

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 489**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/18** (2006.01)

**A61L 27/56** (2006.01)

**A61L 27/58** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2013 PCT/IB2013/056218**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.01.2014 WO14016816**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2013 E 13783091 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2878314**

54 Título: **Malla polimérica con permeabilidad selectiva, para la reparación y la regeneración de tejidos**

30 Prioridad:

**27.07.2012 PT 10646412**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.03.2018**

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 MARTINS, ALBINO MANUEL;  
SOUSA DIAS ALVES DA SILVA, MARTA LUÍSA;  
GONÇALVES DOS REIS, RUI LUÍS y  
MELEIRO ALVES DAS NEVES, NUNO JOÃO**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 659 489 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

Malla polimérica con permeabilidad selectiva, para la reparación y la regeneración de tejidos

## 5 Campo técnico

La presente solicitud describe una malla semiporosa elástica y biocompatible con degradación lenta y permeabilidad selectiva, que puede usarse como una membrana o como un dispositivo biomédico implantable. Esta malla puede aplicarse sobre el defecto del tejido en combinación con procedimientos quirúrgicos de rutina tal como la técnica de microfractura, lo que promueve la reparación y la regeneración de tejidos tales como cartílago, piel, mucosa esofágica, y otros tejidos dañados por trauma o enfermedad, en humanos u otros animales.

## Estado de la técnica

15 El objetivo de la ingeniería de tejidos es diseñar nuevos componentes funcionales que puedan regenerar un tejido vivo, y restaurar su función totalmente. La ingeniería de tejidos incluye tres premisas básicas: el uso de una estructura o andamio polimérico tridimensional que soporte el crecimiento celular y la posterior formación de un tejido, una fuente de células y factores de crecimiento que inducen a estas células a diferenciarse en el tejido objetivo. Estos andamios pueden desarrollarse para diversos propósitos tales como la adhesión y la fijación de los tejidos, el mantenimiento de la forma como guías para la regeneración de tejidos, o como soporte temporal para el desarrollo de estos. Los materiales biodegradables se han usado ampliamente en la ingeniería de tejidos debido a su capacidad de degradarse y metabolizarse en el cuerpo, después de la reparación del tejido dañado. Por lo tanto, a medida que las células crecen y se organizan en un tejido vivo, el andamio se degrada lentamente, porque no se necesita más como estructura de soporte. Por lo tanto, el grado de degradación de un andamio es muy importante en el contexto de la ingeniería de tejidos.

30 Un andamio implantable debe resumir las características más esenciales de la matriz extracelular nativa del tejido a reparar, para promover las condiciones ideales para la regeneración de este. Por lo tanto, una característica muy importante del andamio es su porosidad. Son deseables altos niveles de porosidad para maximizar las oportunidades de colonización de células lo que permite un desarrollo más rápido de tejidos. Sin embargo, los altos niveles de porosidad implican una menor estabilidad mecánica del andamio. Por lo tanto, debe obtenerse un equilibrio óptimo entre estos requisitos contradictorios para cada aplicación específica. El tamaño de los poros es otro problema crítico en el rendimiento celular de los andamios porque estos deben tener poros que permitan la adhesión y proliferación celular y, al mismo tiempo, permitan el paso de nutrientes y moléculas presentes en el medio. Específicamente, si los poros son demasiado pequeños, pueden evitar la colonización interna de los andamios por las células. De hecho, esta es una limitación común de las mallas o membranas producidas mediante electrohilatura, que puede superarse mediante la aplicación de determinadas estrategias propuestas en la bibliografía.

40 La mayoría de los métodos de procesamiento no permiten especificar el tamaño, la forma o la distribución espacial de los poros. A menudo, estos métodos permiten un control estricto sobre las materias primas a usar y pueden permitir el establecimiento de rutinas estables de procesamiento, lo que da como resultado andamios con niveles de porosidad y propiedades macroscópicas similares. La mayoría de los métodos también pueden permitir la obtención de algún control sobre el nivel de interconectividad de los poros. Sin embargo, la posible distribución no uniforme de la interconectividad implica que algunas partes del andamio no puedan colonizarse por las células. Específicamente, los bajos niveles de interconectividad dificultan la difusión local de fluidos y la hidrólisis de biomateriales, lo que da como resultado cinéticas de degradación irregulares.

50 Los andamios pueden tener varias formas, una de estas es la malla o membrana. Actualmente, existen muchos tipos de membranas disponibles en el mercado para la regeneración de tejidos, que incluyen cartílago, esófago, ligamento periodontal o piel. La mayoría de estas membranas se fabrican de polímeros naturales y, en consecuencia, son biodegradables. Las mismas proporcionan una solución para la regeneración de algunos defectos de tejidos, pero todavía no se ha informado en la bibliografía una regeneración y recuperación completa de la función de esos tejidos.

55 La regeneración de los traumas o defectos del cartílago articular todavía es un desafío importante en el campo de la medicina ortopédica. Su naturaleza avascular provoca una muy baja capacidad innata para la autorreparación y la regeneración. Una amplia variedad de afecciones patológicas implica la pérdida de cartílago articular tal como la osteoartritis.

60 Las estrategias existentes para reparar o restaurar el cartílago articular incluyen la artroplastia articular total o parcial, el desbridamiento artroscópico, la microfractura y los enfoques de ingeniería de tejidos. La artroplastia articular, o el reemplazo total de la articulación, es una de las intervenciones más exitosas para las enfermedades relacionadas con cartílago tal como la osteoartritis, pero tiene varios inconvenientes, tal como el dolor a largo plazo. Además, la artroscopia de rodilla no altera la progresión de la osteoartritis y su uso conduce a varios dolores no deseados a largo plazo, provocados por la inestabilidad de la prótesis o el aflojamiento de sus componentes, o artrofibrosis. El desbridamiento y el lavado artroscópico permiten la eliminación del cartílago degenerativo mediante la irrigación de la articulación con una solución de lactato y sal. Este método conduce a un alivio temporal del dolor, pero no contribuye

5 significativamente a la formación de cartílago nuevo. La microfractura es un procedimiento artroscópico de una sola etapa, que implica un desbridamiento y una exposición del hueso subcondral, seguido de una perforación del hueso. Esto da como resultado el sangrado de la médula ósea y una formación de coágulos cuando la sangre y la médula ósea se infiltran en el cartílago dañado, lo que libera células madre para la reparación y la regeneración del tejido. Al igual que el desbridamiento artroscópico, el procedimiento de microfractura conduce a la formación de tejido de fibrocartílago que se degenerará con el tiempo, aunque puede proporcionar alivio temporal de los síntomas.

