(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 701 226**

(51) Int. Cl.:

A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/48 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2014** **PCT/US2014/016905**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014** **WO14130449**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2014** **E 14709037 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018** **EP 2958606**

(54) Título: **Gradientes químicos**

(30) Prioridad:

19.02.2013 US 201361766366 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2019

(73) Titular/es:

BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (100.0%)
201 West 7th Street
Austin, TX 78701, US

(72) Inventor/es:

ROMERO-ORTEGA, MARIO I.;
LOTFI, PARISA;
JOHNSTON, BENJAMIN R.;
DASH, SWARUPNARAYAN;
RAZAL, JOSELITO y
WALLACE, GORDON

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 701 226 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

Gradientes químicos

CAMPO

Esta invención se refiere a aparatos y métodos para formar gradientes químicos y a composiciones que comprenden gradientes químicos y, en particular, a gradientes químicos para la administración de fármacos y otras aplicaciones biomédicas.

ANTECEDENTES

Durante el desarrollo y tras una lesión, las células neuronales migran y elongan sus axones hacia órganos y células diana apropiados en respuesta a gradientes de biomoléculas, que guían la regeneración axonal (quimiotaxis) o bien mediante la unión a las células o a la matriz extracelular (ECM), o bien mediante la secreción al fluido extracelular. En algunos casos, las moléculas solubles quimiotácticas se secretan por células específicas, y se forman gradientes a través de difusión y convección desde el sitio de liberación. Las respuestas celulares a tales gradientes pueden verse influenciadas por la naturaleza de las biomoléculas y características físicas de la ECM (que puede incluir colágeno, fibronectina y laminina), tal como el tamaño de poros de la matriz y la rigidez. En el sistema nervioso periférico (PNS) en desarrollo, se establecen gradientes de factores neurotróficos (NTF) tal como factor del crecimiento nervioso (NGF), neurotrofina 3 (NT-3) y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), mediante células diana distales y elongación axonal directa y reconocimiento de dianas de neuronas motoras (VMN) de la médula espinal ventral, así como neuronas sensoriales en los ganglios de las raíces dorsales (DRG). En el PNS adulto, la rama eferente de neuronas sensoriales vuelve a inervar las dianas cutáneas y musculares espontáneamente tras una lesión, pero los axones aferentes no pueden entrar en el entorno hostil de la médula espinal adulta, a menos se atraigan por la expresión del NGF inducido. Además, los errores de exploración realizados por las neuronas VMN y DGR lesionadas durante la regeneración pueden reducirse drásticamente mediante la expresión de la expresión genética apropiada que vuelve a establecer gradientes de NTF.

Desafortunadamente, la creación de gradientes químicos, tales como gradientes de NTF, y el uso de gradientes químicos en la reparación de nervios siguen siendo extremadamente desafiantes. Por ejemplo, algunas tecnologías anteriores no proporcionan una liberación sostenida de señales moleculares deseadas y/o carecen de soporte de la ECM. Otras tecnologías carecen de la capacidad de proporcionar gradientes químicos no transitorios y/o fisiológicamente relevantes presentes normalmente *in vivo*. Además, algunos métodos previos para crear un gradiente químico son aplicables a estudios solo a corto plazo *in vitro* y/o presentan riesgos asociados con la inyección de un vector viral.

Por tanto, se desean aparatos y métodos mejorados para proporcionar un gradiente químico.

SUMARIO

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación se refiere a métodos, aparatos y composiciones útiles en la reparación de tejidos a través del establecimiento de gradientes químicos altamente ajustables, tales como gradientes de NTF o NGF, diseñados para dirigir el crecimiento axonal a través de hidrogeles multiluminales o multicanal rellenos con ECM. Con ese fin, la presente divulgación se refiere a una estructura polimérica enrollada novedosa anclada a las paredes de microcanales de hidrogel para establecer gradientes regulados altamente y de manera predecible de liberación de NTF controlable y sostenida que permea el colágeno luminal, lo que a su vez estabiliza los gradientes de factores difusibles y proporciona sustratos de crecimiento permisivos y regulados y controlados/controlables de manera predecible para la elongación axonal. Se determinó un modelo matemático para describir la difusión de NTF en esta matriz compleja y para determinar la concentración de NTF luminal a lo largo del tiempo, usando ensayos de crecimiento neuronal *in vitro* de DRG para proporcionar evidencia de regeneración nerviosa quimiotáctica a lo largo de los gradientes de NGF tridimensionales. Se cree que este método demuestra ser beneficioso para la reparación tisular guiada, entre otros usos.

Aspectos de la presente divulgación se refieren a aparatos, que comprenden al menos un conducto que tiene un primer extremo y un segundo extremo y uno o más microcanales dispuestos en el conducto y que se extienden desde el primer extremo hacia el segundo extremo. Una fibra está enrollada alrededor del exterior de al menos un microcanal, comprendiendo la fibra un agente activo que puede hacerse funcionar para difundir al interior del microcanal. En un aspecto adicional, el conducto comprende tubos de catéter, tal como tubos de implantación Micro-Renathane.

En un aspecto todavía adicional, los microcanales están dispuestos dentro de un material de matriz dispuesto en el conducto. Todavía adicionalmente, el material de matriz puede comprender un gel de agarosa, un poli(ácido láctico-

co-glicólico) (PLGA), poli(ácido láctico) (PLA), policaprolactona, poliuretano, un poliéster, policarbonato, colágeno, politetrafluoroetileno (PTFE), poli(metacrilato de metilo) (PMMA), un copolímero de etileno-acetato de vinilo (EVA), un polidimetilsiloxano (PDMS), poliéter-poliuretano, un poli(tereftalato de etileno) (PET), una polisulfona (PS), un poli(óxido de etileno) (PEO) o polietilenglicol (PEG), un copolímero de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) (PEO-PPO), una poliolefina, tal como polietileno (PE) o polipropileno (PP), o una combinación de uno o más de los anteriores.

En aún otro aspecto, el material de matriz comprende un gel de agarosa que comprende entre aproximadamente el 1,5 por ciento en peso y el 2,5 por ciento en peso de agarosa, basado en el peso total del gel de agarosa. Todavía adicionalmente, una pluralidad de microcanales está dispuesta preferiblemente en el conducto, y una pluralidad de fibras está enrollada alrededor de los exteriores de una pluralidad de microcanales.

En un aspecto todavía adicional, la pluralidad de fibras están cada una enrolladas alrededor del exterior de un microcanal diferente, y al menos dos de las fibras enrolladas comprenden agentes activos diferentes, cantidades diferentes de un agente activo y/o pasos diferentes.

En aún otro aspecto, la fibra comprende o está formada a partir de un material polimérico, tal como, por ejemplo, un poli(ácido láctico-co-glicólico), un poli(ácido láctico), una caprolactona, o una combinación de los mismos. Una fibra también puede comprender o estar formada a partir de otros materiales. Adicionalmente, en un aspecto adicional, el polímero es biodegradable.

En una variación todavía adicional, la fibra está enrollada alrededor del exterior del microcanal en una configuración isotrópica y/o una configuración anisotrópica.

En otro aspecto, el agente activo comprende un fármaco y/o un factor de crecimiento.

Aspectos de la divulgación se refieren adicionalmente a métodos de formación de un gradiente químico que comprenden disponer cualquiera de los aparatos descritos en el presente documento en un compartimento biológico. Aspectos adicionales contemplan que el compartimento biológico comprenda un conducto nervioso. Preferiblemente, el gradiente de agente activo comprende un gradiente de fármaco y/o un gradiente de factor de crecimiento.

Aspectos de la presente divulgación se refieren también a una composición que comprende un material polimérico enrollado que comprende un agente activo que puede hacerse funcionar para difundir fuera del material polimérico cuando el material polimérico se dispone en un compartimento biológico. En otro aspecto, el material polimérico comprende preferiblemente un poli(ácido láctico-co-glicólico), un poli(ácido láctico), una caprolactona, o una combinación de los mismos. En un aspecto todavía adicional, el material polimérico es biodegradable. En aún otro aspecto, el agente activo comprende un fármaco y/o factor de crecimiento. En un aspecto todavía adicional, el compartimento biológico comprende un conducto nervioso.

Variaciones adicionales de la presente divulgación se refieren adicionalmente a una composición, y a aparatos que comprenden una composición, que comprende un primer gel que comprende un agente activo a una primera concentración y un segundo gel que comprende un agente activo a una segunda concentración, estando dispuestos el primer gel y el segundo gel en el espacio para proporcionar un gradiente de concentración del agente activo.

En un aspecto adicional, la composición comprende un tercer gel que comprende un agente activo a una tercera concentración, el primer gel, segundo gel y tercer gel dispuestos en el espacio, u orientados, para proporcionar una región de gradiente que comprende un gradiente de concentración del agente activo. En aún otro aspecto, la región de gradiente comprende un gradiente de concentración lineal. Todavía adicionalmente, los geles primero, segundo y tercero están dispuestos para proporcionar una pluralidad de gradientes de concentración lineales, o los geles primero, segundo y tercero están dispuestos u orientados en el espacio para proporcionar una región no de gradiente además de la región de gradiente.

En otra variación, la presente divulgación se refiere a una composición descrita anteriormente, en la que el primer gel y/o el segundo gel comprende un gel de agarosa, un poli(ácido láctico-co-glicólico), un poli(ácido láctico), una caprolactona, o una combinación de los mismos y el agente activo comprende un fármaco o factor de crecimiento.

Todavía adicionalmente, la presente divulgación se refiere a un aparato que comprende un conducto y cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente dispuestas en el conducto.

Además, la presente divulgación se refiere a un método de formación de un gradiente de concentración de agente químico o activo que comprende disponer cualquiera de los aparatos mencionados anteriormente en un compartimento biológico, tal como, por ejemplo, un conducto nervioso, y en el que el gradiente de concentración de agente químico o activo comprende un gradiente de fármaco o un gradiente de factor de crecimiento.

Todavía adicionalmente, la presente divulgación se refiere a un método para formar un gradiente de agente químico o activo que comprende disponer cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente en un compartimento biológico, tal como, por ejemplo, un conducto nervioso, y en el que el gradiente de concentración de agente químico o activo comprende un gradiente de fármaco o un gradiente de factor de crecimiento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figs. 1A-B ilustran vistas en perspectiva de conductos que comprenden un microcanal.

La Fig. 1C ilustra una vista en perspectiva de un aparato según una realización descrita en el presente documento.

