolvente utilizado para preparar los hidrogeles de goma de gelano es un disolvente a base de agua, por ejemplo, agua, solución de tampón fosfato, etc.
- 15
- En una realización preferida, los hidrogeles de goma de gelano se preparan mediante reticulación física, tal como térmica e iónica, sin excluir otra reticulación física o química o el uso de otros agentes de reticulación.
- 20
- En una realización preferida, los hidrogeles de goma de gelano se preparan por disolución del polímero o polímeros a temperaturas superiores a la temperatura de gelificación crítica del polímero o polímeros, normalmente 90 °C, durante aproximadamente 10 a 30 minutos dependiendo de la disolución del polímero o polímeros; y mezclando la solución polimérica con el agente de reticulación y/o disminuyendo la temperatura por debajo de la temperatura de gelificación crítica del polímero o polímeros, para promover el entrecruzamiento del polímero (reticulación). Si usa otra condición/agente de reticulación, esto debe añadirse en esta etapa.
- 25
- Se pueden obtener hidrogeles con diferentes formas añadiendo la solución que contiene el polímero o polímeros y el reticulante o reticulantes en moldes específicos donde se gelifica la solución polimérica. Se pueden obtener hidrogeles con diferentes formas, tales como discos, bloques, membranas/láminas/láminas retorcidas/películas, forma amorfa, tiras, monolitos, sin excluir otras formas.
- 30
- Para obtener hidrogeles en forma de fibras, gránulos, micropartículas o perlas, la solución polimérica puede cargarse en un dispositivo de tipo jeringa y dispensarse en una solución de reticulación. El tamaño del material obtenido, tal como el grosor y/o el diámetro, depende del tamaño de la aguja y del volumen de la solución polimérica dispensada.
- 35
- En una realización preferida, los hidrogeles de goma de gelano se dejan estabilizar en una solución salina para alcanzar su estado de hinchamiento en equilibrio.
- En una realización preferida, la solución salina de estabilización es una solución salina tamponada con fosfato, que no excluye otras soluciones salinas.
- En una realización preferida, la estabilización en una solución salina se produce de 0 a 48 h, sin excluir otros periodos de estabilización.
- 40
- Los hidrogeles de goma de gelano se congelan a temperaturas inferiores a 0 °C, para cristalizar en agua y sal en frío.
- En una realización preferida, los hidrogeles se congelan durante 1 hora a 1 año, más preferentemente, de 12 a 44 horas, sin excluir otros periodos de congelación.
- En una realización preferida, los hidrogeles se congelan a temperaturas entre -4 °C y -196 °C, preferentemente a -20 °C, -80 °C o -196 °C, sin excluir otras temperaturas negativas. El método de acuerdo con la descripción anterior, en el que la congelación se realiza a diferentes relaciones de enfriamiento desde 0,1 °C por minuto hasta 20 °C por minuto.
- 45
- En una realización preferida, la temperatura no se altera durante el periodo de congelación.
- Los hidrogeles de goma de gelano congelados se liofilizan para eliminar completamente toda el agua.
- El tiempo del proceso de liofilización debería ser suficiente para sublimar toda el agua.

En una realización preferida, la liofilización se realiza durante un ciclo, a -80 °C y 0 Pa (0 atm), durante 6 horas a 15 días, preferentemente durante 3-7 días, sin excluir otros ciclos de liofilización, temperaturas, tiempos y presiones.

5 En una realización preferida, las redes poliméricas secas obtenidas en la liofilización, los xerogeles, se esterilizan. En una realización más preferida, la esterilización se realiza mediante óxido de etileno, radiación gamma o luz ultravioleta, sin excluir otros métodos.

En una realización preferida, las redes poliméricas secas se empaquetan y almacenan listas antes de su uso, en condiciones de humedad y temperatura controladas.

Las redes poliméricas secas de goma de gelano se rehidratan en cualquier momento con un disolvente/solución con/sin células y con/sin moléculas bioactivas.

10 En una realización preferida, la rehidratación se realiza con el medio de cultivo celular, sin excluir otras soluciones tales como PBS o agua, o fluidos corporales simulados (SBF).

Con el fin de obtener una distribución homogénea de los elementos a encapsular/atrapados/incorporados, se prepara una suspensión/solución de la solución de rehidratación designada, con o sin células y/o moléculas bioactivas a la cantidad/concentración deseada, en un pequeño volumen.

15 En una realización preferida, la suspensión/solución de rehidratación se administra en la parte superior de las redes poliméricas secas de goma de gelano, formando los hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano.

20 En un enfoque limitado y localizado, con la posibilidad de lograr atrapamiento/encapsulación/incorporación celular zonal y/o de agente bioactivo en una ubicación específica de los hidrogeles de tipo esponjoso, la suspensión/solución se inyecta en una ubicación específica de la estructura de redes poliméricas secas de goma de gelano o de los hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano.

La variedad de células que se pueden encapsular/atrapar dentro de los hidrogeles de tipo esponjoso es bastante amplia. Diferentes entidades celulares, de origen humano o animal, tales como, pero sin limitarse a, líneas celulares, células primarias, células progenitoras, y células madre pluri y multipotentes pueden quedar atrapadas dentro de los hidrogeles de tipo esponjoso.

25 Las líneas celulares incluyen, entre otras, L929, MRC-5, Saos-2, ATDC5, HeLa, MC3T3, C2C12, MG63, líneas celulares cancerosas. Las células primarias incluyen, pero no se limitan a, osteoblastos, fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, células epiteliales, condrocitos, cardiomiocitos, neuronas, melanocitos, células de músculo liso.

30 Las células madre incluyen, pero no se limitan a, células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias, células madre mesenquimales/estromales, células madre neurales, células madre epidérmicas, células madre endoteliales, células madre gastrointestinales, células madre hepáticas, células madre de sangre del cordón, células madre del líquido amniótico, células madre del músculo esquelético, células madre del músculo liso, células madre pancreáticas, células madre olfativas, células madre cancerosas, células madre pluripotentes inducidas; y células diferenciadas de células madre y células progenitoras incluyen, pero sin limitación, células epiteliales, epidérmicas y endoteliales, adipocitos, cardiomiocitos, neuronas, osteoblastos, condrocitos, células de los islotes pancreáticos, células retinianas.

35 La variedad de moléculas bioactivas que se pueden encapsular/atrapar dentro de los hidrogeles de tipo esponjoso es bastante amplia. Diferentes moléculas bioactivas, tales como factores de crecimiento, anticuerpos, antibióticos, antimicrobianos, antifúngicos, antimicóticos, factores antiinflamatorios, enzimas, elementos metálicos, hormona del crecimiento, citoquinas, interleuquinas, quimiocinas, factores angiogénicos, anticoagulantes, agentes de contraste, agentes quimioterapéuticos, una molécula de la vía de señalización, un receptor celular y un ligando celular pueden quedar atrapados dentro de los hidrogeles de tipo esponjoso.

40 En una realización preferida, los hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano con células atrapadas se mantienen a 37 °C, en condiciones de humedad y de dióxido de carbono óptimas para el cultivo celular *in vitro*.