10 En la última década, los enfoques de ingeniería de tejidos (TE) han llegado a la clínica, mediante la combinación de células y andamios. El concepto general es que la estructura de andamio soportará el crecimiento y la diferenciación de células con la regeneración completa del tejido. En los últimos años, la TE de cartílagos se ha expandido al cartílago articular enfermo de OA. El primer enfoque para la TE de cartílagos se ha denominado trasplante de condrocitos autólogos (ACT), y se ha convertido en la terapia clínica predominante basada en células para la reparación de lesiones del cartílago durante la última década. En esta técnica, los condrocitos articulares expandidos se implantan debajo de un colgajo perióstico después del desbridamiento quirúrgico de la lesión. El ACT ha demostrado una excelente  
15 reparación a corto y medio plazo aunque la evaluación de la reparación a largo plazo continúa algo controvertida. La técnica ha sufrido algunas mejoras y el uso de andamios como soporte para el crecimiento de células: MACI - Implantación de Condrocitos Inducida por Matriz. La función de los andamios es soportar la colonización, el crecimiento y la diferenciación de células, lo que genera implantes médicos con células para la sustitución o la regeneración del tejido dañado. En la técnica MACI, pueden usarse otras fuentes de células autólogas además de los condrocitos. Esas  
20 fuentes incluyen las MSC, las células derivadas de periostio y los fibroblastos sinoviales. Un informe de un seguimiento de 5 años de la tecnología MACI mostró buenos resultados: 8 de 11 pacientes calificaron la función de sus rodillas tan buena o mejor que antes de la cirugía. Sin embargo, este enfoque implica dos intervenciones quirúrgicas, así como también varios inconvenientes relacionados con la movilidad y la calidad de vida del paciente.

25 El documento WO 2011/003422 A1 describe un andamio biodegradable para la regeneración de tejido suave. El andamio comprende una malla de PLGA que tiene poros con un tamaño en el intervalo de 30-200 micrómetros, una resistencia a la tracción superior a 1 MPa, un alargamiento a rotura en el intervalo de 20-1000 %, y se degrada en 4-36 meses.

30 El documento WO 2009/099570 A2 describe mallas de nanofibras de PCL/ colágeno obtenidas mediante electrohilatura para la regeneración de músculo esquelético.

35 El documento JP 2009 101062 A describe un ensamblaje de fibras que comprende fibras de quitosano que tienen un diámetro medio de fibra de 20 nm a 2 micrómetros, un tamaño medio de poro de 0.05-50 micrómetros y un grosor de la tela no tejida de 50-200 micrómetros.

40 NEVES S C Y OTROS: "Chitosan/Poly( $\epsilon$ -caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair", BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 32, núm. 4, 1 de febrero de 2011, páginas 1068-1079, ISSN: 01.42-9612, describe unas mallas fibrosas de mezcla de quitosano-PCL para la reparación de cartílagos, que tienen una porosidad de 64.3 %-83.2 %, con un tamaño medio de poro entre 265.3-384.7 micrómetros.

#### Breve descripción

45 La presente solicitud describe una malla implantable para la reparación y la regeneración de tejido humano u otro tejido animal como, por ejemplo, cartílago articular, esófago, ligamento periodontal, piel, entre otros, dañados por trauma o enfermedad. La malla semiporosa descrita en la presente invención es resistente a la ruptura, es elástica, biocompatible y de lenta degradación, puede combinarse con el procedimiento quirúrgico de microfractura y permite una rápida formación tejidos. Esta nueva malla permite el confinamiento en un determinado lugar de las células del tejido a reparar y regenerar, estas células retrasan el desarrollo y el tejido recién formado presenta características similares a las del  
50 preexistente.

El tejido a reparar con la malla polimérica para la regeneración de tejidos puede ser de cartílago, de ligamento periodontal, de submucosa esofágica o de piel.

55 En la regeneración de tejidos, específicamente en el cartílago articular de la rodilla, las células madre de médula ósea, expuestas al sitio de lesión mediante la técnica quirúrgica de microfractura, serán responsables de los procesos restauradores y regenerativos del cartílago articular dañado, mediante el confinamiento espacial conferido por la malla descrita en la presente invención en la forma de membrana o dispositivo biomédico descrito en la presente solicitud que es una malla semiporosa biocompatible elástica con lenta degradación.

60 La malla descrita en la presente solicitud es porosa, los poros tienen dimensiones más pequeñas que el tamaño de una célula de sangre humana o de otro animal y permite, al mismo tiempo, el paso selectivo de moléculas biológicamente activas, procedentes de la médula ósea, del fluido sinovial o de la membrana misma. El uso de la malla en la presente descripción también puede evitar, entre otros, la progresión de lesiones traumáticas o de otras formas iniciales de  
65 osteoartritis, que en otro caso conducirían a una osteoartritis grave, con dolor persistente y pérdida de la función articular, lo que conduce a la probable resección y sustitución articular.

La presente solicitud describe una malla polimérica para la reparación y la regeneración de tejidos de un organismo que comprende:

- 5 ● Poros, en donde al menos el 70 % de los poros de dicha malla tiene un tamaño menor que el necesario para confinar las células de dichos tejidos, y en donde al menos el 70 % de los poros de dicha malla tiene un tamaño superior que el necesario para el paso de fluidos intersticiales de dichos tejidos; donde preferentemente el 80 % de los poros de dicha malla tiene un tamaño más pequeño que el necesario para confinar las células de dichos tejidos, con la máxima preferencia 90 %, 95 % o 100 %;
- 10 ● el tiempo de degradación de dicha malla polimérica dentro del organismo es al menos 8 semanas, preferentemente el tiempo de degradación puede variar entre 8-26 semanas, y con mayor preferencia 8-15 semanas;
- 15 ● dicha malla polimérica tiene un módulo elástico aparente entre 0.1-100 MPa, preferentemente entre 5-30 MPa;
- y dicha malla polimérica tiene una resistencia a la tracción aparente superior a 1 MPa, preferentemente la resistencia a la tracción aparente se encuentra en intervalo entre 2-30 MPa, preferentemente entre 3-20 MPa.

20 La presencia de poros en la malla, cuyas dimensiones son inferiores al tamaño de una célula humana u otra célula animal, permite el paso bidireccional de moléculas biológicamente activas, por ejemplo, las de la médula ósea, del fluido sinovial o de otro fluido intersticial. Esta malla permite que el "nuevo tejido" formado presente propiedades muy similares a las del tejido dañado.

25 Las sinergias de estas características de la malla permiten que el tejido recién formado presente características muy similares a las del tejido preexistente.

30 En una modalidad de la malla polimérica descrita para la reparación y la regeneración de tejidos, las células madre de médula ósea expuestas al sitio de lesión mediante la técnica quirúrgica de microfractura, se confinarán en el defecto del cartílago mediante la fijación del dispositivo biomédico, que consiste en una malla semiporosa biocompatible elástica con una tasa de degradación lenta, a la superficie del cartílago normal de alrededor. La presencia de poros en esa malla, cuyas dimensiones deben ser inferiores al tamaño de una célula humana u otra célula animal, permitirá el paso bidireccional de moléculas biológicamente activas desde la médula ósea, el fluido sinovial o incluso desde la malla misma. Además, el dispositivo biomédico implantable podría funcionar como un sistema de suministro local de moléculas biológicamente activas, lo que controla los procesos inflamatorios o regenerativos, y/o la homeostasis del cartílago.