La Fig. 2 ilustra una vista en perspectiva esquemática de una población de células nerviosas mixta que dirige células nerviosas a un aparato según una realización descrita en el presente documento.

La Fig. 3 ilustra una vista en perspectiva esquemática de un aparato según una realización descrita en el presente documento.

Las Figs. 4A-E ilustran fotografías de diversos componentes de un aparato según una realización descrita en el presente documento.

La Fig. 5A ilustra una vista en perspectiva esquemática de un aparato según una realización descrita en el presente documento.

Las Figs. 5B-D ilustran imágenes de microscopio de un gradiente químico proporcionado por el aparato de la Fig. 5A.

La Fig. 6 ilustra un gráfico de las longitudes de proceso de células promedio correspondientes al gradiente químico de las Figs. 5B-D.

La Fig. 7A ilustra una vista en perspectiva esquemática de un gradiente químico según una realización descrita en el presente documento.

Las Figs. 7B-C ilustran vistas en perspectiva de conductos que comprenden una pluralidad de microcanales.

La Fig. 7D ilustra una vista en perspectiva de un aparato que comprende una pluralidad de microcanales según una realización descrita en el presente documento.

La Fig. 7E ilustra una vista en perspectiva de un aparato según una realización descrita en el presente documento y el perfil de densitometría correspondiente del aparato.

Las Figs. 7Fi-iii ilustran un proceso de elaboración de un aparato según la realización descrita en el presente documento.

Las Figs. 7G-I son imágenes de microscopio de un aspecto mostrado en la Fig. 7E.

La Fig. 8A ilustra una serie de imágenes de microscopio de gradientes químicos formados según algunas realizaciones de métodos descritos en el presente documento.

La Fig. 8B ilustra una representación gráfica de los gradientes químicos de la Fig. 8A.

Las Figs. 9A-C ilustran imágenes de microscopio de células nerviosas dispuestas en un gradiente químico según una realización descrita en el presente documento.

Las Figs. 10A-I ilustran imágenes de microscopio de células nerviosas dispuestas en gradientes químicos según algunas realizaciones descritas en el presente documento.

La Fig. 10J ilustra un gráfico correspondiente a las Figs. 10A-I.

La Fig. 10K ilustra una curva de calibración correspondiente a las Figs. 10A-J.

La Fig. 11 ilustra un gráfico de los perfiles de liberación de una molécula según algunas realizaciones de gradientes químicos descritas en el presente documento.

La Fig. 12 ilustra un gráfico de los perfiles de liberación de una molécula según algunas realizaciones de gradientes químicos descritas en el presente documento.

Las Figs. 13A-D ilustran imágenes de microscopio de células nerviosas dispuestas en gradientes químicos según algunas realizaciones descritas en el presente documento.

Las Figs. 13E-F ilustran gráficos correspondientes a las Figs. 13A-D.

Las Figs. 14A-B ilustran imágenes de microscopio de células nerviosas dispuestas en gradientes químicos según algunas realizaciones descritas en el presente documento.

La Fig. 14C ilustra un gráfico correspondiente a las Figs. 14A-B.

Las Figs. 15A-B ilustran imágenes de microscopio de células nerviosas dispuestas en gradientes químicos según algunas realizaciones descritas en el presente documento.

Las Figs. 15C-D ilustran gráficos correspondientes a las Figs. 15A-B.

La Fig. 16 ilustra un gráfico de razón de ángulo de giro del crecimiento axonal según una realización de un método descrita en el presente documento.

La Fig. 17 ilustra una vista en perspectiva esquemática de una composición según una realización descrita en el presente documento.

La Fig. 18 ilustra una imagen de microscopio electrónico de barrido (SEM) de una composición según una realización descrita en el presente documento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los aspectos descritos en el presente documento pueden entenderse más fácilmente mediante referencia a la siguiente descripción detallada, ejemplos, y figuras. Sin embargo, los elementos, aparatos y métodos descritos en el presente documento no se limitan a las realizaciones específicas presentadas en la descripción detallada, ejemplos, y figuras. Debe reconocerse que las realizaciones dadas a conocer son meramente ilustrativas de los principios de la presente invención. Numerosas modificaciones y adaptaciones resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

Además, debe entenderse que todos los intervalos dados a conocer en el presente documento abarcan cualquiera y todos los subintervalos incluidos en los mismos. Por ejemplo, debe considerarse que un intervalo establecido de “1,0 a 10,0” incluye cualquiera y todos los subintervalos que empiezan con un valor mínimo de 1,0 o más y que terminan con un valor máximo de 10,0 o menos, por ejemplo, de 1,0 a 5,3, o de 4,7 a 10,0, o de 3,6 a 7,9.

También debe considerarse que todos los intervalos dados a conocer en el presente documento incluyen los puntos de extremo del intervalo, a menos que se establezca expresamente lo contrario. Por ejemplo, generalmente debe considerarse que un intervalo de “entre 5 y 10” incluye los puntos de extremo 5 y 10.

Además, cuando se usa la frase “hasta” en relación con una cantidad, debe entenderse que la cantidad es al menos una cantidad detectable. Por ejemplo, un material presente en una cantidad “hasta” una cantidad especificada puede estar presente desde una cantidad detectable y hasta e incluyendo la cantidad especificada.

Tal como se describe adicionalmente a continuación en el presente documento, la presente divulgación se refiere a métodos, aparatos y composiciones útiles para formar gradientes químicos, incluyendo dentro de un entorno biológico. Además, tales gradientes químicos pueden usarse para la reparación de tejidos y/o la administración de fármacos. Por ejemplo, en algunos casos, la reparación de tejidos puede conseguirse estableciendo un factor del crecimiento nervioso (NGF) altamente ajustable diseñado para dirigir el crecimiento axonal a través de microcanales de un aparato descrito en el presente documento, tal como microcanales de hidrogel rellenos con material de matriz extracelular (ECM).

Por tanto, aspectos de la presente divulgación se refieren a aparatos, métodos y composiciones que pueden usarse para proporcionar un gradiente químico sostenido, incluyendo en un entorno biológico. En una variación, fibras que incorporan cantidades conocidas de agentes activos, tales como factores de crecimiento, se enrollan en una orientación predeterminada y preseleccionada, preferiblemente alrededor de las paredes, o la circunferencia externa, de un microcanal en un conducto. De esta manera, el principio activo puede proporcionarse de manera controlada a un tejido introducido en el microcanal a una concentración predeterminada. En algunas realizaciones, la administración de la concentración del agente activo puede alterarse de manera predecible a lo largo de la longitud del microcanal alterando intencionadamente el paso de fibra o el número de vueltas presentes en un área dada a lo largo de la longitud del microcanal. De esta manera, puede establecerse un gradiente de concentración a lo largo de la longitud del microcanal. Por ejemplo, cuando se proporciona un agente activo tal como un factor de crecimiento (GF) en las fibras enrolladas, tales fibras enrolladas pueden enrollarse o envolverse alrededor, o dentro de, uno o más microcanales o luces para proporcionar uno o más gradientes de GF definidos en los microcanales o luces. Por

tanto, se dan a conocer métodos, aparatos y composiciones para crear un gradiente químico predeterminado, preseleccionado y controlado de manera predecible. Un gradiente químico de este tipo también puede denominarse en el presente documento gradiente “programable”. En algunas realizaciones, el gradiente se lleva a cabo mediante el paso o número de giros de una fibra descrita en el presente documento.

Un aparato descrito en el presente documento, en algunas realizaciones, comprende un conducto que tiene un primer extremo y un segundo extremo, uno o más microcanales dispuestos en el conducto y que se extienden desde el primer extremo hacia el segundo extremo, y una fibra enrollada alrededor del exterior de al menos un microcanal, en el que la fibra comprende un agente activo que puede hacerse funcionar para difundir al interior del microcanal. El conducto del aparato puede tener cualquier tamaño, forma y estructura y estar formado de cualquier material que no sea incompatible con los objetivos de la presente invención. En algunas realizaciones, por ejemplo, el conducto está formado a partir de un material polimérico tal como un poliuretano, un poliéster, un policarbonato o una poliolefina, tal como polietileno o polipropileno, etc. Además, en algunos casos, el conducto tiene una forma sustancialmente tubular o cilíndrica. Un conducto tubular o cilíndrico de este tipo, en algunas realizaciones, tiene un diámetro interno de entre aproximadamente 100 µm y aproximadamente 50 mm, entre aproximadamente 100 µm y aproximadamente 10 mm, entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 10 mm, entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 5 mm, o entre aproximadamente 200 µm y aproximadamente 500 µm. En algunos casos, el conducto tiene un diámetro mayor de aproximadamente 50 mm o menor de aproximadamente 100 µm. Además, en algunos casos, un conducto descrito en el presente documento tiene una longitud de entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 200 mm, entre aproximadamente 5 mm y aproximadamente 100 mm, entre aproximadamente 10 mm y aproximadamente 30 mm, o entre aproximadamente 50 mm y aproximadamente 150 mm.

Adicionalmente, un conducto descrito en el presente documento puede comprender o estar formado a partir de cualquier material que no sea incompatible con los objetivos de la presente invención. En algunas realizaciones, por ejemplo, el conducto está formado a partir de un material polimérico tal como un poliuretano, un poliéster, un policarbonato, una policaprolactona, un poli(ácido láctico) (PLA), un colágeno, un politetrafluoroetileno (PTFE), un poli(metacrilato de metilo) (PMMA), un copolímero de etileno-acetato de vinilo (EVA), un polidimetilsiloxano (PDMS), un poliéter-poliuretano, un poli(tereftalato de etileno) (PET), una polisulfona (PS), un poli(óxido de etileno) (PEO) o polietilenglicol (PEG), un copolímero de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) (PEO-PPO), una poliolefina tal como polietileno (PE) o polipropileno (PP), o una combinación de uno o más de los anteriores. En algunos casos, el conducto comprende un segmento de tubos de implantación o de catéter, tal como tubos de implantación Micro-Renathane. También pueden usarse otros materiales.

De manera similar, los microcanales de un conducto descrito en el presente documento pueden tener cualquier tamaño y forma que no sea incompatible con los objetivos de la presente invención. En algunos casos, por ejemplo, un microcanal sustancialmente tubular o cilíndrico tiene un diámetro de entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 2000 µm, entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 50 µm, entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 1 µm, entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 10 µm, entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 5 µm, o entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 1 µm. En algunas realizaciones, los microcanales tienen un diámetro promedio de entre aproximadamente 100 µm y aproximadamente 2000 µm, entre aproximadamente 100 µm y aproximadamente 1000 µm, o entre aproximadamente 300 µm y aproximadamente 800 µm. En algunos casos, los microcanales tienen un diámetro promedio de menor de aproximadamente 100 µm o mayor de aproximadamente 2000 µm. Además, los microcanales pueden tener una longitud de hasta aproximadamente el 99%, hasta aproximadamente el 95%, hasta aproximadamente el 90% o hasta aproximadamente el 80% de la longitud del conducto del aparato.