45 A continuación, se describirán las principales ventajas de la presente invención.

Los hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano tienen un carácter adhesivo celular que permite la encapsulación/atrapamiento y adhesión celular, en el que las células mantienen su fenotipo, sin ninguna pre- y/o post-funcionalización con las secuencias de adhesivo celular.

Todos los tipos de células, que comprenden linajes celulares representativos de las tres capas germinales, pueden atraparse, adherirse y extenderse dentro de los hidrogeles de tipo esponjoso. Este fenómeno constituye un hito importante para el campo biomédico, que permite el atrapamiento de células funcionales, como células madre pluri y multipotentes, osteoblastos, queratinocitos, células endoteliales, etc., dentro de un biomaterial.

- 5 Al preparar hidrogeles de tipo esponjoso no se realiza pre y/o post-funcionalización con características de adhesivo celular, como se ha enunciado anteriormente para otros hidrogeles.

El carácter adhesivo celular de los hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano, no observados en los hidrogeles, se explica en parte por sus propiedades físicas, entre las esponjas y los hidrogeles, a diferencia de los hidrogeles precursores.

- 10 Las propiedades físicas de los hidrogeles de tipo esponjoso que son diferentes principalmente son la morfología, la microestructura, tal como la porosidad y el tamaño de poro; el contenido de agua; el rendimiento mecánico, tal como la visco-elasticidad, la rigidez, la estabilidad física, la flexibilidad y la capacidad de recuperación. Considerando la aplicación clínica, los hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano se benefician relativamente de los hidrogeles tradicionales precursores debido a la posibilidad de que haya materiales disponibles en el mercado para usar como
15 redes poliméricas secas.

- El paso final de la preparación de los hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano, que, desde una perspectiva clínica, se puede comparar directamente con la preparación del hidrogel tradicional con la incorporación de células y/o moléculas bioactivas, es menos complejo y requiere menos tiempo. Los hidrogeles de tipo esponjoso se preparan a través de una metodología simple de rehidratación de materiales disponibles en el mercado que
20 comprenden la estabilidad a largo plazo almacenados después de la esterilización.

Los hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano también evitan la problemática de la reducida ventana de temperatura para la reticulación en hidrogeles de goma de gelano que podría contribuir a una distribución celular no homogénea.

- 25 Los hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano también evitan el uso de temperaturas potencialmente duras durante el tiempo de encapsulación de las células, lo que puede causar una muerte celular significativa.

Los hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano pueden manipularse fácilmente y trasplantarse al paciente debido a sus propiedades elásticas, lo que facilita su uso por parte de los médicos, en contraste con los hidrogeles rígidos y fácilmente rompibles.

- 30 Las propiedades físicas de los hidrogeles de tipo esponjoso y, per se, su rendimiento biológico, se pueden ajustar simplemente manipulando los parámetros implicados en la formación de hidrogeles de tipo esponjoso.

Como realización de lo que puede variarse en la etapa 1 se encuentra la concentración del polímero o polímeros, las propiedades fisicoquímicas del polímero o polímeros, el tipo o tipos de disolventes utilizados para la disolución del polímero o polímeros y el tipo, la cantidad y el número de reticulante o reticulantes.

- 35 Como realización de lo que se puede variar en la estabilización en solución salina se encuentra el tiempo y la solución iónica utilizada para la estabilización de hidrogel.

Como realización de lo que se puede variar al congelar se encuentra el tipo de congelación, tal como la inmersión en nitrógeno líquido o la congelación en un congelador, la temperatura, la velocidad y el tiempo de enfriamiento.

Como realización de lo que se puede variar en el secado por congelación se encuentra el tiempo, presión, temperatura y ciclos del proceso de liofilización, que influye directamente en la disposición de la red polimérica.

- 40 Las propiedades físicas que se pueden variar incluyen, pero no se limitan a, la morfología, la microestructura, la forma, la viscoelasticidad, la rigidez, la absorción de agua, la adsorción de proteínas, la fragilidad, la ductilidad, la elasticidad, la fluidez, la viscosidad, la permeabilidad, la plasticidad, la estabilidad física, y la flexibilidad.

- 45 El rendimiento biológico que puede variarse o mejorarse incluye, pero no se limita a, la eficacia de la siembra celular, el control espacial celular, la viabilidad celular, la proliferación celular, la adhesión celular, la difusión celular, la diferenciación celular y la señalización celular.

La variación de las propiedades físicas del hidrogel de tipo esponjoso de goma de gelano también es determinante para modular los agentes bioactivos que están atrapados, la concentración y el momento de su administración.

En conjunto, estas características potencian la aplicación de hidrogeles de tipo esponjoso como dispositivos médicos y/o como sistemas de suministro de fármacos y/o como andamios para ser utilizados en la regeneración de tejidos celulares y/o estrategias de ingeniería.

Ejemplos

- 5 Los siguientes ejemplos se proporcionan con divulgación y descripción completa de cómo preparar y usar la presente invención; los hidrogeles de tipo esponjoso. Los experimentos no fueron los únicos experimentos realizados y no se proporcionan para limitar la invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio y la temperatura se encuentra en grados Celsius. Se pueden usar abreviaturas convencionales, por ejemplo, °C para Celsius, o s, segundo(s); min, minuto(s); h o hr, hora(s).

Ejemplo 1

Como primer ejemplo, los hidrogeles de tipo esponjoso de materiales compuestos de goma de gelano se han definido para ser utilizados en ingeniería y reparación óseas.

- 15 Se puede preparar un hidrogel de tipo esponjoso de materiales compuestos osteoconductor de goma de gelano y vidrio bioactivo y/o hidroxiapatita. Las células madre, tales como las células madre adiposas humanas, pueden quedar atrapadas dentro del material osteoconductor y las moléculas conocidas por promover la diferenciación osteogénica, como el β -glicerofosfato, el ácido ascórbico, la dexametasona, así como factores de crecimiento como la proteína morfogenética ósea (BMP), el factor de crecimiento transformante (TGF)- β y el factor de crecimiento
- 20 endotelial vascular (VEGF), también pueden quedar atrapados dentro del hidrogel osteoconductor de tipo esponjoso de goma de gelano. El material propuesto con células atrapadas y agentes bioactivos mejora la formación de tejido óseo. Brevemente, el polvo de gelzan (SIGMA, EE.UU.) se disuelve en agua desionizada (1,25 % (p/v)), bajo agitación y a 90 °C. Se disuelve vidrio bioactivo (1 % (p/v)) o/e hidroxiapatita (10 % (p/v)) en la solución de reticulación que contiene CaCl_2 (0,03 % (p/v), VWR, Portugal). Después de la disolución de gelzan, la solución se mezcla rápidamente con la solución de reticulación y se vierte en los moldes deseados, de acuerdo con el defecto
- 25 óseo. El hidrogel se forma progresivamente hasta que se alcanza la temperatura ambiente. Los hidrogeles se estabilizan en PBS durante 30 h, a continuación se congelan a -80 °C en el congelador durante 44 h, y posteriormente se liofilizan para obtener redes poliméricas secas. Se dispensa gota a gota una suspensión de células madre mesenquimales humanas (5×10^5 células y preparada en un volumen de 100 μl del medio de cultivo correspondiente) con los agentes bioactivos, como BMP (20 ngml^{-1}), VEGF (5 ngml^{-1}), β -glicerofosfato (10 mM), ácido ascórbico (50 μgml^{-1}), y/o dexametasona (10 nM), conocida por promover la diferenciación osteogénica, en la parte superior de las redes poliméricas secas. Las construcciones se incubaron durante 30 min, a 37 °C, 5 % de CO_2 en el medio de cultivo celular para permitir el máximo atrapamiento celular dentro de las estructuras y después se añade medio fresco hasta un volumen total de 2 ml.