35 En otra modalidad la malla polimérica descrita para la regeneración de tejidos ha mejorado los resultados con las siguientes características:

- 40 ● una porosidad media en el intervalo entre 83-91 %, que puede determinarse mediante varios métodos comúnmente conocidos, por ejemplo, mediante el método gravimétrico;
- 45 ● el 80-90 % de los poros tiene un tamaño en el intervalo entre 1.2-13.37  $\mu\text{m}$ , que puede determinarse mediante varios métodos comúnmente conocidos, por ejemplo, mediante el modelo matemático desarrollado por Tomadakis y Robertson (Chemical Physics 2003, volumen 119);
- 50 ● un módulo elástico aparente en el intervalo entre 8.58-27.87 MPa; y una resistencia a la tracción aparente en el intervalo entre 2.15-4.38 MPa, que puede determinarse mediante varios métodos comúnmente conocidos, por ejemplo, en pruebas de tracción, mediante el uso, por ejemplo, de una celda con una carga de 1 kN y una temperatura de 25 °C.

55 Estas propiedades mecánicas permiten que la malla para la regeneración de tejidos presente mejores resultados en la permeación de los líquidos que rodean el tejido a reparar, en la resistencia a las fuerzas ejercidas y en el confinamiento de las células "regenerativas" en el sitio de lesión, lo que conduce a la formación de un tejido con características similares a las del preexistente. Estas características son relevantes, por ejemplo, en su aplicación clínica para la regeneración del cartílago articular, porque se pretende que esta malla separe los dos compartimentos de la rodilla. Esta separará las células de médula ósea del fluido sinovial, lo que permitirá la diferenciación condrogénica de las células madre de médula ósea.

60 En una modalidad la malla polimérica mencionada para la regeneración de tejido descrita puede comprender un polímero seleccionado de la siguiente lista de policaprolactona, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, quitosano, alginato, dextrano o sus combinaciones, estos polímeros pueden mejorar la reparación y la regeneración de tejidos. El uso de estos polímeros permite el soporte de las células durante un mayor período de tiempo, para permitirles formar una matriz extracelular más densa, lo que brinda una mayor oportunidad para la formación de tejido deseado, por ejemplo, para la formación de neocartílago, y por lo tanto, para la reparación del defecto.

65

- 5 En otra modalidad la malla polimérica mencionada para la regeneración de tejidos descrita puede comprender un polímero natural, particularmente un polímero seleccionado de almidón, ácido hialurónico, sulfato de condroitina o sus combinaciones, esta combinación actúa sinérgicamente en la reparación de tejidos, lo que permite una mayor proliferación celular. En particular, la combinación entre los siguientes polímeros: policaprolactona, o policaprolactona y almidón, o policaprolactona y ácido hialurónico, o policaprolactona y sulfato de condroitina, o ácido poliglicólico, o ácido poliláctico, o sus combinaciones, entre otros.
- 10 En otra modalidad preferencial la malla polimérica descrita para la reparación y la regeneración de tejidos puede comprender 60-80 % (p/v) de policaprolactona y 20-40 % (p/v) de un polímero natural, o cualquier otra proporción como, por ejemplo, 70 % (p/v) de policaprolactona y 30 % (p/v) de un polímero natural, en la que el peso la policaprolactona puede encontrarse en el intervalo entre 70000 - 90000 Da.
- 15 En otra modalidad preferencial la malla polimérica descrita para la reparación y la regeneración de tejidos puede comprender, cuando el grado de desacetilación de quitosano se encuentra preferentemente en el intervalo entre 50-100 %, preferentemente entre 87.7-95 %.
- 20 Esta malla permite confinar las células en el área dañada del tejido a reparar, y es permeable a los factores de crecimiento que mejoran la comunicación celular, sin permitir que las células "escapen" del área deseada lo que permite la regeneración eficaz de tejidos, similar a una parte no lesionada del tejido.
- 25 Estas propiedades mecánicas permiten que la malla para la regeneración de tejidos presente mejores resultados en la permeación de los líquidos que rodean el tejido a reparar, en la resistencia a las fuerzas ejercidas y en el confinamiento de las células "regenerativas" en el sitio de lesión, lo que conduce a la formación de un tejido con características similares a las del preexistente. Estas características son relevantes, por ejemplo, en su aplicación clínica para la regeneración del cartílago articular, porque se pretende que esta malla separe los dos compartimentos de la rodilla. Esta separará las células de médula ósea del fluido sinovial, lo que permitirá la diferenciación condrogénica de las células madre de médula ósea.
- 30 En otra modalidad la malla polimérica descrita para la regeneración de tejidos puede comprender además sustancias activas seleccionadas de la siguiente lista: fármacos antiinflamatorios, antibióticos, agentes biológicos, fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedades biológicas, inhibidores, factores de crecimiento. La incorporación de sustancias activas puede realizarse mediante la mezcla con el(los) polímero(s) usado(s) para producir la malla, mediante confinamiento físico, o mediante el recubrimiento y/ o la adsorción en la superficie la malla.
- 35 La malla mencionada también puede actuar como un sistema de suministro local de moléculas biológicamente activas, lo que controla los procesos inflamatorios o regenerativos, y/o la homeostasis del cartílago. En otra modalidad la malla polimérica descrita para la regeneración de tejidos puede comprender además sustancias activas implicadas en la homeostasis y en el proceso de regeneración de tejidos, en particular de cartílago como, por ejemplo, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, EGF, HIF, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D, IGF-1, FGF-2, FGF-18, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7/OP-1, CDMP-1/GDF-5, CDMP-2 o equivalentes.
- 40 La malla polimérica para la regeneración de tejidos descrita puede presentar un grosor en el intervalo entre 20-200  $\mu$ m, preferentemente 40-80  $\mu$ m, y preferentemente 60  $\mu$ m.
- 45 La presente solicitud también describe el uso de la malla polimérica para la regeneración de tejidos en la medicina humana y veterinaria, específicamente en el tratamiento de enfermedades que implican la regeneración de tejidos.
- 50 La malla polimérica para la regeneración de tejidos descrita anteriormente puede aplicarse en humanos o animales, mediante la fijación en el tejido normal que rodea el área dañada mediante el uso preferencial de un conector, tal como un pegamento sellante o equivalente, o mediante una cirugía invasiva mínima normal, o mediante cirugía abierta.
- 55 La malla polimérica para la regeneración de tejidos descrita anteriormente puede aplicarse en la regeneración de piel, cartílago, ligamento periodontal, o submucosa esofágica.
- 60 La malla polimérica descrita puede obtenerse mediante la técnica de electrohilatura, aunque pueden usarse otras técnicas de procesamiento, siempre que las mallas poliméricas obtenidas obedezcan los requisitos anteriormente establecidos. Por lo tanto, la malla anteriormente descrita puede ser tejida o no tejida.
- 65 En otra modalidad preferencial la tira, red, paquete de fibras, malla o membrana obtenida mediante electrohilatura comprende un conjunto de fibras cuya composición polimérica puede seleccionarse de la siguiente lista de policaprolactona, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, quitosano, alginato o dextrano, o combinaciones de estos, con un diámetro inferior a 2  $\mu$ m.
- En otra modalidad la tira, red, paquete de fibras, malla o membrana descritos puede contener una fibra polimérica obtenida mediante electrohilatura con un diámetro entre 0.35-2  $\mu$ m.

En otra modalidad el peso molecular de la policaprolactona de la fibra polimérica de la tira, red, paquete de fibras, malla o membrana puede encontrarse en el intervalo entre 70000-90000 Da.