Además, en algunas realizaciones, los microcanales de un aparato descrito en el presente documento se disponen dentro de un material de matriz dispuesto en el conducto. Puede usarse cualquier material de matriz que no sea incompatible con los objetivos de la presente invención. En algunos casos, por ejemplo, un material de matriz comprende un hidrogel, tal como, por ejemplo, un hidrogel biodegradable. Un material “biodegradable”, con fines de referencia en el presente documento, comprende un material que puede descomponerse dentro de un entorno biológico, y puede proporcionar un producto de descomposición no tóxico. En algunos casos, un material biodegradable descrito en el presente documento comprende uno o más enlaces éster. En algunos casos, un material de matriz de un aparato descrito en el presente documento comprende un gel de agarosa. Puede usarse cualquier gel de agarosa que no sea incompatible con los objetivos de la presente invención. En algunos casos, por ejemplo, el material de matriz comprende un gel de agarosa que comprende entre aproximadamente el 0,5 y aproximadamente el 5 por ciento en peso de agarosa, entre aproximadamente el 1 y aproximadamente el 4 por ciento en peso de agarosa, o entre aproximadamente el 1,5 y aproximadamente el 2,5 por ciento en peso de agarosa, basado en el peso total del gel de agarosa. Ejemplos adicionales no limitativos de materiales de matriz adecuados para su uso en algunas realizaciones de aparatos descritas en el presente documento incluyen poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(ácido láctico) (PLA), policaprolactona, poliuretano, poliéster, policarbonato, colágeno, politetrafluoroetileno (PTFE), poli(metacrilato de metilo) (PMMA), un copolímero de etileno-acetato de vinilo (EVA), un polidimetilsiloxano (PDMS), poliéter-poliuretano, un poli(tereftalato de etileno) (PET), una polisulfona (PS), un poli(óxido de etileno) (PEO) o polietilenglicol (PEG), un copolímero de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) (PEO-PPO), una poliolefina tal como polietileno (PE) o polipropileno (PP), o una combinación de uno o más de los anteriores. También pueden usarse otros materiales de matriz solos o en combinación.

Además, cualquier fibra que no sea incompatible con los objetivos de la presente invención puede enrollarse alrededor del exterior de un microcanal descrito en el presente documento. Una “fibra”, con fines de referencia en el presente documento, comprende cualquier estructura alargada tal como, por ejemplo, una hebra o filamento. Una fibra descrita en el presente documento puede tener cualquier diámetro que no sea incompatible con los objetivos de la presente invención. En algunas realizaciones, por ejemplo, una fibra descrita en el presente documento tiene un diámetro (antes de enrollarse o envolverse de la manera descrita en el presente documento) de entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 100 µm, entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 50 µm, entre aproximadamente 1 µm y aproximadamente 50 µm, o entre aproximadamente 10 µm y aproximadamente 50 µm. Adicionalmente, en algunas realizaciones, una fibra enrollada comprende vueltas, bucles o giros que tienen un diámetro externo de entre aproximadamente 10 µm y aproximadamente 1000 µm, entre aproximadamente 50 µm y aproximadamente 500 µm, o entre aproximadamente 100 µm y aproximadamente 500 µm.

Haciendo referencia a la orientación preferida de la fibra en relación con el microcanal, se entiende que la fibra, en su estado enrollado preferido, ocupa preferiblemente la región definida por la circunferencia externa, o está orientada de otro modo adyacente a la circunferencia externa, del microcanal. De esta manera, tal como se usa en el presente documento, el término “exterior del microcanal” se refiere a cualquier orientación mediante la cual la fibra enrollada se sitúa de acuerdo con, o rodea el microcanal.

Además, en algunas variaciones, una fibra de un aparato descrito en el presente documento comprende o está formada a partir de un polímero tal como un polímero biodegradable. En algunos casos, una fibra comprende o está formada a partir de una poli(glicolida), poli(lactida), poli(glicolida-co-lactida), poli(p-dioxanona), alginato, poli(ácido láctico-co-glicólico), un poli(ácido láctico), una caprolactona, o una combinación de los mismos. Además, tal como se describe adicionalmente a continuación en el presente documento, una fibra de un aparato descrito en el presente documento puede enrollarse alrededor del exterior de un microcanal del aparato de cualquiera manera que no sea incompatible con los objetivos de la presente invención. En algunos casos, por ejemplo, la fibra está enrollada alrededor del exterior del microcanal en una configuración isotrópica. Una configuración “isotrópica”, con fines de referencia en el presente documento, comprende una configuración que tiene un paso uniforme o sustancialmente uniforme. El “paso” de una fibra, con fines de referencia en el presente documento, comprende el número de bucles o vueltas de la fibra por longitud del microcanal alrededor del cual está enrollada la fibra. Un paso “uniforme”, con fines de referencia en el presente documento, comprende un paso que no varía a lo largo de la longitud del microcanal. Un paso “sustancialmente” uniforme, con fines de referencia en el presente documento, comprende un paso que varía en menos de aproximadamente el 10 por ciento, menos de aproximadamente el 5 por ciento o menos de aproximadamente el 1 por ciento a lo largo de la longitud del microcanal. Alternativamente, también es posible que una fibra descrita en el presente documento se enrolle alrededor del exterior del microcanal en una configuración anisotrópica. Una configuración “anisotrópica”, con fines de referencia en el presente documento, comprende una configuración no isotrópica, tal como una configuración no isotrópica descrita adicionalmente a continuación en el presente documento. Además, en algunas variaciones, una fibra descrita en el presente documento no bloquea ni obstruye el microcanal de un aparato descrito en el presente documento.

El agente activo de una fibra descrita en el presente documento puede comprender uno o más agentes activos que no sean incompatibles con los objetivos de la presente invención. Un “agente activo” con fines de referencia en el presente documento, comprende una especie química que puede proporcionar un gradiente químico de una manera descrita en el presente documento. Por ejemplo, en algunos casos, un agente activo comprende un fármaco, un péptido, una proteína, un factor de inhibición del crecimiento, o un factor de promoción del crecimiento tal como un factor del crecimiento nervioso (NGF). Por tanto, en algunas realizaciones, el gradiente químico proporcionado por un aparato descrito en el presente documento comprende un gradiente de concentración de fármaco o un gradiente de concentración de factor de crecimiento. Puede usarse cualquier fármaco que no sea incompatible con los objetivos de la presente invención. Un agente activo también puede comprender otros marcadores o señales moleculares deseadas. Además, en algunas realizaciones, el agente activo es biológicamente activo y/o no está desnaturalizado.

Además, tal como se describe adicionalmente a continuación en el presente documento, algunas realizaciones de aparatos descritas en el presente documento comprenden una pluralidad de microcanales dispuestos en el conducto. Los microcanales pueden tener los mismos tamaños, formas y/o estructuras o diferentes. Además, en algunos casos que comprenden una pluralidad de microcanales, una pluralidad de fibras puede enrollarse alrededor de los exteriores de uno o más de la pluralidad de microcanales. En algunos casos, la pluralidad de fibras se enrollan cada una alrededor del exterior de un microcanal diferente y al menos dos de las fibras enrolladas comprenden los mismos agentes activos o diferentes, las mismas cantidades de un agente activo o diferentes, y/o los mismos pasos y/o dimensiones o diferentes.

En otro aspecto, en el presente documento se describen composiciones que, en algunas realizaciones, pueden proporcionar una o más ventajas en comparación con algunas otras composiciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición descrita en el presente documento proporciona una o más ventajas también proporcionadas por un aparato descrito en el presente documento. Además, una composición descrita en el

presente documento, en algunos casos, puede usarse además de o en lugar de un aparato descrito en el presente documento para formar un gradiente químico.

Una composición descrita en el presente documento, en algunas realizaciones, comprende un material polimérico enrollado que comprende un agente activo que puede hacerse funcionar para difundir fuera del material polimérico cuando el material polimérico se dispone en un compartimento biológico. El material polimérico enrollado, en algunos casos, puede tener la misma estructura que la fibra de un aparato descrito en el presente documento. Por ejemplo, en algunos casos, el material polimérico enrollado de una composición descrita en el presente documento es biodegradable. En algunas realizaciones, el material polimérico comprende un poli(ácido láctico-co-glicólico), un poli(ácido láctico), una caprolactona, o una combinación de los mismos. Además, en algunos casos, el agente activo comprende un fármaco o factor de crecimiento. Adicionalmente, el compartimento biológico de una composición descrita en el presente documento puede comprender cualquier compartimento biológico que no sea incompatible con los objetivos de la presente invención. En algunos casos, por ejemplo, el compartimento biológico comprende una parte de un organismo vivo. Además, en algunas realizaciones, el compartimento biológico comprende un conducto nervioso. También pueden usarse otros compartimentos biológicos, tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

En otras variaciones, una composición descrita en el presente documento no incluye necesariamente un componente enrollado tal como una fibra o material polimérico enrollado descrito en el presente documento. En algunos casos, por ejemplo, una composición descrita en el presente documento comprende un primer material de gradiente o matriz que comprende un agente activo a una primera concentración y un segundo material de gradiente o matriz que comprende el agente activo a una segunda concentración, en la que la primera matriz y la segunda matriz están dispuestas en el espacio para proporcionar un gradiente de concentración del agente activo. El agente activo puede comprender cualquier agente activo descrito en el presente documento, tal como un fármaco o factor de crecimiento. Además, en algunas variaciones, una composición descrita en el presente documento comprende además un tercer material de gradiente o matriz que comprende el agente activo a una tercera concentración, y la primera matriz, segunda matriz y tercera matriz están dispuestas en el espacio, u orientadas, para proporcionar una región de gradiente que comprende un gradiente de concentración del agente activo. La región de gradiente, en algunos casos, puede comprender un gradiente de concentración lineal. Además, en algunas realizaciones, las matrices primera, segunda y tercera de una composición descrita en el presente documento están dispuestas para proporcionar una pluralidad de gradientes de concentración, incluyendo una pluralidad de gradientes de concentración lineales. Además, en algunos casos, las matrices primera, segunda y tercera pueden disponerse para proporcionar una región no de gradiente además de una región de gradiente descrita en el presente documento. Un material de gradiente o matriz de una composición descrita en el presente documento puede comprender o puede estar formado a partir de cualquier material que no sea incompatible con los objetivos de la presente invención. En algunos casos, por ejemplo, una matriz es un gel que comprende o está formado a partir de un material polimérico, incluyendo un material polimérico biodegradable. En algunas realizaciones, un gel comprende un hidrogel. En algunos casos, un gel comprende o está formado a partir de un gel de agarosa, un poli(ácido láctico-co-glicólico), un poli(ácido láctico), una caprolactona, o una combinación de los mismos. También puede usarse otro gel o materiales no de gel como matrices para establecer el/los gradiente(s) deseado(s).