35 Ejemplo 2

Como segundo ejemplo, se ha determinado que se usan hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano/hialurónico para la ingeniería de la piel.

- Las principales propiedades físicas de los hidrogeles de tipo esponjoso son similares a las propiedades de la matriz extracelular que existe en los tejidos blandos, como la piel. Estos materiales tienen la capacidad de absorber y
- 40 retener agua, mayor que los hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano debido a la incorporación de ácido hialurónico, importante para mantener la herida húmeda y para la absorción de exudados de la herida. Además, debido a su estabilidad física, los hidrogeles de tipo esponjoso evitan los golpes físicos y, debido a sus propiedades mecánicas, específicamente su rápida recuperación de la deformación y elasticidad, los hidrogeles de tipo esponjoso pueden adaptarse fácilmente a la herida y no romperse con el movimiento de los pacientes. Además, dado que las
- 45 redes poliméricas secas pueden producirse con diferentes formas, es posible producir apósitos con formas y tamaños específicos según la herida del paciente. Además, los hidrogeles de tipo esponjoso son capaces de atrapar células de diferentes linajes celulares existentes en la piel o células madre que son capaces de adherirse y mantener su fenotipo dentro de hidrogeles de tipo esponjoso. Por lo tanto, mediante el uso de atrapamiento de células confinadas, se pueden atrapar diferentes tipos de células a diferentes profundidades de los hidrogeles de tipo
- 50 esponjoso, lo que permite imitar la complejidad de las capas de la piel en términos de contenido celular.

- Brevemente, el ácido hialurónico (1,5 MDa, LifeCore, EE.UU.) se disuelve en agua desionizada bajo agitación, a temperatura ambiente, durante 3 h (0,25 % y 0,75 % (p/v)). A continuación, se añade polvo de gelzan (SIGMA, EE.UU.) a la solución de ácido hialurónico (0,75 % y 1,25 % (p/v)) y se disuelve con agitación y a 90 °C. Después de la disolución, las soluciones se moldean en los moldes deseados, de acuerdo con el defecto de la herida del
- 55 paciente, y se mezclan rápidamente con la solución de reticulación del medio MEM alfa (Life Technologies, Escocia).

El hidrogel se forma progresivamente hasta que se alcanza la temperatura ambiente. Los hidrogeles de tipo esponjoso se preparan a partir de estos hidrogeles siguiendo pasos sucesivos. Los hidrogeles se estabilizan en PBS durante 48 h, y a continuación se congelan a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el congelador durante 18-20 h, y luego se liofilizan durante tres días para obtener redes poliméricas secas de GG-HA. Los hidrogeles de tipo esponjoso se forman después de la rehidratación de las redes poliméricas secas con una suspensión celular de cada tipo de célula. Para la siembra/atrapamiento de células dentro de hidrogeles de tipo esponjoso, se dispensa gota a gota una suspensión celular de células madre adiposas humanas (hASC) o de células madre adiposas humanas (hASC) y células endoteliales microvasculares (HAMEC) (5×10^5 células y preparado en un volumen de 100 μl del medio de cultivo correspondiente) en la parte superior de los hidrogeles de tipo esponjoso. Las construcciones se incubaron durante 30 min, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % de CO_2 para permitir el máximo atrapamiento celular dentro de las estructuras y luego se añadió medio fresco hasta un volumen total de 2 ml. La Figura 9 muestra la reacción del tejido de la piel 3 días después del trasplante de hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano/hialuronato con hASC solas, y hASC y hAMEC.

Ejemplo 3

Como tercer ejemplo, se prepararon hidrogeles de tipo gel esponjoso de goma de gelano que comprendían diferentes microestructuras como depósitos de fármacos para la administración de fármacos.

Los hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano preparados utilizando diferentes metodologías de procesamiento presentaban diferentes propiedades físicas. Mediante el uso de hidrogeles de tipo esponjoso de goma de gelano con diferentes microestructuras, específicamente porosidades y tamaños de poros, se pueden lograr diferentes tasas de administración. Por lo tanto, se pueden obtener administraciones rápidas de fármacos con hidrogeles de tipo esponjoso de GG que comprenden altas porosidades y tamaños de poro (por ejemplo, hidrogeles de tipo esponjoso de GG que contienen el 0,75 % de GG, reticulados con CaCl_2 , 30 h de tiempo de estabilización, una temperatura de congelación de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 18-20 h de tiempo de congelación) mientras que se pueden lograr administraciones lentas con hidrogeles de tipo esponjoso de GG con baja porosidad y tamaño de poro (por ejemplo, hidrogeles de tipo esponjoso de GG que contienen el 1,25 % de GG, reticulados con PBS, 30 h de tiempo de estabilización, una temperatura de congelación $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 18-20 h de tiempo de congelación). Brevemente, se disolvió polvo de gelzan (SIGMA, EE.UU.) en agua desionizada (0,75 % y 1,25 % (p/v)), bajo agitación y a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de la disolución, las soluciones se fundieron en los moldes deseados y se mezclaron rápidamente con la solución de reticulación que contenía cationes mono y/o divalentes tales como CaCl_2 (VWR, Portugal), solución salina tamponada con fosfato (PBS, Sigma, EE. UU.) o medio MEM alfa (Life Technologies, Escocia). El hidrogel se formó progresivamente hasta que se alcanzó la temperatura ambiente. Se prepararon hidrogeles de tipo esponjoso a partir de estos hidrogeles siguiendo pasos sucesivos. Los hidrogeles se estabilizaron en PBS (2 h y 48 h), y a continuación se congelaron ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en nitrógeno líquido (N_2), $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el congelador durante 18-20 h y 42-44 h), y luego se liofilizaron (LyoAlfa 10/15, Telstar, España) durante tres días para obtener redes poliméricas secas de GG. Se formaron hidrogeles de tipo esponjoso después de la rehidratación de las redes poliméricas secas. La Figura 10 muestra el análisis de micro-CT de hidrogeles de tipo esponjoso con diferentes propiedades físicas.

Referencias

- Annabi, N., J. W. Nichol, et al. (2010). "Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering." *Tissue Eng Part B Rev* 16(4): 371-383.
- Chang, H.-I. y Y. Wang (2011). "Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds." *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*.
- Flory, P. J. (1942). "Thermodynamics of High Polymer Solutions." *Journal of chemical physics* 10: 59-61.
- Holden, A. y P. Morrison (1982). *Crystals & Crystal Growing*.
- Oetjen, G.-W. y P. Haseley (2004). *Freeze-drying. Freeze-drying. W.-V. G. C. KGaA*.
- Oliveira, J. T., L. Martins, et al. (2010). "Gellan gum: a new biomaterial for cartilage tissue engineering applications." *J Biomed Mater Res A* 93(3): 852-863.
- von der Mark, K., J. Park, et al. (2010). "Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix." *Cell Tissue Res* 339(1): 131-153.