Las fibras y mallas descritas anteriormente pueden obtenerse mediante electrohilatura, particularmente cuando el polímero se selecciona de la siguiente lista de policaprolactona, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, quitosano, alginato o dextrano, o sus combinaciones, con un diámetro inferior a 2 µm, pueden realizarse las siguientes etapas:

- Preparación de una solución del polímero seleccionado con una mezcla apropiada de disolventes; por ejemplo, mediante la mezcla de una solución de policaprolactona al 13-17 % (p/v), con una mezcla de los disolventes cloroformo: dimetilformamida en la relación de 1:1-7:3
- Expulsión de la solución resultante de la etapa anterior con un régimen de flujo en el intervalo entre 0.9-1 ml/h; la tensión aplicada puede variar entre 9-12 kV; a una temperatura que puede encontrarse en el intervalo entre 19-22,5 °C; una humedad relativa que puede encontrarse en el intervalo entre 32-43 %.

Descripción detallada

La presente solicitud describe una malla biodegradable semiporosa polimérica, que puede usarse simultáneamente con la forma preferida de modalidad de un método quirúrgico presentado, lo que permite obtener mejores resultados para el paciente.

En otra modalidad la malla polimérica para la reparación y la regeneración de tejidos puede usarse junto con un procedimiento quirúrgico, particularmente la microfractura. Este método se ha empleado en la clínica para la reparación de tejidos, específicamente el cartílago articular dañado, mediante el uso de la capacidad de autorregeneración de los organismos. Para producir una ruta viable para los elementos medulares, debe prepararse adecuadamente el lecho óseo. El hueso subcondral debe exponerse completamente y la base del defecto desbridarse de cualquier tejido suave, particularmente cualquier tejido fibroso restante. La capa de cartílago calcificado debe eliminarse de la superficie del hueso subcondral con una rasuradora o cureta artroscópica para mejorar la reparación y la regeneración del defecto. La placa subcondral debe permanecer lo más conservada posible. En segundo lugar, se necesita que el cartílago articular intacto soporte el límite del defecto. El perímetro del defecto debe ser idealmente perpendicular a la placa subcondral.

Después de la preparación descrita, la microfractura de la placa subcondral se realiza con punzones afilados y suaves golpecitos con mazo. Las perforaciones proporcionan canales para que los elementos medulares migren dentro del defecto. Estas perforaciones deben hacerse perpendiculares al hueso subcondral, por lo tanto se aconseja el uso de punzones en lugar de barrenas. Además, la perforación con barrenas también puede provocar necrosis térmica del hueso subcondral.

La microfractura se realiza en primer lugar en la periferia del defecto con los orificios que penetran aproximadamente de 3 a 4 mm en el hueso subcondral. Los orificios en la periferia pueden proporcionar un anclaje óptimo del fibrocartílago de curación en la zona de transición entre el cartílago articular normal. Las perforaciones después se distribuyen uniformemente a lo largo del defecto con puentes de 3 a 4 mm de hueso subcondral entre estas. Si los orificios se colocan muy juntos, las fracturas pueden fusionarse y propagarse en el hueso subcondral. Se libera el torniquete y se reduce la presión de entrada para confirmar la visualización de gotas de sangre o grasa o ambas desde todos los orificios de la microfractura. Si este no es el caso, la microfractura puede repetirse para asegurar la extrusión de la médula.

La microfractura libera sangre y médula ósea a partir de la cavidad medular que cruza la placa de hueso subcondral. En una primera etapa, se forma un coágulo de sangre en los sitios de microfractura. Las células madre y los factores de crecimiento de la médula ósea transforman este coágulo en un tejido cicatricial llamado fibrocartílago.

La falta de confinamiento del coágulo de sangre en el sitio de lesión del cartílago induce su liberación en el fluido sinovial, lo que disminuye la eficiencia tratamiento. Además, este coágulo de sangre es extremadamente frágil y tiene que protegerse de los esfuerzos mecánicos fisiológicos. Este problema se resuelve mediante la aplicación de una malla polimérica semiporosa que permite la reparación y la regeneración del tejido, esta malla podría usarse como dispositivo médico/ membrana biodegradable.

La malla polimérica para la reparación y la regeneración de tejidos de un organismo que comprende:

- Poros, en donde al menos el 70 % de los poros de dicha malla tiene un tamaño menor que el necesario para confinar las células de dichos tejidos, y en donde al menos el 70 % de los poros de dicha malla tiene un tamaño superior que el necesario para el paso de fluidos intersticiales de dichos tejidos; preferentemente, el 80 % de los poros de dicha malla tiene un tamaño menor que el necesario para confinar las células de dichos tejidos, con la máxima preferencia el 90 %, 95 % o 100 % de los poros; el tamaño de los poros puede determinarse mediante varios métodos comúnmente conocidos, por ejemplo, mediante el modelo matemático desarrollado por Tomadakis y Robertson (Chemical Physics 2003, volumen 119);

• donde el tiempo de degradación de dicha malla polimérica dentro del organismo es al menos 8 semanas, preferentemente el tiempo de degradación puede variar entre 8-26 semanas, y preferentemente 8-15 semanas;

5 • la malla polimérica tiene un módulo de elasticidad aparente en el intervalo entre 0.1 - 100 MPa, preferentemente entre 5-30 MPa, que puede determinarse mediante varios métodos comúnmente conocidos, por ejemplo, en pruebas de tracción, mediante el uso de, por ejemplo, una celda con una carga de 1 kN y una temperatura de 25 °C;

10 • y la malla polimérica mencionada y dicha malla polimérica tienen una resistencia a la tracción aparente superior a 1 MPa, preferentemente la resistencia a la tracción aparente se encuentra en el intervalo entre 2-30 MPa, preferentemente entre 3-20, que puede determinarse mediante varios métodos comúnmente conocidos, por ejemplo, en pruebas de tracción, mediante el uso de, por ejemplo, una celda con una carga de 1 kN y una temperatura de 25 °C.

15 En este sentido, la malla polimérica para la reparación y la regeneración de tejidos descrita en esta solicitud tiene una tasa de degradación lenta, y es semiporosa, lo que permite la circulación selectiva de moléculas biológicamente activas entre el coágulo de sangre que se confina en el volumen de lesión del cartílago y la cavidad sinovial, o viceversa. Esto puede explicarse por la dimensión de los poros que debe ser suficientemente inferior a la dimensión mínima de las células humanas o células de otros animales, que actúa como una barrera para el paso de sangre y médula ósea procedente de las microfracturas inducidas, por el polímero que tiene un tiempo de degradación in vivo mayor que 8 semanas, por la malla polimérica que tiene también suficiente estabilidad mecánica para resistir la ruptura (para resistir, por ejemplo, la manipulación quirúrgica, durante los procesos de implantación y fijación), así como también que tiene la suficiente elasticidad para soportar los esfuerzos fisiológicos mecánicos existentes en el sitio de lesión (por ejemplo, en la articulación). Las sinergias de estas características de la malla permiten que el tejido recién formado presente características muy similares a las del tejido preexistente.