Además, tal como se describe en el presente documento, una composición puede disponerse en un conducto para proporcionar un aparato. Por tanto, en otro aspecto, se describen aparatos en el presente documento, comprendiendo el aparato un conducto con una composición descrita en el presente documento dispuesta en el conducto.

En aún otro aspecto, en el presente documento se describen métodos de formación de un gradiente químico, que, en algunas variaciones, pueden proporcionar una o más ventajas en comparación con algunos otros métodos. Por ejemplo, en algunos casos, un método descrito en el presente documento puede proporcionar un gradiente químico de una manera modular y/o ajustable. Adicionalmente, en algunos casos, un método descrito en el presente documento puede proporcionar un gradiente químico que presenta un gradiente químico sostenido, no transitorio, *in vivo*. Un método de formación de un gradiente químico descrito en el presente documento, en algunas variaciones, comprende disponer un aparato y/o una composición descrita en el presente documento en un compartimento biológico. En algunos casos, el gradiente químico comprende un agente activo gradiente de concentración, tal como un gradiente de fármaco o un gradiente de factor de crecimiento. Adicionalmente, en algunos casos, el compartimento biológico comprende un conducto nervioso. Además, puede usarse cualquier aparato y/o composición descrita en el presente documento en un método descrito en el presente documento.

Algunas realizaciones descritas en el presente documento se ilustran adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLO 1

Aparato que comprende un único microcanal

En una variación, se fabrica un dispositivo implantable que proporciona un gradiente químico y posibilita una administración localizada de un factor de crecimiento específico dentro de un microcanal a través del cual crecerán axones. Con fines comparativos con respecto a esta variación, la Fig. 1A ilustra una luz o microcanal 11 dentro de un conducto 10. El microcanal 11 comprende un agente activo (no mostrado) para proporcionar al menos una región transitoria de un potencial químico deseado. Sin embargo, es difícil controlar la concentración de agente activo a lo largo de la longitud del microcanal usando la estructura de la Fig. 1A. Como ejemplo comparativo adicional para esta variación, la Fig. 1B muestra un microcanal 12 dentro de un conducto 11 que comprende micropartículas incrustadas 13. Las micropartículas 13 están impregnadas con un agente activo (no mostrado) tal como fármaco o factor de crecimiento y pueden ser biodegradables. Las micropartículas 13 pueden degradarse o liberar de otro modo el agente activo de manera predecible a lo largo del tiempo de un modo programable, preseleccionado o controlado. Por tanto, la estructura de la Fig. 1B puede proporcionar una concentración de agente activo dentro del microcanal 12 a lo largo de un periodo de tiempo. Sin embargo, este modelo carece de un gradiente de concentración. Por el contrario, la Fig. 1C muestra una realización de un aparato según la presente divulgación. La fibra enrollada 16 está impregnada con un agente activo y rodea un microcanal 14. El microcanal 14 está incrustado dentro de un conducto de hidrogel 10. La situación de las vueltas de fibras 16 a lo largo de la longitud de microcanal 14 crea un gradiente controlable de agente activo que se libera al microcanal 14. La concentración, y por tanto un gradiente controlable, puede ajustarse de manera predecible cambiando el número de giros helicoidales, el paso o la distancia lateral entre los giros, las dimensiones o el grosor de la fibra, y/o la longitud del canal. Por tanto, el aparato de la Fig. 1C permite una administración de agente activo a largo plazo produciendo un gradiente químico sostenido en el microcanal. El gradiente químico se proporciona a través de la liberación de agentes activos desde la fibra enrollada y al microcanal mediante difusión a lo largo del tiempo. El perfil de tiempo de la liberación de agentes activos desde la fibra enrollada puede controlarse basándose en uno o más de: la concentración del agente activo dentro de la fibra, el tamaño y/o la composición química del agente activo, la composición química y/o microestructura del material de fibra, y la composición química y/o microestructura de cualquier material de matriz dispuesto en el conducto. Además, el número de giros de la fibra alrededor del microcanal, en algunas realizaciones, puede programarse para proporcionar una inclinación deseada de un gradiente químico. Se entiende que el término “programado,” con fines de referencia en el presente documento, significa cualquier orientación preseleccionada y predeterminada de las vueltas de una fibra que puede controlarse y es controlable para proporcionar un resultado deseado. La “inclinación” de un gradiente químico, con fines de referencia en el presente documento, comprende la pendiente de una representación gráfica de la concentración de un agente activo dado u otra especie química frente a la longitud del microcanal en una dirección dada.

EJEMPLO 2

Aparato que comprende una pluralidad de microcanales

Los aparatos descritos en el presente documento, en algunas realizaciones, comprenden una pluralidad de microcanales. Tales aparatos pueden usarse para estimular el crecimiento de axones a través de un hueco. Cuando tienen que crecer axones a través de un hueco, a menudo existe la necesidad de separar modalidades o tipos específicos de axones en distintos compartimentos o regiones espaciales. Una separación de este tipo puede ser útil para la reparación de ramas sensoriales y motoras y/o para el desarrollo de interfaces neuronales periféricas de bucle cerrado. Además, una separación de este tipo puede conseguirse disponiendo una pluralidad de fibras descritas en el presente documento alrededor de una pluralidad de microcanales de un dispositivo descrito en el presente documento, difiriendo las fibras en la cantidad y/o el tipo de factor de crecimiento administrado a los diferentes microcanales y/o difiriendo en la inclinación del gradiente químico proporcionado dentro de los diferentes microcanales. De esta manera, un tipo específico de axón de una población mixta de nervios puede atraerse a un microcanal específico y de ese modo guiarse eventualmente a la diana apropiada para el tipo de axón específico. Además, este proceso puede llevarse a cabo para una pluralidad de tipos de axón diferentes en la población mixta.

La Fig. 2 muestra un diagrama esquemático de la aplicación de varias fibras enrolladas, preferiblemente con gradientes diferentes, en un conducto multiluminal para guiar axones y otros tipos de células con una modalidad diferente. Esto permite la guía de diferentes tipos de células al conducto al tiempo que se proporciona el gradiente de concentración óptimo de cada tipo de célula. La guía axonal específica de la modalidad es una aplicación contemplada del establecimiento del gradiente. Más específicamente, la Fig. 2 es un diagrama esquemático que muestra varios axones 20 de una población de células nerviosas mixta guiados a un conducto multiluminal 22 que tiene fibras enrolladas 24a, 25a, 26a, 27a ubicadas en respectivos microcanales 24b, 25b, 26b, 27b, pudiendo tener cada microcanal opcionalmente una modalidad diferente. En esta variación, cada luz o microcanal está rodeado por una fibra envuelta helicoidalmente que contiene señales moleculares específicas (tal como neurotrofina o pleiotrofina) de las que se conoce que atraen el crecimiento de un tipo específico de neurona (células nerviosas). La liberación de las señales moleculares crea un gradiente en los microcanales dentro de las fibras enrolladas. El gradiente puede controlarse mediante la arquitectura de la fibra tal como se describe de manera adicional anteriormente en el presente documento (por ejemplo, seleccionando el número total de giros helicoidales, la distancia lateral entre giros adyacentes, y/o el paso de los giros).

Para confirmar los efectos sinérgicos de múltiples factores de crecimiento, se sometió a prueba el crecimiento de las neuronas sensoriales que se había hecho crecer a partir de factores neurotróficos o pleiotróficos individuales. Esta

prueba determinó un nivel de referencia del crecimiento inducido por estos estímulos químicos. La Fig. 3 es un diagrama esquemático que muestra la aplicación de múltiples fibras enrolladas que proporcionan gradientes diferentes en un conducto multicanal para guiar axones y otro tipo de células. Tal como se ilustra en la Fig. 3, el conducto 30 incluye un primer microcanal 32 que tiene dos fibras enrolladas 33, 34 orientadas alrededor de la longitud de la pared de microcanal. De manera similar, un segundo microcanal 36 tiene dos fibras enrolladas 37, 38 orientadas alrededor de la longitud de la segunda pared de microcanal. Esta estructura permite la guía de diferentes tipos de células a diferentes microcanales, pudiendo tener cada microcanal un gradiente de concentración deseado, preseleccionado y óptimo de un agente activo particular correspondiente a un efecto deseado sobre los diferentes tipos de células. Por ejemplo, los diferentes gradientes químicos de los diferentes microcanales pueden seleccionarse cada uno para promover el crecimiento de diferentes tipos de axones. Debe entenderse que puede disponerse cualquier número de agentes activos y cualquier número de fibras alrededor de un microcanal de cualquier manera para conseguir un gradiente químico deseado.

EJEMPLO 3

Método de formación de un gradiente químico

Un aparato que tiene la estructura general del aparato de la Fig. 1C en el ejemplo 1 se usó para formar un gradiente químico según una realización descrita en el presente documento tal como sigue. En primer lugar, se fabricó una fibra enrollada de poli(DL-ácido láctico-co-glicólico) (PLGA). El copolímero de PLGA biodegradable (85:15) (0,84 de viscosidad intrínseca (v.i.), 135.000 de peso molecular promedio en peso (MW)) se moldeó en fibras usando un proceso de hilatura en húmedo. Brevemente, una disolución al 20% en peso de PLGA se disolvió completamente en diclorometano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Esta disolución se cargó en una jeringa de vidrio (estanca a los gases, Hamilton, Reno, NY) y se inyectó en un tubo de 1,5 cm de diámetro lleno de isopropanol para formar la fibra. Se usaron sustratos Mylar prelavados como carretes de recogida. Con muchos parámetros de hilatura posibles, se controlaron la tasa de inyección de disolución de hilatura y la velocidad de recogida de fibra a 1,8 ml/h y 8,5 m/min, respectivamente, para conseguir fibras de 30 µm de diámetro. Además, si era necesario, se añadió polietilenglicol (PEG) a la formulación de hilatura para preservar la bioactividad del agente activo (tal como un factor de crecimiento). Para formar fibras enrolladas, las fibras se enrollaron alrededor de una varilla de vidrio (denominada en ocasiones también fibra de formación) y se secaron durante la noche para permitir que cualquier diclorometano restante se evaporase. Tras la formación, las fibras se enrollaron alrededor de fibras de titanio (diámetro = 250 µm) y se almacenaron a 4ºC antes de su uso.