REIVINDICACIONES

1. Un material de goma de gelano adhesivo celular, en el que dicho material es un hidrogel de goma de gelano de tipo esponjoso con un diámetro de poro entre 10 μm y 900 μm , y un diámetro medio de poro entre 200 μm y 600 μm , un grosor de pared de poro que varía entre 50 μm y 100 μm y un contenido de agua entre el 1000 y el 2500 % (p/p).
- 5 2. Material de goma de gelano adhesivo celular de acuerdo con la reivindicación anterior, en el que dicho material presenta una recuperación de capacidad del 60-80 % de la deformación en 5-15 min y el 90-100 % de recuperación después de 3 horas.
3. Material de goma de gelano adhesivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células están atrapadas y adheridas mientras mantienen su fenotipo.
- 10 4. Material de goma de gelano adhesivo celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las moléculas bioactivas están atrapadas.
5. Método para producir el material de goma de gelano adhesivo celular descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende los siguientes pasos:
 - preparación del hidrogel;
 - 15 - congelación, para cristalización en agua y sal en frío;
 - liofilización, para eliminar toda el agua;
 - rehidratación con un solvente o solución.
6. Método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que después de la preparación del hidrogel, el hidrogel se estabiliza en una solución salina.
- 20 7. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 5-6, en el que la goma de gelano se selecciona de un grupo que comprende goma de gelano con bajo contenido de acilo, goma de gelano con alto contenido de acilo, goma de gelano químicamente modificada o cualquier mezcla de estos polímeros de goma de gelano.
- 25 8. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 5-7, en el que la goma de gelano se usa en combinación con otras moléculas que incluyen:
 - moléculas orgánicas seleccionadas de un grupo que comprende polímeros de origen natural o sintético, químicamente modificados o copolímeros, tales como hialuronato, quitosano, colágeno, polietilenglicol y fibrinógeno, tales como péptidos, proteínas, lípidos, polisacáridos;
 - 30 - moléculas inorgánicas seleccionadas de un grupo que comprende vidrio bioactivo, hidroxiapatita, fosfato de calcio y hierro.
9. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 5-8, en el que la goma de gelano se usa en diferentes cantidades, desde el 0,1 % (p/v) hasta el 10 % (p/v).
- 35 10. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 5-9, en el que la preparación del hidrogel comprende la disolución de la goma de gelano en un disolvente y la reticulación mediante un mecanismo de reticulación.
11. Método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el disolvente comprende agua, solución de tampón fosfato (PBS), solución salina o medio de cultivo celular.
- 40 12. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-11, en el que la disolución de la goma de gelano se produce a temperaturas superiores a la temperatura de gelificación crítica del polímero o polímeros, preferentemente a 90 °C y durante 10 a 30 minutos.
13. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que el mecanismo de reticulación para la reticulación comprende mezclar la goma de gelano disuelta con un agente de reticulación, que incluye iones y disminuir la temperatura por debajo de la temperatura de gelificación crítica de los polímeros.

14. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 5-13, en el que la congelación se realiza durante 1 hora a 1 año, más preferentemente, durante 12 a 44 horas.
15. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 5-14, en el que la congelación se realiza a una temperatura entre -4 °C y -196 °C.
- 5 16. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 5-15, en el que la congelación se realiza a diferentes relaciones de enfriamiento desde 0,1 °C por minuto hasta 20 °C por minuto.
17. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 5-16, en el que la temperatura no se altera durante la congelación.
- 10 18. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 5-17, en el que el secado por congelación se realiza durante un ciclo, a -80 °C y a 0 Pa (0 atm), durante 6 horas a 15 días, preferentemente durante 3-7 días.
19. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 5-18, en el que la rehidratación se realiza con un disolvente polar que incluye agua, fluidos corporales simulados (SBF), solución de tampón fosfato (PBS) o medio de cultivo celular.
- 15 20. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 5-19, en el que la rehidratación se realiza con medio de cultivo celular.
21. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 5-20, en el que la rehidratación se realiza con uno o más tipos de células seleccionadas de un grupo que comprende líneas celulares, células primarias, células progenitoras y células madre, incluyendo células madre adiposas humanas (hASC) y células endoteliales microvasculares (HAMEC).
- 20 22. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 5-21, en el que la rehidratación se realiza con uno o más tipos de moléculas bioactivas seleccionadas de un grupo que comprende factores de crecimiento, anticuerpos, antibióticos, antimicrobianos, antifúngicos, antimicóticos, factores antiinflamatorios, enzimas, elementos metálicos, hormona de crecimiento, citoquinas, interleuquinas, quimiocinas, factores angiogénicos, factores antiangiogénicos, anticoagulantes, agentes de contraste, agentes quimioterapéuticos, moléculas de la vía de señalización, receptores celulares y ligandos celulares.
- 25 23. Material de goma de gelano adhesivo celular descrito en las reivindicaciones 1-4 y obtenido por el método descrito en las reivindicaciones 5-22, para su uso en aplicaciones biomédicas, que incluye la administración de fármacos y la regeneración de tejidos e ingeniería y reparación de la piel y de tejidos conectivos.