25 En otra modalidad la malla polimérica descrita para la regeneración de tejidos ha mejorado los resultados con las siguientes características

30 • una porosidad media en el intervalo entre el 83-91 %, que puede determinarse mediante varios métodos comúnmente conocidos, por ejemplo, mediante el método gravimétrico;

• el 80-90 % de los poros tiene un tamaño en el intervalo entre 1.2-13.37  $\mu\text{m}$ , que puede determinarse mediante varios métodos comúnmente conocidos, por ejemplo, mediante el modelo matemático desarrollado por Tomadakis y Robertson (Chemical Physics 2003, volumen 119);

35 • un módulo de elasticidad aparente en el intervalo entre 8.58-27.87 MPa; y una resistencia a la tracción aparente en el intervalo entre 2.15-4.38 MPa, que puede determinarse mediante varios métodos comúnmente conocidos, por ejemplo, en pruebas de tracción, mediante el uso de, por ejemplo, una celda con una carga de 1 kN y una temperatura de 25 °C.

40 El dispositivo biomédico implantable en la forma de malla biocompatible de degradación lenta debe presentar suficiente estabilidad mecánica para resistir su manipulación quirúrgica, durante los procesos de implantación y fijación, así como también la suficiente elasticidad para soportar los esfuerzos mecánicos fisiológicos que existen en la articulación.

45 En otra modalidad, para obtener un proceso de conversión mejorado del tejido a regenerar, por ejemplo, como la conversión de un coágulo de sangre en fibrocartilago; la malla polimérica para la regeneración debe tener una tasa de degradación lenta in vivo de al menos 8 semanas, y los mejores resultados se obtuvieron con los polímeros seleccionados de la siguiente lista:

50 • Polímeros sintéticos tales como, por ejemplo, policaprolactona (PCL), ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA) y sus copolímeros;

• Polímeros naturales tales como, por ejemplo, quitosano, alginato, dextrano;

• Combinaciones de polímeros de origen sintético con polímeros de origen natural,

55 cuya degradación se extiende hasta el límite mínimo necesario para la formación de tejido fibrocartilaginoso.

Se podrían añadir también otros polímeros tal como un polímero seleccionado entre almidón, ácido hialurónico, o sulfato de condroitina, o sus combinaciones.

60 La malla polimérica descrita puede obtenerse mediante la técnica de electrohilatura, aunque pueden usarse otras técnicas de procesamiento de materiales, siempre que las mallas poliméricas obtenidas obedezcan los requisitos establecidos anteriormente.

65 La presente malla biocompatible semiporosa polimérica y de degradación lenta puede incorporar también moléculas biológicamente activas. Esta incorporación puede realizarse mediante la mezcla con los biomateriales usados para producir la malla, mediante confinamiento físico, o mediante recubrimiento y/ o adsorción a la superficie de la malla.

Como las moléculas biológicamente activas se refieren a fármacos antiinflamatorios, específicamente a fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) (es decir, ácido acetilsalicílico, paracetamol, trisalicilato de colina y magnesio, diclofenaco, diflunisal, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, cetoprofeno, meclofenamato, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, fenilbutazona, piroxicam, salsalato, sulindac, tolmetina) e inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (tal como celecoxib), corticosteroides o glucocorticoides, los fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedades (DMARD) (es decir, metotrexato, sulfasalazina, leflunomida, ciclosporina, minociclina, hidroxicloroquina, azatioprina, D-penicilamina y sales de oro), y los agentes biológicos modificadores de enfermedades, tal como el inhibidor de necrosis tumoral  $\alpha$  (tal como el etanercept, infliximab, adalimumab, certolizumab, golimumab), los inhibidores de citocinas tales como interleucina-1 $\alpha$  y -1 $\beta$  (por ejemplo, anakinra) y -6 (por ejemplo, tocilizumab), los inhibidores de coestimulación de células T (por ejemplo, el abatacept) y anticuerpos contra células B (por ejemplo, rituximab). También pueden incorporarse moléculas biológicamente activas implicadas en la homeostasis y en el proceso de regeneración de tejidos, en particular el factor de crecimiento transformante - $\alpha$ , - $\beta$ 1, - $\beta$ 2 y - $\beta$ 3 (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3), los factores de crecimiento derivados de plaquetas -AA, -AB, -BB, -CC y -DD (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC y PDGF-DD), factor de crecimiento de insulina-1 (IGF-1), el factor de crecimiento endotelial vascular -A, -B, -C y -D (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D), el factor de inducción por hipoxia (HIF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento fibroblástico -2 y -18 (FGF-2 y FGF-18), las proteínas morfogénicas óseas -2, -4, -6 y -7/proteína osteogénica-1 (BMP-2, BMP-4, BMP-6 y BMP-7/OP-1), proteínas morfogénicas derivadas de cartílago-1/factor de crecimiento y diferenciación -5 y -2 (CDMP-1/ GDF-5 y CDMP-2). La liberación de esas moléculas a partir de la malla inducirá efectos biológicos sobre el coágulo de sangre confinado en el volumen del defecto del cartílago y sobre la cavidad sinovial.

La fijación de este dispositivo biomédico implantable/ malla polimérica para la reparación y la regeneración de tejidos debe realizarse, preferentemente, mediante el uso de un conector, específicamente pegamento o sellador. Sin embargo, pueden usarse otros métodos quirúrgicos de fijación de membranas, específicamente el uso de suturas reabsorbibles, grapas o alfileres.

Todos los procedimientos quirúrgicos descritos anteriormente, incluidas la técnica quirúrgica de microfractura, la implantación del dispositivo biomédico en forma de membrana y su fijación en el área del cartílago que rodea el defecto pueden realizarse mediante el método quirúrgico estándar mínimamente invasivo denominado artroscopia o mediante cirugía abierta.

El control postoperatorio de los procesos de reparación y regeneración de cartílago articular humano o de otro animal, cuando se usa el dispositivo descrito en esta invención, puede realizarse mediante examen artroscópico, imagenología por rayos X, resonancia magnética nuclear y tomografía computarizada, análisis bioquímico del fluido sinovial o sangre.

Método para calcular las propiedades mecánicas de la malla - módulo elástico y resistencia a la tracción

Las propiedades mecánicas de la malla, tales como el módulo elástico aparente, la resistencia a la tracción aparente y la deformación a rotura, pueden determinarse mediante métodos comúnmente conocidos tal como la prueba de tracción.

Para determinar el módulo elástico aparente, la resistencia a la tracción aparente y la deformación a rotura de la malla, se desarrollaron las siguientes etapas:

- se usaron seis muestras rectangulares (30 x 6 mm) de cada malla y se fijaron individualmente en un marco de papel (30 mm x 25 mm) con una ventana de trabajo cuadrada de 15 mm.

- las determinaciones se realizaron en una máquina universal de prueba de tracción [Serie 5543, INSTRON] equipada con una celda de carga de 1 kN y se definió una velocidad de cruceta de 5 mm/min. Cada marco de papel que contenía una muestra de malla se sujetó inicialmente con agarres de acción de cuña y se cerró manualmente con tornillos estriados. Los lados laterales de ese marco de papel se cortaron y se inició la prueba de tracción.