Para formar fibras que comprenden un agente activo (o una especie de control), las fibras enrolladas se dispusieron en una disolución del agente activo durante la noche. Por ejemplo, se usaron las siguientes disoluciones para formar fibras de PLGA que comprenden un agente activo (o una especie de control): (1) NGF de agente de crecimiento nervioso (5 µg/ml, Invitrogen, Carlsbad, CA); (2) albúmina sérica bovina de especie de control (BSA, 20 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); y (3) colorante de cianina 3 de especie fluorescente (Cy3, 5 µg/ml, Jackson ImmunoResearch Lab, West Grove, PA).

Se obtuvieron imágenes de las fibras de PLGA enrolladas cargadas con Cy3 usando microscopía óptica y microscopía fluorescente para demostrar que las espiras proporcionaban un gradiente químico y tendían a mantener sus estructuras incluso tras retirar el metal de fabricación. Las Figs. 4A-F muestran imágenes aumentadas (microscopio) de la misma fibra en las áreas poco y muy concentradas, confirmando la diferencia significativa en el número de giros y la luz fluorescente que emana de fibras cargadas con colorante fluorescente (Cy3). La Fig. 4A muestra una imagen de la espira enrollada 40 alrededor de una fibra de fabricación (no mostrada). La Fig. 4B muestra la fibra de PLGA enrollada 42 que puede colocarse en un conducto nervioso. Las Figs. 4C-F son imágenes más ampliadas de las áreas en recuadros 44, 46 mostradas en la Fig. 4B. Se obtienen imágenes de la fibra enrollada de Cy3-PLGA 47 en la Fig. 4D de la región de alta densidad, refiriéndose “alta densidad” a un paso relativamente alto (recuadro 44). Se obtienen imágenes de las fibras enrolladas de Cy3-PLGA 48 de la región de baja densidad (recuadro 46).

La fabricación de las fibras requiere procedimientos químicos rigurosos tales como la aplicación de disolventes orgánicos (diclorometano). Para confirmar que se preservaron los factores de crecimiento (proteínas) durante todo el proceso de la fabricación de las espiras, se proporcionaron fibras enrolladas cargadas con NGF en presencia de células de feocromocitoma (PC-12). Las células PC-12 son una línea de células que proliferan y se diferencian en presencia del factor del crecimiento nervioso (NGF). Se cargaron células/suspensión de ECM en el pocillo de células del área de dispositivo de moldeado usando un dispositivo de matriz multiluminal transparente (TMM) descrito más en detalle inmediatamente a continuación en el presente documento, y se introdujeron a presión en la luz creando una presión negativa. Las células sembradas dentro de la luz se fijaron en 24 horas con paraformaldehído (PFA) al 4% y se tiñeron con faloidina verde de Oregón y yoduro de TO-PRO 3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para visualizar los marcadores citoesqueléticos y nucleares, respectivamente. Las longitudes de proceso de células PC-12 se midieron en áreas de concentración cero, baja y alta. Para facilitar la penetración de colorantes de tinción, se colocaron los geles en una placa de cultivo celular mientras se agitaba la disolución durante la noche a 4ºC usando una placa magnética y una barra agitadora.

Se cargaron células de feocromocitoma (células PC-12) en un bastidor rectangular novedoso (12,5 mm x 36 mm) usado para moldear geles de agarosa. El dispositivo de moldeo se elaboró de cemento dental y se usó para guiar múltiples fibras de titanio (0,25 mm x 17 mm; SmallParts, Logansport, IN). Se situaron fibras de titanio enrolladas con espiras poliméricas que contenían factor de crecimiento a través de perforaciones en ambos extremos del dispositivo. En condiciones estériles, el dispositivo de moldeo se colocó sobre un portaobjetos de vidrio en una placa de cultivo celular y se aplicó una disolución de agarosa ultrapura al 1,5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para cubrir las fibras y se permitió que polimerizase. Se suspendieron células PC12 (1 x 10^6 ml) en Matrigel con contenido reducido de factor de crecimiento (3,5 mg/ml, BD Biosciences, San José, CA). La presión negativa generada durante la retirada de las fibras de titanio del gel solidificado estiró la mezcla de células PC12/ECM en la luz de los microcanales de hidrogel moldeados. Las fibras enrolladas con factor de crecimiento estaban intactas en la luz y en contacto aproximado con las células PC12. Los cultivos celulares se alimentaron con medio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO) y mantuvieron en el incubador a 37ºC y CO_2 al 5% durante 72 horas.

Para la visualización de células PC12 diferenciadas en los microcanales, los geles se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% y se procesaron para determinar la inmunofluorescencia. Tras aclarar los geles con una disolución de bloqueo (Triton-PBS al 0,1%/suero normal al 1%), las muestras se incubaron con faloidina verde de Oregón y yoduro de TO-PRO 3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) como marcadores citoesquelético y nuclear, respectivamente. Se evaluó la tinción usando un microscopio confocal Zeiss (Zeiss Axioplan 2 LSM 510 META). Se evaluó y se analizó la tinción usando microscopía regular y fluorescente y reconstrucción de imágenes tridimensionales con apilamiento en el eje z de la red microvascular en los hidrogeles multiluminales. La cuantificación de la longitud de los procesos de células PC-12 en 3 densidades de espira diferentes (ninguna, baja y alta) se consiguió usando el software Axiovision LE (CarlZeiss, Axiocam, versión 4.7.2) y explorador de imágenes Zeiss LSM (versión 4.2.0.12).

Todos los valores de datos se expresaron como media ± error estándar de la media. Los datos se analizaron mediante la t de Student paramétrica o mediante la prueba de la t de Student no paramétrica seguida de evaluación post hoc de Mann Whitney usando el software Prism 4 (GraphPad Software Inc.). Se consideró que los valores con $p \leq 0,05$ eran estadísticamente significativos.

Las Figs. 5A-D demuestran la bioactividad de las células PC-12 en microcanales cargados con NGF. La Fig. 5A es un diagrama esquemático del diseño del experimento. Se colocó una fibra en espira cargada con NGF 52 en un conducto nervioso 50. Entonces se cargaron células PC-12 dentro del canal. La Fig. 5B es una imagen de microscopio que muestra células PC-12 ubicadas distalmente desde la espira (el área en el microcanal correspondiente al “recuadro B” en la Fig. 5A). Estas células no mostraron ningún proceso 24 horas tras la siembra. La Fig. 5C es una imagen de microscopio que muestra células PC-12 ubicadas en el centro de la espira (el área en el microcanal correspondiente al “recuadro C” en la Fig. 5A). Estas células se diferenciaron y presentaron algunos procesos en 24 horas. La Fig. 5D es una imagen de microscopio que muestra células PC-12 ubicadas en el área de alta densidad de los canales con el mayor número de giros de espira (el área en el microcanal correspondiente al “recuadro D” en la Fig. 5A). Tras 24 horas, las células en esta región se diferenciaron y presentaron procesos largos. Las imágenes de las células dentro de la luz tenían un aspecto esférico y no mostraron procesos en el área en el que no había espira cargada con NGF. Sin embargo, las células sembradas en las áreas con fibras enrolladas cargadas con NGF estaban completamente diferenciadas y tenían procesos largos. De manera interesante, estos procesos eran más largos en el área con una mayor densidad de espira. Esto confirmó que las áreas con números de giros mayores liberarán más NGF y por tanto tienen una mayor concentración del factor de crecimiento. Para cuantificar las imágenes visualizadas, se midió la longitud de todos los procesos igual a o mayor que el cuerpo de la célula. El análisis cuantitativo de los datos mostró una diferencia significativa entre las longitudes de los procesos celulares (véase la Fig. 6) en las tres áreas “recuadradas” B-D representadas en las Figs. 5B-D. Se consideró que un valor de P igual a o menor de 0,05 era significativo. La longitud promedio de los procesos era significativamente mayor en el área proximal ($p<0,002$; $n = 6$; 71,33 +/- 12,17 µm) y en la central (35,66 +/-12,69 µm) en comparación con la distal (1,4 +/- 1,14 µm).

La Fig. 6 representa la bioactividad de las células PC12 en fibra enrollada cargada con NGF en el microcanal. La fibra en espira cargada con NGF se colocó en un conducto nervioso. La bioactividad de las células PC-12 se determinó midiendo los procesos celulares en el área sin ningún NGF (“recuadro B” en la Fig. 5A), el área con baja densidad de giros de espira (“recuadro C” en la Fig. 5A) y el área con alta densidad de giros de espira (“recuadro D” en la Fig. 5A). Se obtuvieron imágenes de las células 24 horas tras la siembra y se midió la longitud de los procesos usando ImageJ. Tal como se muestra en la Fig. 6, las células PC12 cargadas distalmente de la espira (recuadro B en la Fig. 5A) no mostraron ningún proceso 72 horas tras la siembra. Las células PC12 ubicadas en el centro de la espira (recuadro C en la Fig. 5A) se diferenciaron y tenían algunos procesos en 24 horas. Tras 72 horas, las células PC12 ubicadas en el área de alta densidad de los canales con el mayor número de giros de espira cargados con NGF (recuadro D en la imagen mostrada en la Fig. 5A) se diferenciaron y tenían procesos largos. Las células PC12 ubicadas en el centro de la espira (recuadro C en la imagen de la Fig. 5A) se diferenciaron y tenían algunos procesos en 24 horas. Había una diferencia significativa en la longitud de los procesos celulares en las diferentes áreas (*) $p < 0,05$ y (**) $p < 0,005$.