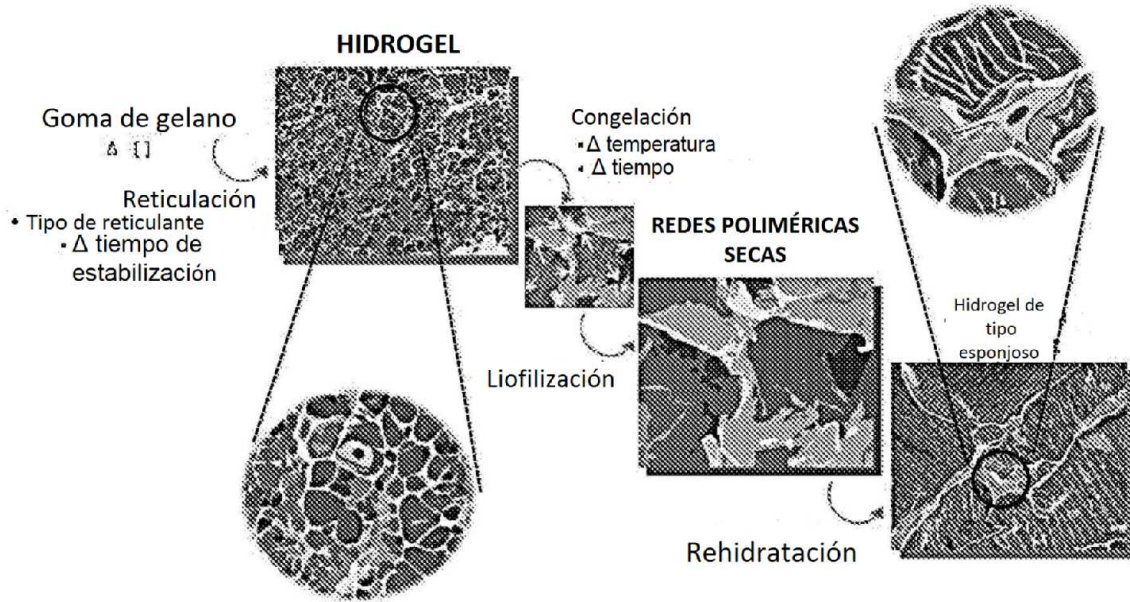


Figura 1

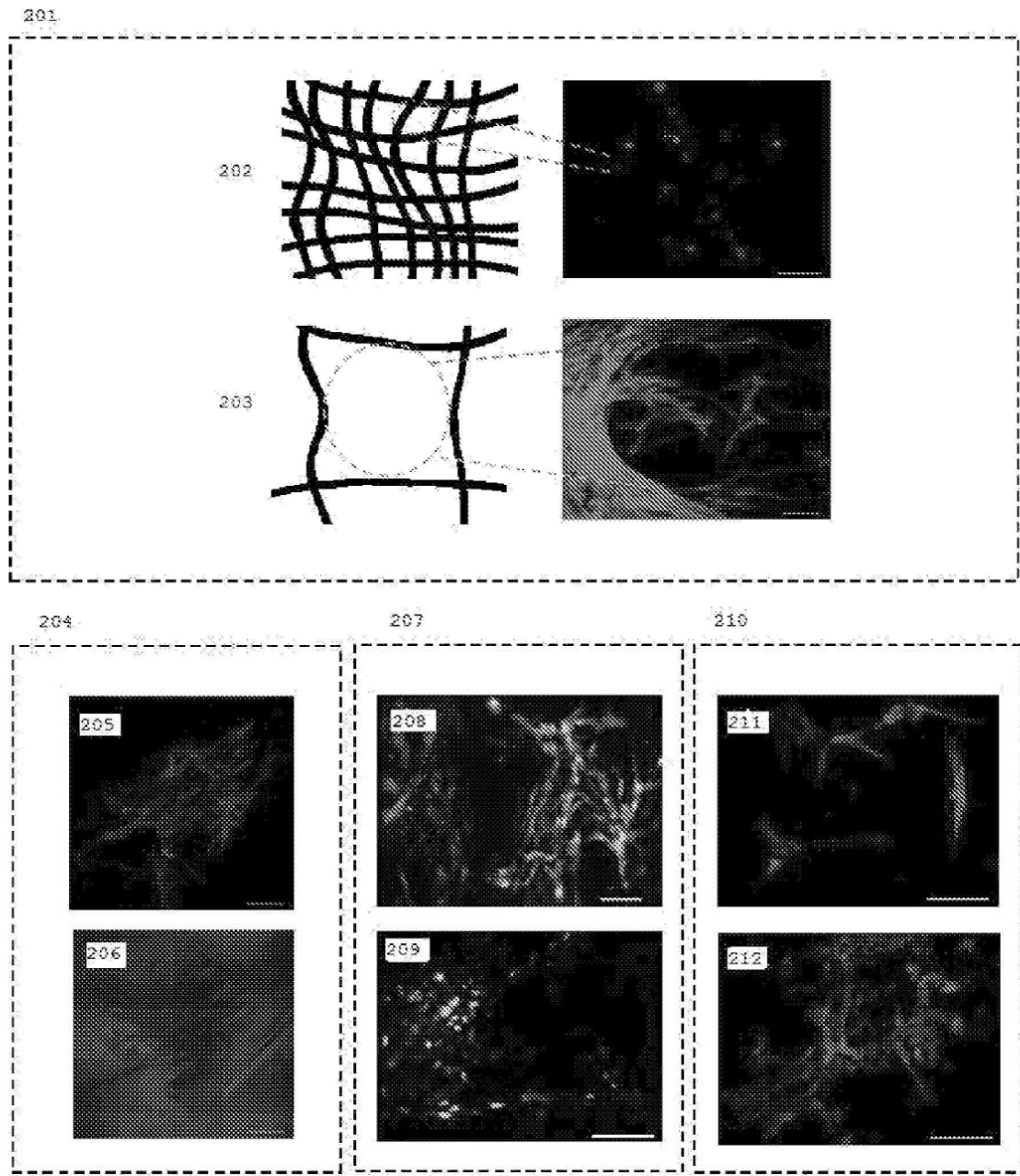


Figura 2

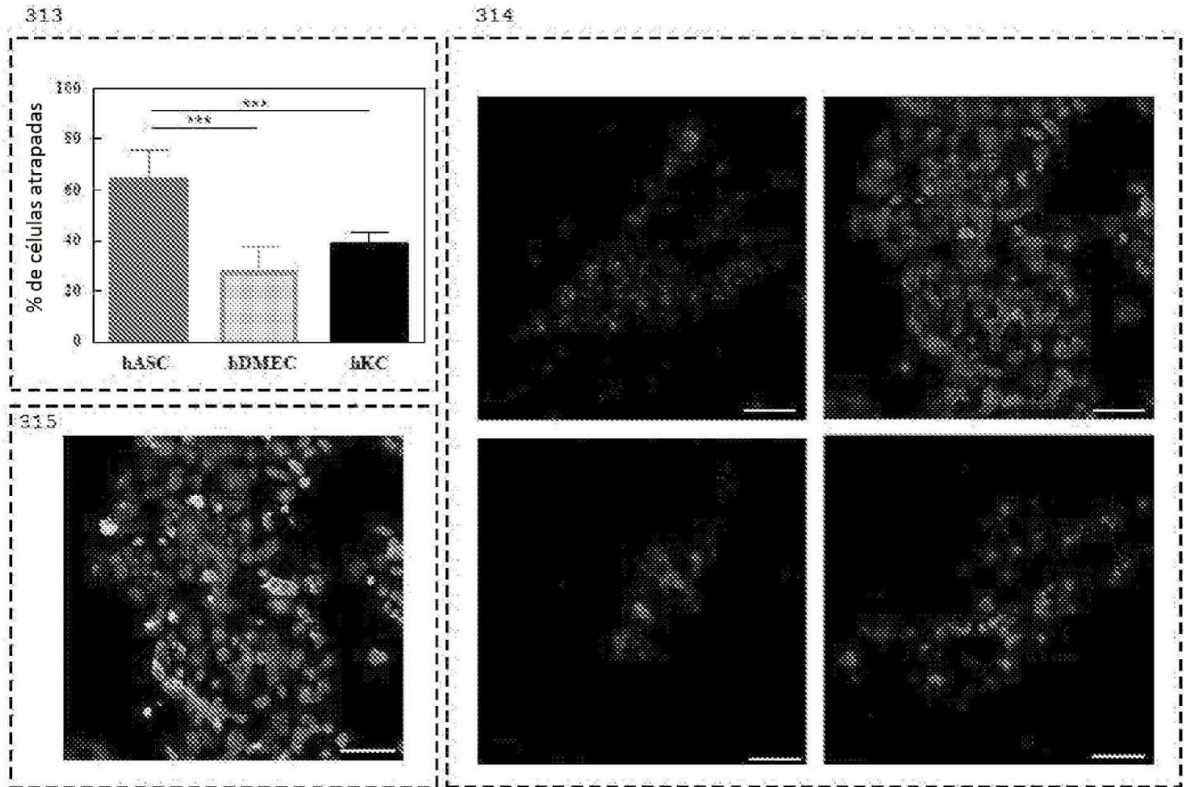