- todas las pruebas se realizaron bajo condiciones ambientales controladas, específicamente a una temperatura ambiente de 25 °C. Se definió que la prueba terminaría cuando se lograra la fractura de la muestra. Los datos de prueba se recolectaron mediante el programa informático Bluehill 2, que informa sobre las dimensiones aparentes de cada espécimen antes de ejecutar la prueba. El módulo elástico aparente se definió como la pendiente de la línea entre los puntos correspondientes al 1 % y al 2 % de la deformación de las curvas de tensión-deformación determinadas automáticamente. La resistencia a la tracción aparente se definió como la tensión máxima de tracción soportada por el material durante la prueba de tracción. La deformación a rotura se refiere al alargamiento máximo observado a la rotura del material.

Método para calcular la porosidad - Gravimetría

La porosidad ( $\epsilon$ ) se determinó mediante gravimetría para tres muestras de cada malla de fibra, mediante la aplicación de la fórmula:

$$\epsilon = 1 - \frac{\rho_{APP}}{\rho_{PCL}}$$

5 La densidad de PCL ( $\rho_{PCL}$ ) tiene el valor de 1.145 g/mL a 25 °C, de acuerdo con la hoja de datos de la materia prima. La densidad de muestra aparente ( $\rho_{APP}$ ) se midió como la relación de masa a volumen:

$$\rho_{APP} = \frac{\text{masa del andamio}}{\text{grosor del andamio} \cdot \text{área disc.}}$$

10

15 Las muestras se prepararon mediante el uso de un perforador con un diámetro interno de 20 mm. Todas las pruebas se realizaron bajo condiciones ambientales controladas, específicamente a una temperatura ambiente de 25 °C. La masa de cada muestra se determinó con una balanza de precisión [TP-214, Denver Instruments], mediante la media aritmética de tres pesadas por separado. El grosor de cada muestra se determinó mediante un microcalibrador [IP65, Mitutoyo] con una punta plana (06 mm) y una precisión de  $\pm 1 \mu\text{m}$ , mediante la media aritmética de seis mediciones en posiciones aleatorias de la muestra.

20

Método para calcular el tamaño estimado de los poros, el diámetro y la porosidad de las fibras

El tamaño medio de los poros se calculó en base a la relación entre el tamaño característico de los poros ( $d_{3D}$ ), el diámetro ( $\omega$ ) y la porosidad ( $\epsilon$ ) de las fibras, como se muestra en la ecuación más abajo, desarrollada por Tomadakis y Robertson (Chemical Physics 2003, volumen 119).

25

$$d_{3D} = -\frac{\omega}{\ln(\epsilon)}$$

30

Este modelo se derivó de una estructura fibrosa aleatoria generada por computadora en la que se ajustó una esfera característica con un diámetro de poro 3D. La ecuación supone una estructura aleatoria compuesta de una única fibra cuyas secciones transversales suponen formas redondas perfectas. El diámetro de las fibras ( $\omega$ ) se midió en cinco imágenes independientes de microscopía electrónica de barrido a 10000X, a través del programa informático AxioVision LE v4.8.2.0.

Resultados obtenidos *in vitro* para mallas de fibra de policaprolactona, en la regeneración de cartílago

35

Descripción de los resultados *in vitro* obtenidos con mallas de fibra de policaprolactona que prevén una aplicación en la regeneración cartílago.

La malla probada comprende:

40

- una malla polimérica porosa preparada con policaprolactona con un peso molecular en el intervalo entre 70000-90000 Da,
- obtenida mediante electrohilatura, con un diámetro promedio de fibra entre 0.35-2.0  $\mu\text{m}$ ,
- grosor 40-70  $\mu\text{m}$ ;
- tamaño medio de poro 1.2-13.37  $\mu\text{m}$
- porosidad 83-91 %.
- resistencia a la tracción aparente: 2.15-4.38 MPa
- módulo elástico aparente: 8.58-27.87 MPa

45

50

Si se tiene en cuenta un cultivo celular dinámico, la capacidad de las mallas fibrosas de PCL de resistir las fuerzas ejercidas por la perfusión líquida (entre 0.10 - 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) les otorga una característica única. Esta característica mecánica será importante cuando se implante en la cavidad sinovial de la rodilla, ya que permitirá que el implante con células soporte las fuerzas ejercidas por el fluido sinovial. Además, el sistema de cultivo dinámico destaca la permeabilidad de estas mallas fibrosas a líquidos/ fluidos pero no a células, lo que proporciona después ventajas selectivas en el intercambio de factores solubles liberados por las células en cultivo. Como es selectiva a estos factores, la malla permitirá la comunicación entre las células, lo que dificulta su "escape" de la malla. Esta característica será relevante para su aplicación clínica en la regeneración de cartílago articular, ya que se desea que esta malla actúe como una división entre los dos compartimentos de la rodilla. La malla separará las células de la médula ósea del líquido de la cavidad sinovial, lo que permitirá la inducción de la diferenciación condrogénica de las células madre mesenquimales presentes en la médula ósea.

60

65

Para simular la división realizada por la malla cuando se implanta en la cavidad sinovial de la rodilla, se sembraron condrocitos articulares humanos y células madre humanas en diferentes lados de la malla fibrosa biodegradable. Los resultados preliminares muestran que los condrocitos cultivados en un lado de la malla fueron capaces de inducir la diferenciación condrogénica de las células madre cultivadas en el lado opuesto de la malla fibrosa biodegradable, sin añadir agentes bioactivos para la diferenciación condrogénica. También pudo observarse que ni los condrocitos ni las

células madre fueron capaces de atravesar la malla fibrosa biodegradable, específicamente de un lado al otro de la malla.

5 La superficie de estas mallas puede alterarse mediante la modificación de la superficie, con el objetivo de mejorar su biocompatibilidad y las características de bioactividad superficial. En un trabajo reciente, el sulfato de condroitina (CS), un polímero de origen natural, se inmovilizó en la superficie de las fibras de las mallas de PCL, que se funcionalizaron anteriormente mediante la exposición a UV/O<sub>3</sub> y la aminólisis. Las técnicas de ángulo de contacto, SEM, perfilometría óptica, FTIR, espectroscopía de fotoelectrones de rayos X confirmaron el éxito de la inmovilización de CS en las NFM de PCL. Además, las NFM de PCL con CS inmovilizado mostraron menor rugosidad y mayor hidrofiliidad que las muestras sin CS. Los condrocitos articulares humanos (hAC) se cultivaron en las mallas fibrosas de PCL con o sin inmovilización de CS. Los resultados biológicos demuestran que los hAC proliferaron durante todo el transcurso del experimento en ambos tipos de mallas analizadas. La deposición de la matriz extracelular del cartílago también se observó en los dos tipos de mallas fibrosas biodegradables. Los resultados de la PCR cuantitativa demostraron la sobreexpresión de genes relacionados con cartílago tales como *Aggrecan*, *Collagen tipo II*, *COMP* y *Sox9* en ambos tipos de mallas fibrosas biodegradables. Las observaciones morfológicas de SEM y LSCM revelaron que los hAC mantienen su forma redonda característica y la aglomeración celular exclusivamente sobre las mallas fibrosas de PCL con inmovilización de CS. En conclusión, se logró exitosamente la inmovilización de CS en la superficie de las mallas fibrosas de PCL y proporciona una plataforma válida que permite que se desarrollen métodos adicionales de funcionalización de superficie en los andamios para la ingeniería de tejido de cartílago.