EJEMPLO 4

Método de formación de un gradiente químico

La liberación de factor de crecimiento desde espiras de poli-ácido láctico-co-glicólico (PLGA) se modelizó en dos configuraciones (isotrópica y anisotrópica) de un modelo de múltiples medios resuelto usando análisis de elementos finitos. El modelo se implementó en COMSOL Multiphysics usando un ordenador con procesador 2,4 GHz Intel® Core™2 Quad y consistía en anillos con un diámetro de 250 micrómetros y un grosor de 1 micrómetro distribuidos dentro de un cilindro con un diámetro de 250 micrómetros y una longitud de 1 centímetro. La primera configuración (isotrópica) consistía en una distribución uniforme de 20 anillos. La segunda configuración (anisotrópica) consistía en la disposición de 3 secciones con disposición de anillos a diferentes distancias entre sí. Las secciones consistían en secciones con 250, 500 y 1000 micrómetros. El perfil de liberación de las espiras de PLGA cargadas se modelizó usando una versión modificada de la ecuación de Korsmeyer-Peppas para la liberación de un polímero degradable. El estado inicial de la espira se tomó como una carga uniforme de 1 microgramo. Las simulaciones se realizaron durante un periodo de 28 días.

En el modelo matemático, se consideró que el conducto de llenado tenía el coeficiente de difusión del gel de agarosa. Se consideró que el diámetro de los canales era de 250 µm. Los resultados del análisis matemático mostraron que la fibra enrollada isotrópica creaba una concentración homogénea en los canales que se mantenía durante 28 días. Se consideró que ambos extremos del conducto estaban abiertos. Por tanto, en el extremo proximal y distal, se observó una disminución en la concentración del factor de crecimiento debido a el flujo de difusión fuera de la luz. Sin embargo, el cambio en la concentración de los extremos proximal y distal en comparación con el centro era mínimo (menor del 15% de la concentración en el centro) y la estructura del conducto tiende a preservar la concentración homogénea. Las configuraciones anisotrópicas de la fibra enrollada crearon un gradiente ya a los 5 días y tenían a mantener el gradiente durante mucho tiempo (al menos 28 días). El flujo de salida del factor de crecimiento desde los extremos distal y proximal no afectaba al establecimiento del gradiente. La inclinación del gradiente se mantenía sustancialmente igual durante todo el estudio (desde el día 5 hasta el día 28). Se anotó la especulación matemática del diseño isotrópico de la fibra enrollada. La distribución homogénea del gradiente en el diseño isotrópico permanecerá durante al menos 28 días en los microcanales. Las imágenes de la distribución de concentración predicha en los microcanales usando Comsol confirmó el establecimiento de un gradiente sostenido al menos durante 28 días en la configuración anisotrópica.

EJEMPLO 5

Método de formación de un gradiente químico

Protocolo de gradiente de NGF-colágeno intraluminal

En el presente documento se describe un método que consigue una liberación de factor de crecimiento sostenida a través de la producción de gradientes moleculares en guías nerviosas multiluminales llenas de colágeno, tal como se muestra en las Figs. 7A-G y las Figs. 8A-B. Para conseguir esto, se insertaron fibras de liberación de NGF enrolladas sobre varillas de titanio en aberturas hechas en un dispositivo de moldeo de matriz multiluminal transparente (TMM). La TMM consiste en un bastidor abierto de plástico cuadrado con agujeros en extremos opuestos a través de los que se insertan las varillas de titanio. Posteriormente se añadió agarosa al 1,5% sobre las varillas de metal, incrustando eficazmente las espiras poliméricas de liberación de NGF en agarosa.

Las guías nerviosas (NG) incorporan gradientes de NTF en la pared tubular (Fig. 7A) o usan micropartículas de elución de NTF (Fig. 7C). Sin embargo, los diseños de NG multiluminales actuales carecen de liberación de NTF mediante un gradiente. Este estudio usa fibras poliméricas enrolladas ancladas a las paredes de microcanales de hidrogel con colágeno luminal para abordar esta limitación (Fig. 7D). La Fig. 7E es una fotografía de fibras de PLGA cargadas con Cy3 IgG enrolladas sobre una varilla de metal. La obtención de imágenes por fluorescencia y la densitometría ilustran el gradiente resultante. La Fig. 7F es un esquema del dispositivo de moldeo de matriz multiluminal transparente (TMM) que muestra el despliegue de la espira de fibra. La retirada de la varilla de metal de la TMM tras la polimerización de agarosa ancla las vueltas sobre las paredes de los microcanales, mientras que simultáneamente llena la luz con colágeno (Fig. 7F*i-iii*). En la Fig. 7G, imágenes confocales muestran las espiras poliméricas desplegadas (rojo) con el relleno de colágeno (verde) en la TMM. Barra de escala = 100 um.

Más específicamente, tal como se muestra en la Fig. 7A, el conducto de colágeno 70a comprende NGF proporcionado en un gradiente. La Fig. 7B muestra un conducto 70b que comprende multiluminales o microcanales 72b que comprenden NGF. La Fig. 7C muestra un conducto 70c que comprende multiluminales o microcanales 72c que comprenden micropartículas de NGF 74. En esta variación, los microcanales 72c comprenden cada uno una concentración sustancialmente uniforme de NGF. La Fig. 7D muestra un conducto 70d que comprende multiluminales o microcanales 72d que comprenden fibra en espira cargada con NGF 76 estableciendo un gradiente.

Según un método de TMM, entonces se añadió colágeno 77 a pocillo “de carga” de la TMM (Fig. 7Fi). Tras la retirada de la varilla de metal (titanio) que da forma a la fibra 78, la espira de fibra de liberación de NGF se retiene en las paredes de los microcanales resultantes moldeados en agarosa 79, y la presión negativa creada por su retirada llena simultáneamente de manera sustancial el espacio luminal de tales microcanales con colágeno 77 (véanse las

Figs. 9Fii-iii). Este método está diseñado para la liberación continuada de moléculas tales como Cy3-IgG, BSA o NGF encapsuladas en las fibras poliméricas en microcanales llenos de colágeno a lo largo del tiempo, proporcionando una regulación del crecimiento nervioso tanto permisiva como quimiotáctica. La Fig. 7G es una microfotografía que muestra la espira 76 con la varilla de metal retirada. Las Figs. 7H y 7I son microfotografías de la fibra enrollada 76 con colágeno 77 introducida dentro de la circunferencia de, y para "llenar" la fibra enrollada 76.

Liberación de factor de crecimiento desde fibras poliméricas enrolladas

Se usaron dos fuentes de fibra para fabricar fibras enrolladas de 30 µm: poli-ácido láctico-co-glicólico (PLGA 85:15; 135KD) y polidioxanona biodegradable ELUTE™. Se fabricaron fibras de PLGA mediante hilatura en húmedo. Brevemente, se preparó una disolución de PLGA al 20% en diclorometano (DCM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), dispensado sobre un baño de coagulación de isopropanol circulante usando una bomba de jeringa (1,8 ml/h), recogiendo la fibra resultante sobre un carrete rotatorio (8,5 m/min). Se incubaron fibras de espira de PLGA secadas con NGF (10 µg /ml; Invitrogen, Carlsbad, CA), BSA (20 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) o colorante de cianina 3 (Cy3; 5 µg/ml; Jackson ImmunoResearch Lab, Inc., West Grove, PA) durante la noche. La mayoría de los estudios usaron fibras de polidioxanona biodegradable ELUTE™, fabricadas de manera personalizada por TissueGen Inc, Dallas, TX para encapsular NGF y enrollarlo 80 veces sobre varillas de metal de titanio (0,25 mm x 17 mm; SmallParts, Logansport, IN) espaciadas o bien equitativamente (uniforme) o bien de manera diferencial a 15, 25 y 40 giros sobre un área longitudinal de 3,33 mm (gradiente de 10-100 ng/ml). Las fibras se secaron a TA y se almacenaron a -20ºC hasta su uso.

Se cargó polímero conductor polipirol con colorante rojo. Tal como se muestra en la Fig. 8A, tras la simulación eléctrica, se liberó el colorante a lo largo de 120 minutos de tiempo desde la fibra y estableció un gradiente. La Fig. 8B muestra la cuantificación de las áreas SI y SII, confirmando la formación del gradiente.

Cultivo de células PC12

Se desplegaron varillas de metal con fibras de PLGA enrolladas que contenían o bien BSA o bien NGF en el dispositivo de moldeo de TMM tal como se describió anteriormente. En condiciones estériles, el dispositivo de moldeo se colocó sobre un portaobjetos de vidrio en una placa de cultivo celular y se usó agarosa ultrapura al 1,5% para cubrir las fibras. Tras la polimerización, se cargaron células de feocromocitoma (PC12; 1 x 10^6/ml) suspendidas en colágeno de pollo atelomérico (el 85% de tipo I, el 15% de tipo II; Millipore) en los microcanales de hidrogel de diámetro externo de 250 µm moldeados mediante la presión negativa generada. Los cultivos celulares de TMM se cultivaron durante 72 h en medio RPMI-1640 (Hyclone SH30027.02) complementado con HS al 10%, FBS al 5% y Pen-Strep al 1% y se mantuvieron a 37ºC y en CO_2 al 5%. Al final del estudio, los cultivos celulares se aclararon extensamente con PBS y se tiñeron. Cultivos regulares independientes de células PC12 se cultivaron en placas normales a una densidad de siembra de 1 x 10^6 y se expusieron a un intervalo de NGF de 10-100 ng/ml para determinar su respuesta biológica (véanse las Figs. 9A-C). Usando las PC12 como biosensores, se midió la respuesta de las neuritas a diferentes concentraciones de NGF. Se usó regresión lineal para definir una ecuación para calcular la concentración de NGF luminal en los microcanales de TMM basándose en la longitud de neuritas de PC12. Se mostró que las células PC12 respondían a niveles variables de NGF. Tal como se muestra en la Fig. 9A-C, las longitudes de las neuritas de células diferenciadas aumentan a medida que aumenta el nivel de concentración de NGF (tal como se indica en imágenes confocales). La Fig. 9A muestra una concentración de NGF de 10 ng/ml. La Fig. 9B muestra una concentración de NGF de 20 ng/ml. La Fig. 9C muestra una concentración de NGF de 50 ng/ml (barra de escala = 100 µm).