Figura 3

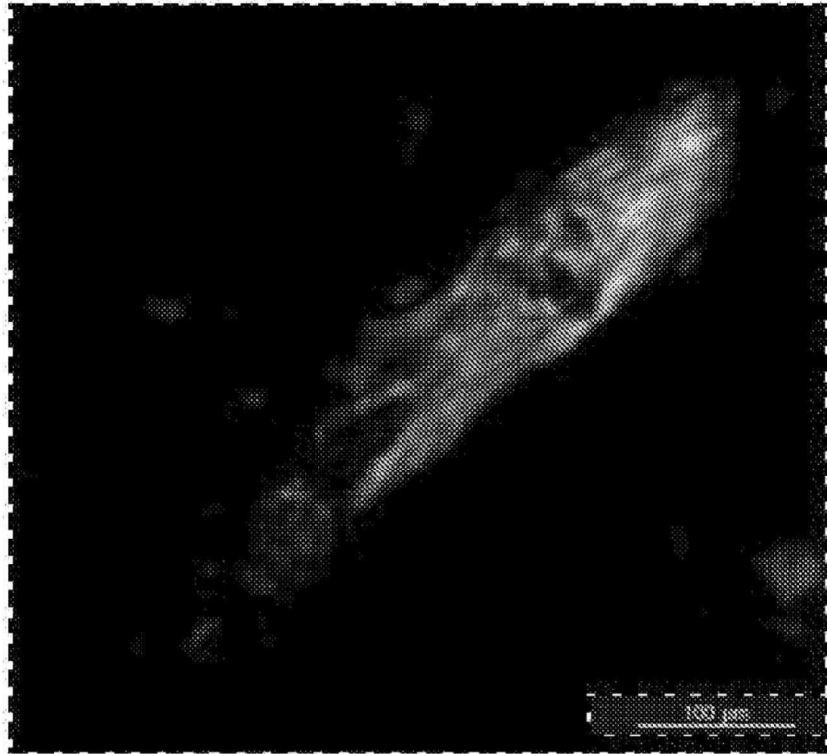


Figura 4

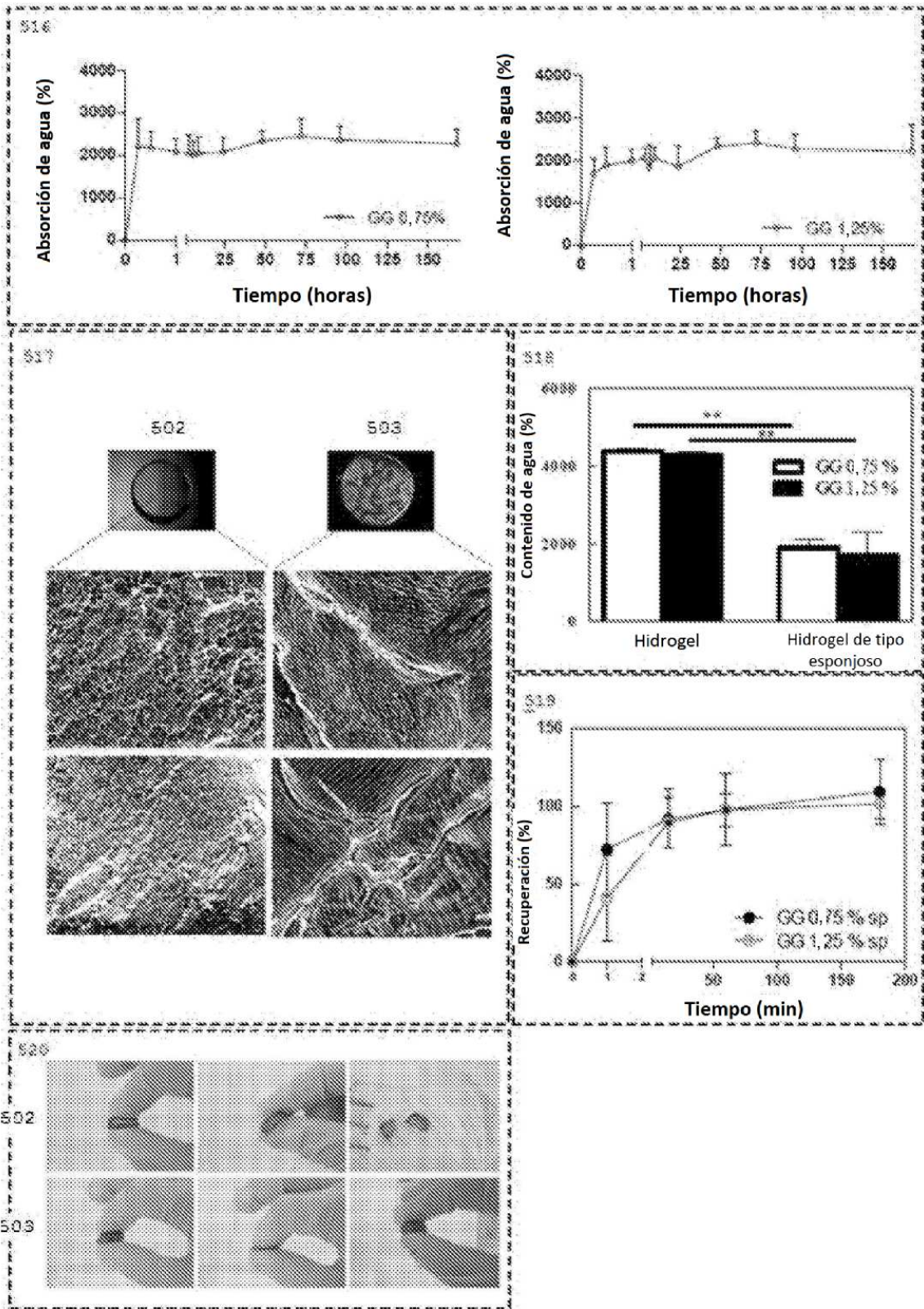


Figura 5