20 Otra ventaja de estas mallas fibrosas de policaprolactona es su biodegradación. La policaprolactona tiene una tasa de degradación lenta (entre 8 - 15 semanas) en comparación con las mallas comercialmente disponibles. Este mayor tiempo de degradación permite el soporte de las células por más tiempo, de forma que las células sean capaces de producir una matriz extracelular más densa, lo que permite la formación de neocartílago y en consecuencia, la reparación del defecto del cartílago.

Resultados obtenidos *in vitro* para mallas de fibra de policaprolactona, en la regeneración de esófago

30 Descripción de los resultados *in vitro* obtenidos con mallas de fibra de policaprolactona que prevén una aplicación en la regeneración tejido esofágico.

La malla probada comprende:

- 35 ● una malla polimérica porosa preparada con policaprolactona con un peso molecular en el intervalo entre 70000-90000 Da,
- obtenida mediante electrohilatura, con un diámetro promedio de fibra entre 0.35-2.0 µm,
- grosor 40-70 µm;
- tamaño medio de poro 1.2-13.37 µm
- porosidad 83-91 %.
- 40 ● resistencia a la tracción aparente: 2.15-4.38 MPa
- módulo elástico aparente: 8.58-27.87 MPa

45 Se implantó una malla de fibra biodegradable en el cerdo doméstico como modelo animal, en un defecto esofágico de 4 cm de diámetro circunferencial, inducido por disección submucosal endoscópica (ESD) del esófago, como un modelo de lesiones esofágicas premalignas y malignas de bajo grado. Este estudio *in vivo* demostró la capacidad de una malla de fibra biodegradable implantada para evitar la aparición de estenosis esofágica después de la ESD. Catorce días después de la implantación de la malla de fibra biodegradable en el esófago defectuoso, una evaluación endoscópica mostró signos macroscópicos de reepitelización de la submucosa esofágica. La malla de fibra biodegradable implantada, además de permitir el cultivo de células epiteliales, también evita el sangrado y la perforación del esófago.

50 Además, la malla de fibra biodegradable de policaprolactona mostró resistencia a la degradación enzimática del contenido luminal del esófago. Los resultados de este estudio preclínico con sobrevivencia animal indican que la malla de fibra biodegradable implantable permite la reepitelización y la remodelación de la mucosa esofágica con menos formación de fibrosis, lo que evita la reducción del diámetro luminal del esófago.

55 Técnicamente, la malla de fibra biodegradable es fácil de manejar, si se tienen en cuenta las limitaciones de manejo del equipo endoscópico, con la flexibilidad necesaria y otras propiedades físicas esenciales para la aplicación endoscópica. Tras la implantación, la malla de fibra biodegradable demostró buena adaptabilidad a los tejidos gastrointestinales, con alta garantía de colocación en el área del defecto, y mantuvo esta posición durante todo el período regenerativo, sin desprejar la presencia constante de secreciones lumbales y la contractilidad del esófago. Generalmente, la malla de fibra biodegradable presenta una sostenibilidad estructural que, teóricamente, permite aislar las áreas frágiles de la pared de los órganos tubulares tales como el esófago y el recto.

Resultados obtenidos *in vitro* para mallas de fibra de policaprolactona, en la regeneración de ligamento periodontal

65 Descripción de los resultados *in vitro* obtenidos con mallas de fibra de policaprolactona que prevén una aplicación en la regeneración de ligamento periodontal.

La malla probada comprende:

- una malla polimérica porosa preparada con policaprolactona con un peso molecular en el intervalo entre 70000-90000 Da,
- obtenida mediante electrohilatura, con un diámetro promedio de fibra entre 0.35-2.0  $\mu\text{m}$ ,
- grosor 40-70  $\mu\text{m}$ ;
- tamaño medio de poro 1.2-13.37  $\mu\text{m}$
- porosidad 83-91 %.
- resistencia a la tracción aparente: 2.15-4.38 MPa
- módulo elástico aparente: 8.58-27.87 MPa

La funcionalidad biológica de la malla de fibra biodegradable puede mejorarse mediante el cultivo de células derivadas del ligamento periodontal humano (hPDL) antes de la implantación. La caracterización fenotípica de las hPDL se realizó mediante citometría de flujo. Los datos de la investigación demostraron la expresión de los antígenos típicos de células madre mesenquimales (MSC) como CD-29, -73, -90 y -105, durante 15 pases de cultivo, y la ausencia de expresión de marcadores hematopoyéticos, que incluyen el antígeno CD-34 y -45. Esas MSC se sembraron en mallas de nanofibras de policaprolactona obtenidas mediante electrohilatura (NFM de PCL) y en membranas BioGide® (membranas basadas en colágeno porcino de Geistlich Biomaterials) para determinar el comportamiento biológico de las hPDL.

Los datos experimentales demuestran un rendimiento biológico similar (es decir, viabilidad y proliferación celular, y síntesis de proteínas) en ambas estructuras estudiadas, en condiciones de cultivo basales y osteogénicas. Curiosamente, las hPDL cultivadas en NFM de PCL en condiciones basales tienden a presentar una expresión significativamente menor de marcadores osteoblásticos, específicamente de fosfatasa alcalina. Esta observación es pertinente dado el hecho de que esta condición favorece la formación de un ligamento normal y podría evitar la anquilosis del tejido, lo que evita el desarrollo sobre el tejido periodontal no funcional. Por otro lado, la expresión de proteínas y transcritos relacionados con huesos corrobora la diferenciación osteogénica exitosa de las hPDL cuando se cultivan tanto en NFM de PCL como en BioGide®.

En conclusión, la malla de fibra biodegradable es una solución integrada para la regeneración de ligamento periodontal. Esta malla permite, simultáneamente, el suministro local de fármacos y el cultivo de células relevantes, lo que maximiza la eficacia del tratamiento y el tiempo de recuperación del paciente. Técnicamente, es más fácil de aplicar y no colapsa durante la cirugía.

Resultados obtenidos *in vitro* para mallas de fibra de quitosano, como apósito para heridas en la piel

Descripción de los resultados *in vitro* obtenidos con mallas de fibra de quitosano que prevén una aplicación en apósitos para heridas en la piel.

Caracterización de la malla:

- Composición polimérica: quitosano (peso molecular: 270-416 kDa, grado de desacetilación (DD): 87.7-95 %);
- Diámetro promedio de las fibras: 65 nm - 6  $\mu\text{m}$ ;
- Malla no tejida, compuesta por fibras distribuidas aleatoriamente o con direcciones de alineación preferidas;
- Degradación: absorción de agua: ~300 % después de 7 días; pérdida de peso: ~ 30 % después de 7 días.

Descripción del método de electrohilatura para obtener mallas de fibra de quitosano:

- Concentración de polímero: 5-6 % (p/v)
- Disolventes: ácido trifluoroacético: diclorometano (7:3)
- Régimen de flujo: 0.4-0.8 ml/h
- Voltaje: 12-18 kV
- Distancia del colector de tobera de hilatura a tierra: 10-12 cm
- Diámetro interno de la tobera de hilatura: 0.514 mm
- Temperatura ambiente: 19-22.5 °C
- Humedad relativa: 32-43 %

Descripción del proceso de neutralización:

El proceso de neutralización evita la disolución de la malla cuando se sumerge en medios acuosos. La malla se sumerge en una solución de amoníaco 7N en metanol durante 10 minutos, se lava con agua destilada hasta pH neutro (pH = 7) y finalmente se congela a -180 °C. La eliminación del agua se realiza mediante liofilización para preservar la estructura fibrosa de la malla.