Modelización de la difusión del factor de crecimiento

Se modelizó la liberación de factor de crecimiento desde espiras de PLGA en configuraciones tanto uniformes como de gradiente considerando el entorno de múltiples medios (es decir, microcanales de agarosa con colágeno luminal) usando análisis de elementos finitos. Se estimó la cinética de liberación de proteína usando datos de liberación de ajuste proporcionados por el fabricante en una ecuación de ley de potencia. La ecuación de ley de potencia con geometría (K = 0,37), tiempo (t = 0-28 d) y mecanismo de liberación (n = 0,25; ($M_t = M_\infty K^n$) donde M es la cantidad de fármaco liberada y M_∞ es la cantidad total de fármaco). La cinética de liberación desde espiras de PLGA se estimó usando el modelo de erosión en masa considerando una explosión inicial seguida de difusión a través de poros interconectados. Se usó el modelo de Carman-Kozeny para estimar la difusión molecular (D) en agua, agarosa al 1,5% y colágeno al 0,3% considerando los cambios de concentración molecular (Φ) a lo largo del tiempo (δt) en un volumen fijado (Ω). Los vectores de flujo de difusión ($J=D\nabla\Phi$) se integraron en perpendicular a la superficie (S) mediante la siguiente fórmula: $\delta\Phi/\delta t)\nabla\Phi = \Sigma J^*n\nabla S$ se liberaron desde las fibras poliméricas. El modelo se implementó en software de modelado multifísico y de simulación de ingeniería (COMSOL 4.0) considerando el tubo externo (T) como un cilindro macizo con un diámetro externo de 3 mm, un diámetro interno de 1,5 mm y 10 mm de longitud, y microcanales de agarosa. El módulo de malla usado incluía elementos de volumen de malla tetraédricos, triangulares y hexaédricos para los límites con un tamaño de elemento máximo de 180-1000 µm, tamaño de elemento, tasas de crecimiento de 1,5 y una resolución de curvatura de 0,6. El modelo se validó usando soluciones exactas publicadas, e incorporaba datos de cinética de liberación obtenidos *in vitro*.

Crecimiento de explante de DRG en microcanales de TMM

Se aislaron células de DRG neonatales (P0-4) de ratones normales y se colocaron en un extremo de los microcanales de TMM que contenían espiras de NGF o bien uniformes o bien de gradiente. Los cultivos de DRG se cultivaron en medio Neurobasal A (Sigma, St. Louis, MO) y se mantuvieron a 37ºC y CO_2 al 5% durante 7 días antes de fijarlos en PFA al 4% mediante inmersión. Después, los cultivos se aclararon y se tiñeron.

Inmunotinción

Se aclararon extensivamente geles de TMM en PBS. Entonces se hicieron reaccionar las células PC12 con faloidina verde de Oregón para el marcaje citoesquelético. Para el inmunomarcaje de crecimiento axonal de DRG, el tejido se incubó en suero de burro al 4% durante 1 hora, seguido de incubación con un anticuerpo de ratón anti-β-tubulina III (1:400; Sigma Aldrich) durante la noche a 4ºC. Entonces se incubó el tejido con IgG anti-ratón de burro conjugada con Cy2 (1:400; Sigma Aldrich) y se aclaró. Se usaron objetivos de inmersión en agua para una distancia de trabajo larga en un microscopio confocal Zeiss (Zeiss Axioplan 2 LSM 510 META) para evaluar la tinción celular y el crecimiento axonal directamente dentro de los microcanales de hidrogel.

Análisis de imágenes y cuantificación

Se evaluó la longitud de las neuritas en células diferenciadas PC12 dentro de los microcanales en áreas de baja concentración (SI) y alta concentración (SII) (Figs. 10A-K) correspondientes a diferentes números de espiras de NGF. Se midió la longitud de las neuritas desde el cuerpo de la célula hasta el extremo distal de las neuritas. Solo se consideran para la cuantificación células con neuritas con una longitud mayor al diámetro de la célula, usando software Axiovision LE (CarlZeiss, Axiocam, versión 4.7.2), explorador de imágenes Zeiss LSM (versión 4.2.0.1). La longitud axonal de los DRG se cuantificó a un aumento de 20X a partir de un apilamiento en el eje z (20 imágenes cada una a un grosor de corto de 308 µm). La longitud axonal se midió desde el borde de los DRG hasta el fin del cono de crecimiento usando software Axiovision LE (CarlZeiss, Axiocam, versión 4.7.2) y explorador de imágenes Zeiss LSM (versión 4.2.0.1) para segmentos sin vueltas y un número medio (1-8) o alto (9-15) de vueltas en ese segmento. Se midieron los ángulos de giro de los axones usando Image J. La cuantificación del ángulo de giro se calculó como una razón de todos los axones presentes con respecto al número de axones que giraron. Todos los experimentos se realizaron por duplicado 3-6 veces cada uno.

Análisis estadístico

Todos los valores de datos se expresaron como media ± error estándar de la media. Los datos de PC12 se analizaron mediante una prueba de la t de Student paramétrica seguida de evaluación post hoc de Mann Whitney. Los datos obtenidos de los experimentos de DRG se evaluaron mediante ANOVA seguido de comparación múltiple de Newman-Keuls usando el software Prism 4 (GraphPad Software Inc.). Se consideró que los valores con $p \leq 0{,}05$ eran estadísticamente significativos.

Resultados

Diferenciación de PC12 en un microgradiente de NGF tridimensional

Para determinar si las espiras poliméricas pueden usarse para establecer gradientes biológicamente activos de factores de crecimiento neuronales, se sometió a prueba la capacidad de las células PC12 para diferenciarse en la luz de los microcanales de TMM sobre los que se anclaron espiras de elución de NGF o BSA en las paredes de hidrogel. Tres días tras la siembra solo se observaron células no diferenciadas redondas en los controles de BSA (véanse las Figs. 10A-C). Por el contrario, aquellas cultivadas con espiras de NGF mostraron varios grados de diferenciación neuronal tal como se indica mediante neuritas que se alargan desde los cuerpos de células PC12. Se observó que la extensión de las neuritas era proporcional al número de espiras colocadas en los canales. Aquellos con un número bajo de espiras (segmento I; SI) mostraron una población mixta de células no diferenciadas redondas y algunas con neuritas (Figs. 10D-F), pero aquellas en las áreas de mayor número de vueltas (segmento II; SII) eran en su mayor parte células diferenciadas, con aparentemente extensiones similares a neuronas más largas (Figs. 10G-I). Para confirmar esta observación, se estimó la longitud de las neuritas en células diferenciadas PC12 en ambas áreas, lo que reveló un número significativamente mayor de células diferenciadas PC12 en la región SII (87±14,6 µm) en comparación con el de en el área SI (55,76 ± 12,53 µm; $p<0{,}005$). Estos dos eran, a su vez, significativamente diferentes del observado en espiras de liberación de BSA (9,31 ± 1,94 µm; $p<0{,}0001$.) Véanse las Figs. 10J y 10K.

Imágenes de DIC y fluorescentes de células PC12 cultivadas en microcanales de agarosa llenos de colágeno en los que fibras de liberación de BSA (Figs. 10A-C; control) o NGF (Figs. 10D-I) estaban enrolladas sobre la pared. Las PC12 permanecieron no diferenciadas en el grupo CTR (cabezas de flecha), pero se extendieron en aquellas que liberaban NGF (flechas) y eran más abundantes en áreas bajo un mayor número de vueltas (SII) en comparación con áreas con un menor número de vueltas (SI). La Fig. 10J muestra la cuantificación de la longitud de neuritas de PC12 diferenciadas. La Fig. 10K muestra la curva de calibración de la longitud de neuritas de células PC12

expuestas a niveles variables de NGF. La regresión lineal superpuesta muestra valores de concentración de NGF correspondientes a un número bajo (SI) y alto (SII) de espiras de fibra en los microcanales. * = p<0,0001 en comparación con CTR; + = p<0,005 en comparación con SI (n=6).

Estas observaciones indicaron que las espiras poliméricas podían liberar NGF biológicamente activo en la matriz luminal de colágeno, formando un gradiente en el que pueden establecerse áreas de concentraciones bajas (SI) y altas (SII). Esta noción se respaldó mediante la cuantificación de la liberación de proteína desde las regiones SI y SII de espiras eluyendo las espiras de liberación de BSA ELISA colocadas en los microcanales de TMM de agarosa a lo largo de 24 h, confirmando una concentración diferencial del 50% menos en el área SI en comparación con la de SII (véase la Fig. 11). La concentración de NGF biológicamente activo en las áreas de microcanal SI y SII *in situ* se evaluó entonces directamente usando PC12 como biosensores, ya que se conoce que su diferenciación es proporcionalmente lineal a la concentración de NGF. Se determinó la longitud de las neuritas de PC12 expuestas a un intervalo de concentración de NGF de 10-100 ng/ml. Se determinó adicionalmente que estas células se extendían desde 5 hasta 120 µm de longitud, correlacionándose linealmente con la concentración de NGF (R=0,96; véase la Fig. 10K). Entonces se usó una ecuación de regresión lineal estimada a partir de la curva de calibración de crecimiento de PC12 para determinar el NGF intraluminal (NGF=[(longitud de neuritas de PC12 +1,91)/(17,06)]). Usando esta fórmula se determinó que el crecimiento observado en las regiones de arrollamiento bajo (SI) y moderado (SII) de los microcanales de TMM correspondía a 40 y 83 ng/ml de NGF; respectivamente, lo que está estrechamente de acuerdo con las diferencias observadas con la liberación de proteína. La cuantificación de la liberación de BSA desde los microcanales de TMM muestra que un 40% de la BSA encapsulada se liberó desde el segmento II, en comparación con el 20% de liberación en SI tras 24 horas.

Modelización de la difusión de microgradiente de proteína

A continuación, se diseñó un modelo informático para predecir la cinética de difusión de NGF sobre el relleno luminal de colágeno de los microcanales de TMM. Se implementó un modelo de simulación informático en COMSOL que incorporaba los valores de coeficiente de difusión de proteínas de tamaño similar al NGF de la fibra polimérica a la luz del microcanal, tanto en agarosa como en colágeno, a lo largo de una distancia longitudinal de 10 mm según las dimensiones físicas reales del gel de TMM. Se estimó que la concentración de NGF en el volumen de microcanal (0,7 µl) a lo largo de 1, 5 y 7 días, y se comparó con aquellos patrones de distribución de espiras uniforme (U) y de gradiente (G) en sus superficies de pared. Como el coeficiente de difusión de proteína a través de colágeno al 0,1% luminal (7,6-12 m^2/s) es más rápido que el de a través de la estructura de microcanal de agarosa al 1,5% (2,31-14 m^2/s), la difusión se produce principalmente a través del eje de colágeno. Según el modelo, a los 7 días, fibras poliméricas en la configuración de espira U forman una concentración uniforme a lo largo del microcanal a aproximadamente 7 ng/ml, que se diluye hacia fuera cerca de las aberturas proximal y distal. Por el contrario, la configuración de espira G da como resultado un gradiente lineal que oscila entre 0,02-12,42 ng/ml hacia el extremo con un mayor número de vueltas y también se diluye hacia fuera cerca de los extremos. Además de las diferencias de concentración esperadas, el modelo predijo cambios a lo largo del tiempo que parecen significativos entre las dos configuraciones. La configuración U permanece estable a lo largo del tiempo con una zona de dilución cada vez mayor en el extremo de los canales.