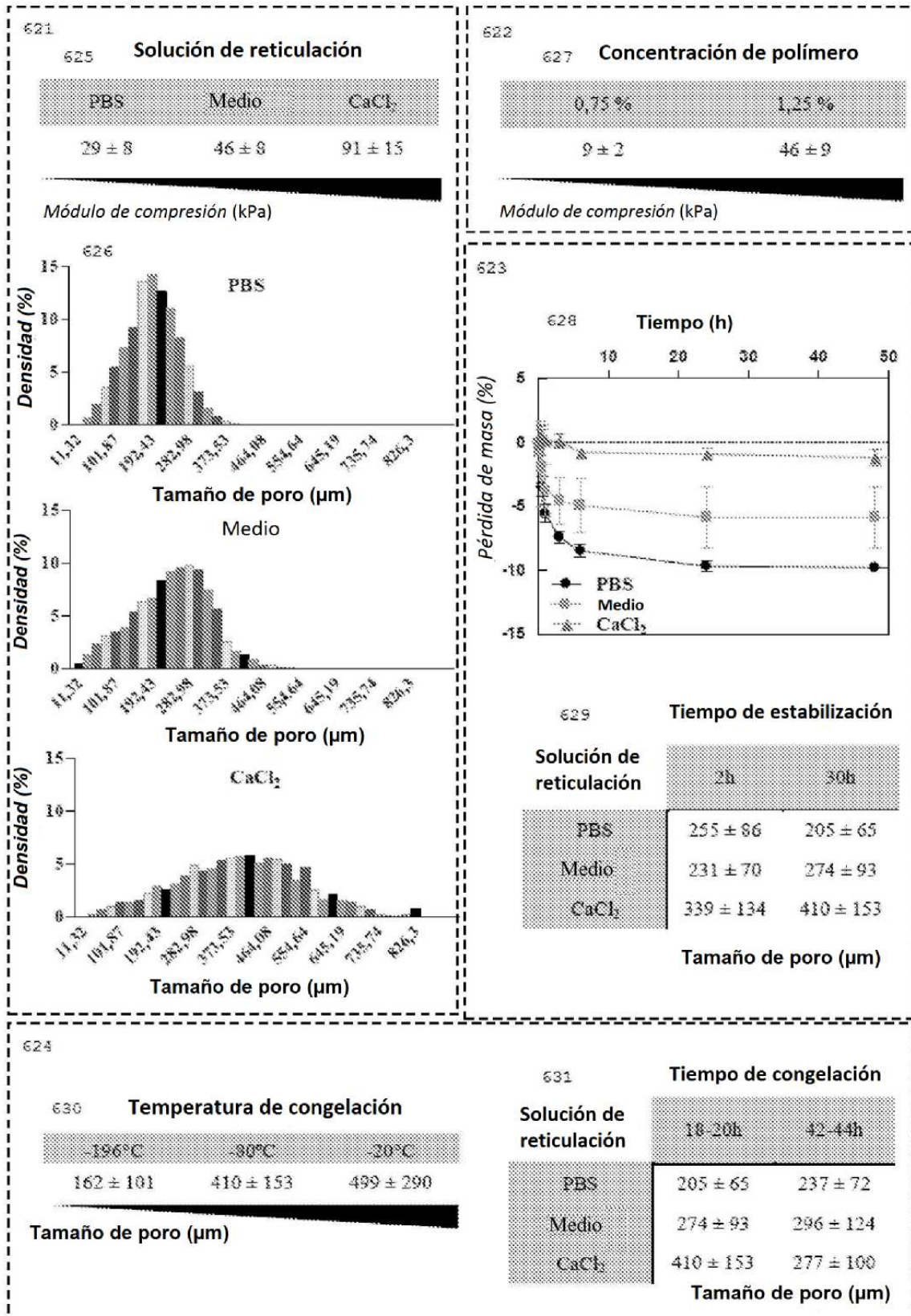


Figura 6

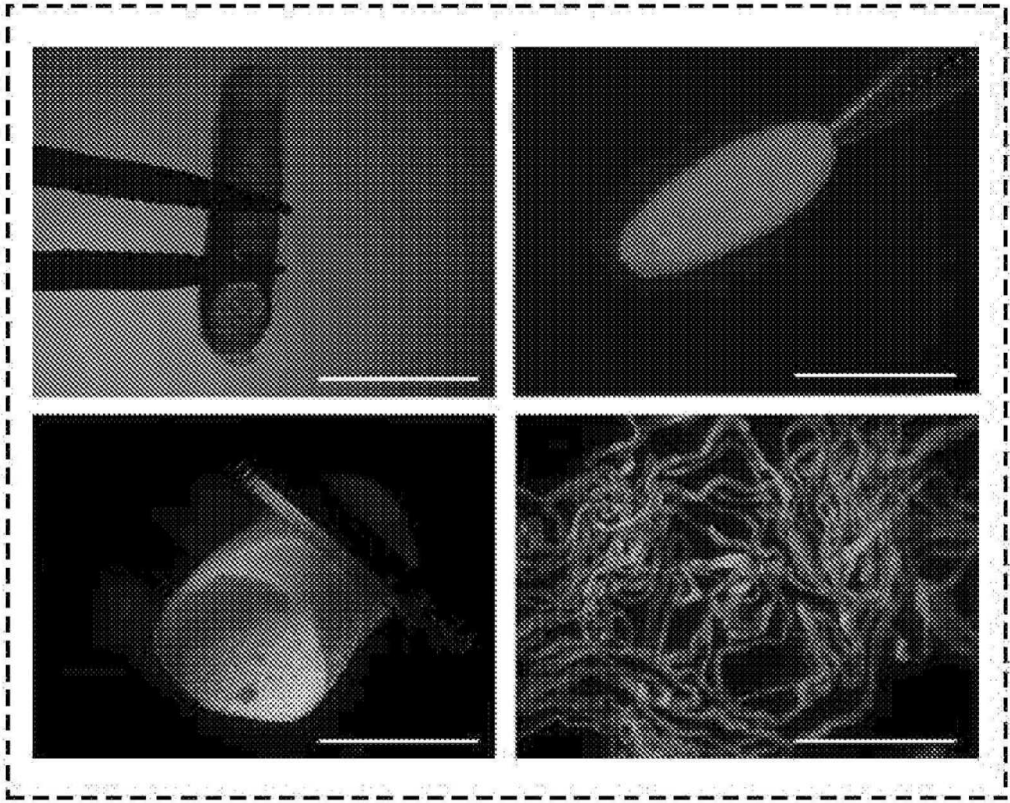


Figura 7

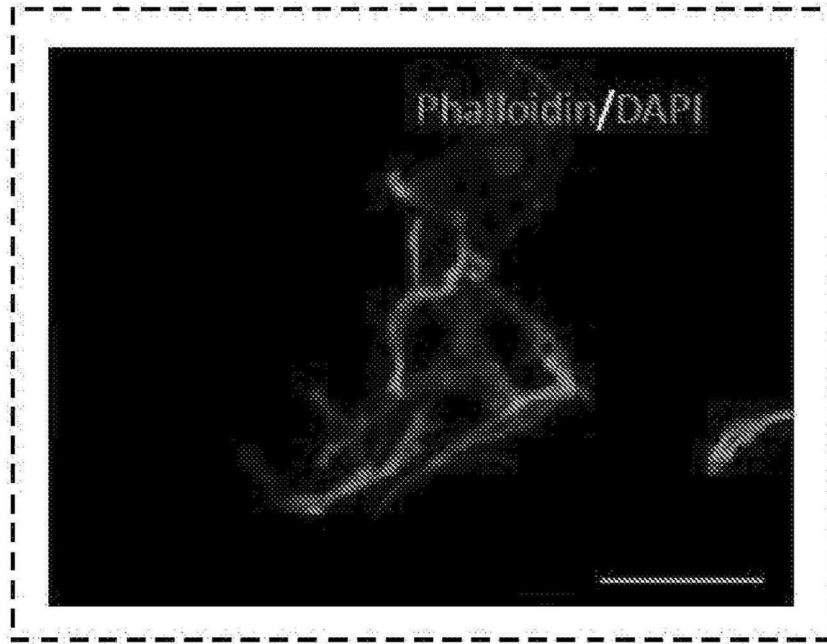