Descripción Detallada de la Solicitud

5 Una malla de fibra biodegradable hecha de quitosano para el tratamiento de heridas y quemaduras dérmicas y/o la regeneración de la piel. Esta malla actúa como una barrera para células no deseadas (tales como bacterias) que es permeable a nutrientes y gases. Tiene una integridad física adecuada y adaptabilidad al defecto dérmico, y muestra un fácil manejo tanto en estado seco como húmedo. Tiene la capacidad de absorber grandes cantidades de agua y también de liberar el agua absorbida después de la adherencia a la piel. El quitosano tiene grupos funcionales (específicamente grupos amino, -NH<sub>2</sub>), lo que permite la inmovilización de agentes bioactivos y/o nanopartículas. Por lo tanto, la malla de fibra puede incluir uno o más fármacos y/o una o más proteínas y/o células deseables, lo que reduce los efectos secundarios de los agentes bioactivos y el número de procedimientos quirúrgicos secundarios.

10 Se evaluó la capacidad *in vitro* de dicha malla de fibra de quitosano de absorber y liberar antibióticos, particularmente gentamicina, así como también la liberación de gentamicina a partir de nanopartículas (por ejemplo, liposomas) inmovilizadas en la superficie de las fibras de la malla. Para lograr eso, las mallas de fibra de quitosano se funcionalizaron con grupos tiol (-SH) y los liposomas se inmovilizaron covalentemente en la superficie de las fibras, con una distribución uniforme. El estudio de cinéticas de liberación demostró que la gentamicina se libera a partir de los liposomas inmovilizados en la superficie de la malla de fibra de manera sostenida durante un período de 16 horas. Las pruebas de sensibilidad demostraron que la gentamicina liberada a partir de las mallas de fibra de quitosano, así como también a partir de los liposomas inmovilizados en la superficie de las fibras de la malla, inhibe el crecimiento de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Los resultados demuestran que estas mallas pueden usarse con éxito para la aplicación local en la piel, en la erradicación de patógenos comúnmente presentes en infecciones de la piel y/u orificios dérmicos.

25 La presente invención no se restringe, de ninguna manera, a las modalidades descritas en la presente descripción y un experto en el área puede proporcionar muchas posibilidades para modificaciones de las mismas sin apartarse de la invención, que se define en las reivindicaciones.

Las modalidades preferidas descritas anteriormente pueden combinarse obviamente. Las siguientes reivindicaciones definen modalidades preferidas adicionales de la presente invención.

Reivindicaciones

- 5 1. Una malla polimérica para la reparación y la regeneración de tejidos de un organismo que comprende poros en donde al menos el 70 % de los poros de dicha malla tiene un tamaño menor que el necesario para confinar las células de dichos tejidos, y en donde al menos el 70 % de los poros de dicha malla tiene un tamaño mayor que el necesario para el paso de fluidos intersticiales de dichos tejidos; en donde el tiempo de degradación de dicha malla polimérica dentro del organismo es al menos 8 semanas y dicha malla polimérica comprende:
  - 10 una resistencia a la tracción aparente entre 2.15-4.38 MPa y un módulo elástico aparente entre 8.58-27.87 MPa;
  - una porosidad interconectada en el intervalo entre 83-91 %;
  - en la que el 80-90 % de los poros tiene un tamaño en el intervalo entre 1.2-13.37  $\mu\text{m}$ .
- 15 2. Una malla, de acuerdo con la reivindicación anterior, en donde el tiempo de degradación de dicha malla polimérica es 8-26 semanas, preferentemente 8-15 semanas.
3. Una malla, de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, comprende al menos un polímero seleccionado de policaprolactona, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, quitosano, alginato o dextrano, o combinaciones de estos.
- 20 4. Una malla, de acuerdo con la reivindicación anterior, comprende además un polímero natural seleccionado de almidón, ácido hialurónico, o sulfato de condroitina, o combinaciones de estos.
- 25 5. Una malla, de acuerdo con las reivindicaciones 3-4, en donde la malla polimérica consiste en los siguientes polímeros:
  - 30 policaprolactona, o
  - policaprolactona y almidón, o
  - policaprolactona y ácido hialurónico, o
  - policaprolactona y sulfato de condroitina, o
  - ácido poliglicólico y ácido poliláctico, o combinaciones de estos.
- 35 6. Una malla, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-5 en donde dicha malla comprende el 80-60 % (p/v) de policaprolactona y el 20-40 % (p/v) de un polímero natural, o cualquier otra proporción de polímeros.
7. Una malla, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en donde el peso molecular de policaprolactona se encuentra en el intervalo entre 70000 - 90000 Da.
- 40 8. Una malla, de acuerdo con las reivindicaciones 3-4, en donde el peso molecular de quitosano se encuentra en el intervalo entre 270-416 kDa.
9. Una malla, de acuerdo con las reivindicaciones 3-4, en donde el grado de desacetilación de quitosano se encuentra en el intervalo entre el 50-100 %, preferentemente entre el 87.7-95 %.
- 45 10. Una malla, de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, comprende además sustancias activas seleccionadas de la siguiente lista: fármacos antiinflamatorios, antibióticos, agentes biológicos, fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedades biológicas, inhibidores, factores de crecimiento.
- 50 11. Una malla, de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, comprende sustancias activas seleccionadas de la siguiente lista: ácido acetilsalicílico, paracetamol, trisalicilato de colina y magnesio, diclofenaco, diflunisal, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, cetoprofeno, meclofenamato, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, fenilbutazona, piroxicam, salsalato, sulindac, tolmetina, corticosteroides, glucocorticoides, metotrexato, sulfasalazina, leflunomida, ciclosporina, minociclina, hidroxiclороquina, azatioprina, D-penicilamina, etanercept., infliximab, adalimumab, certolizumab, golimumab, anakinra, tocilizumab, abatacept, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, EGF, HIF, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D, IGF-1, FGF-2, FGF-18, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7/OP-1, CDMP-1/GDF-5, o CDMP-2.
- 55 12. Una malla, de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, en donde su grosor se encuentra en el intervalo entre 20-200  $\mu\text{m}$ , preferentemente 40-80  $\mu\text{m}$ .
- 60 13. Una malla, de acuerdo con la reivindicación anterior, para el uso en el tratamiento de enfermedades que implica la reparación y la regeneración de tejidos, en particular el tejido a tratar es piel, cartílago, ligamento periodontal o submucosa esofágica.
- 65 14. Una malla, de acuerdo con la reivindicación anterior, en donde dicha malla se encuentra tejida o no tejida.

15. La malla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que se obtiene mediante electrohilatura comprende un conjunto de fibras que contienen una composición polimérica seleccionada de la siguiente lista: policaprolactona, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, quitosano, alginato o dextrano, o combinaciones de estos, el diámetro de las fibras que es menor que 2  $\mu\text{m}$ .