Figura 8

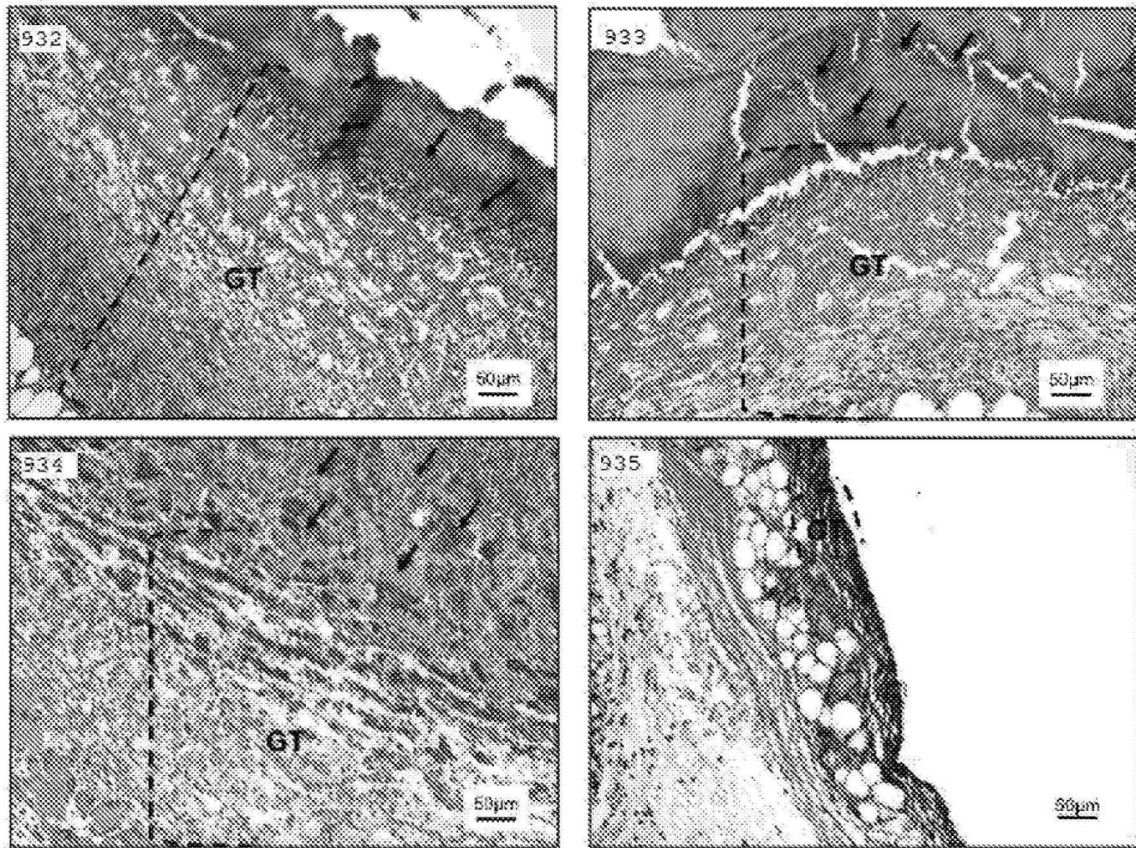


Figura 9

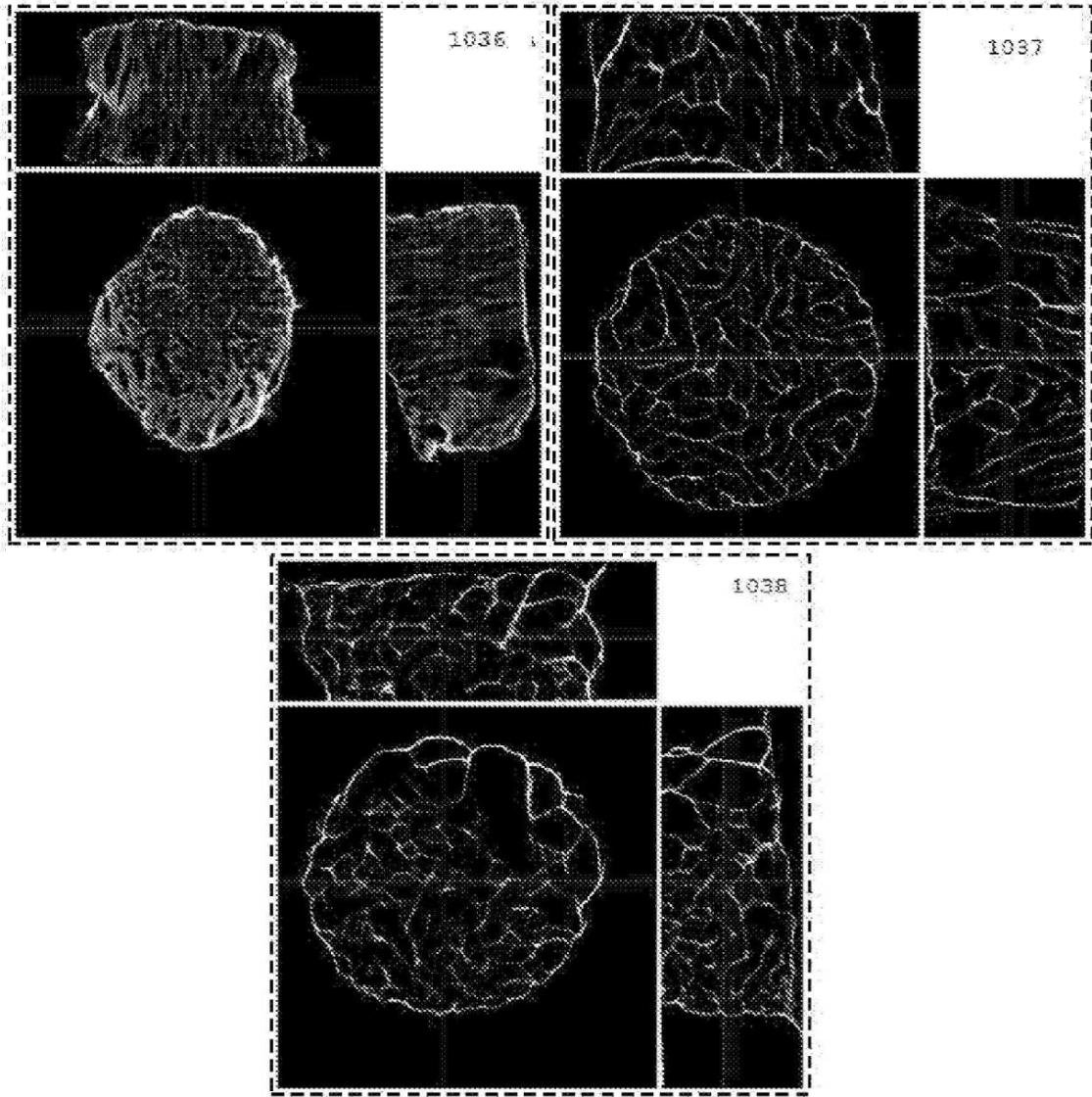


Figura 10