Sin embargo, el despliegue G de las vueltas da como resultado una extensión del gradiente desde la concentración mayor a la menor a lo largo del tiempo. A pesar del efecto de dilución en el extremo del microcanal, la inclinación del gradiente en la configuración G no parece cambiar significativamente durante el periodo de simulación, proporcionando un gradiente de 0,02-12 ng/ml a una inclinación de 30 grados promedio (véase la Fig. 12).

La distribución uniforma de las vueltas da como resultado una difusión uniforme de NGF a través del microcanal a lo largo de 1-7 días con algo de dilución en los extremos. El despliegue diferencial de fibras enrolladas da como resultado un gradiente de concentración de NGF de 10-100 ng/ml con un ángulo inclinado de 22 grados, que aumenta y se expande a lo largo del tiempo para cubrir la mayoría del volumen del microcanal. Tal como se muestra en la Fig. 12, esta diferencia se acentúa cuando las concentraciones uniformes y de gradiente se comparan a lo largo del eje longitudinal.

En conjunto, los resultados confirmaron que números mayores de fibras enrolladas en las paredes de los microcanales de agarosa podían establecer gradientes moleculares lineales de factores de crecimiento biológicamente activos en la matriz luminal de colágeno que podían usarse para guiar quimiotácticamente el crecimiento axonal.

El crecimiento nervioso se potencia y se dirige mediante la administración de factor de crecimiento de gradiente tridimensional

Tras confirming que las espiras poliméricas que decoran la pared de los microcanales de hidrogel pueden producir un gradiente de factor de crecimiento sostenible, se sometió a prueba el efecto de espiras de elución de NGF sobre la regeneración nerviosa *in vitro* evaluando el número de fibras axónicas que se extendían desde los DRG neonatales colocados en un extremo del gel de TMM (Figs. 13A-F). Se compararon geles sin espiras (Fig. 13B) con aquellos con 7 giros y 14 giros uniformes de espira encapsulada de NGF. El grado del crecimiento axonal era

cualitativamente mejor en los geles sin espiras de NGF en comparación con los controles negativos, aunque el aumento en el número de axones no alcanzó una diferencia estadística. Sin embargo, la cuantificación de la longitud axonal aumentó significativamente (p<0,005; n = 4) en el grupo de vueltas de NGF más densas (1321 ± 51,71 µm; 9-15 giros de espira) en comparación con los grupos tanto sin factor de crecimiento (651,2 ± 40,40 µm) como de espiras de baja densidad (808,18 ± 55,57 µm; < 8 giros; figuras13E-F). Para confirmar el efecto beneficioso de los gradientes de NGF sobre a regeneración de neuronas sensoriales, se expuso un grupo independiente de DRG a condiciones o bien uniformes o bien de gradiente en las que la concentración de NGF se mantuvo constante a 18 ng/ml.

La Fig. 13A muestra imágenes de contraste de intensidad diferencial (DIC) del gel de TMM que muestran un microcanal moldeado lleno de colágeno y tras colocar un explante de DRG en un extremo de la luz. La espira de fibra de PDO está anclada en la agarosa y sobre las paredes del microcanal, lleno de aire para la visualización. Se muestran imágenes confocales del crecimiento axonal de los DRG inmunomarcados para la visualización de β-tubulina (verde) para geles de TMM: sin espiras (véase la Fig. 13B); menos de 9 espiras de las fibras cargadas con NGF (véase la Fig. 13C); y 9-15 espiras de las espiras de elución de NGF (véase la Fig. 13D). Se muestra la cuantificación: tanto para el número de axones (véase la Fig. 13 E); como para la longitud axonal de DRG (véase la Fig. 13F). La longitud axonal se midió usando el explorador de imágenes Zeiss LSM (versión 4.2.0.12). Había una diferencia significativa en la longitud de los procesos celulares en las diferentes áreas (* <0,001).

Para confirmar el efecto beneficioso de los gradientes de NGF sobre la regeneración de neuronas sensoriales, se expuso un grupo independiente de DRG a condiciones o bien uniformes (U) o de gradiente (G), en las que la concentración de NGF se mantuvo a 18 ng/ml. En comparación con el grupo de concentración uniforme (U) (Fig. 14A), aquellos con espiras dispuestas para establecer un gradiente (G) mostraron una regeneración axonal más robusta (Fig. 14B). La cuantificación de la longitud axonal confirmó que una ventaja de crecimiento significativa (p<0,05) de neuronas crecían a través de trayectorias llenas de colágeno, cilíndricas, complementadas con NGF en gradiente (1694 ± 100,1; n = 3), en comparación con aquellas que contenían una concentración de factor de crecimiento uniforme (1045 ± 81,33, n = 5; véase la Fig. 14C). La comparación directa de la longitud axonal observada en microcanales de DRG teñidos para la β-tubulina (verde) en condiciones uniformes o de NGF en gradiente, al tiempo que se mantiene la misma concentración, mostró un aumento significativo en la longitud axonal de neuronas que crecen hacia una concentración de NGF creciente. * p < 0,001, n = 3-5. Barra de escala = 100 µm.

Quimiotaxis axonal robusta hacia gradientes de NGF

Además del efecto de promover el crecimiento del NGF en gradiente en la elongación axonal de DRG, se observó que la elongación de neuritas en los grupos uniformes iba dirigida hacia las espiras sobre las paredes de los microcanales. De hecho, se observó que los axones en esos grupos seguían trayectorias ascendentes y descendentes a medida que crecían a través del colágeno (Fig. 15A). En fuerte contraste, los grupos en los que el gradiente de NGF se establecía hacia el extremo distal, mostraron un crecimiento lineal robusto, con los axones ignorando las vueltas a medida que se elongaban (Fig. 15B). La cuantificación del ángulo de crecimiento respaldó esta noción ya que los grupos uniformes mostraron un crecimiento direccional amplio que oscila entre +60 y -60º (Fig. 15C). A la inversa, aquellos presentados con un gradiente de NGF mostraron ángulos de crecimiento más dirigidos, que oscilan entre +30 y -30º (Fig. 15D).

Se cultivaron axones de DRG marcados con β-tubulina y se permitió que crecieron a través de una distribución uniforme de las espiras. El crecimiento axonal se orientó hacia las espiras cargadas con NGF. Véanse las Figs. 15 A y C. Sin embargo, tal como se muestra en las Figs. 15B y 15D a través de un gradiente distribución, el crecimiento axonal tiende a crecer en el centro del canal.

La razón de ángulo de giro del crecimiento axonal muestra ángulos agudos cerrados. La cuantificación del ángulo de giro se determinó como una razón de todos los axones presentes con respecto al número de los axones que giraron. Había una diferencia significativa en la razón de giro cuando se comparaba la distribución uniforme y de gradiente (* p<0,005). Para confirmar adicionalmente esta observación, se midió la razón de ángulo de giro y se determinó que el número de axones que realizaban giros intensos era significativamente mayor en el grupo uniforme en comparación con los que crecían hacia el gradiente de NGF (0,5368 ± 0,06321, n = 4; 0,1909 ± 0,03772, n = 3; p<0,005) respectivamente. La Fig. 16 muestra la razón de ángulo de giro observada comparativa de DRG expuestos a condiciones de NGF o bien uniformes (U) o bien de gradiente (G). En conjunto, estos datos muestran que puede conseguirse un entorno de crecimiento quimiotáctico intenso a través de la liberación de factores de crecimiento al colágeno luminal usando un gradiente de fibras poliméricas enrolladas.

Además, las células diana secretan factores de crecimiento que forman gradientes moleculares que sirven como señales de guía quimiotácticas para neuronas en desarrollo y adultas lesionadas durante la elongación axonal y el reconocimiento de dianas. Durante la búsqueda de trayectorias activas, los axones detectan gradientes de moléculas atractivas y repulsivas, que usan para orientar su crecimiento.

Según la presente divulgación, y tal como se establece anteriormente, se concibió un método *in vivo* reproducible para anclar fibras cargadas con proteína, preferiblemente fibras poliméricas, en la pared de conductos de hidrogel

multiluminales, tales como, por ejemplo, conductos nerviosos. Los aparatos, métodos y composiciones dados a conocer en el presente documento proporcionan un gradiente intraluminal sin ninguna obstrucción para los axones que se regeneran. Además, los presentes diseños sin altamente ajustables variando el número de giros de espira en cada área para proporcionar la inclinación de gradiente apropiada.

Las células en el cuerpo vivo migran, se diferencian y proliferan en respuesta a diversos gradientes de estímulos. El gradiente puede ser de naturaleza física o química. Los gradientes físicos incluyen, por ejemplo, un cambio gradual en las propiedades físicas, tales como la topología superficial, rigidez y porosidad del material. Por ejemplo, en el hueso, el tamaño de poro disminuye desde fuera hacia dentro. Este fenómeno permite que cambien las propiedades mecánicas, así como que la característica de gradiente permita la migración y diferenciación celulares. Los gradientes químicos, especialmente aquellos gradientes de moléculas biológicas son también muy importantes en todos los procesos celulares. Por ejemplo, la migración celular no solo depende de la concentración absoluta, sino también de la pendiente del gradiente. También se ha observado que la velocidad de las células migradas era mucho mayor cuando se comparaban el gradiente y la superficie uniforme. Factores tales como bFGF se han inmovilizado en una orientación de gradiente sobre un hidrogel para investigar el efecto de este gradiente sobre células de músculo liso aórticas. Se sabe que estas células se alinean y migran en la dirección del gradiente creciente. Se ha usado análisis teórico para predecir la velocidad de migración de células sobre un sustrato uniforme y de gradiente. Tales modelos predicen que la relación entre la velocidad y el gradiente es bifásica dependiente.

Según una variación, los modelos dados a conocer en el presente documento permiten la evaluación del rendimiento del sistema y aportan conocimiento sobre el mecanismo que afecta a la dosificación y liberación del gradiente. A pesar de todos los esfuerzos por reestablecer el gradiente, la mayoría de estas tecnologías actuales pertenecen a una superficie más plana, ignorando que las matrices tridimensionales imitan más estrechamente la situación *in vivo*. Variaciones de la presente divulgación proporcionan métodos para establecer el gradiente en 3D y pueden incorporar múltiples señales de gradiente, y pueden ajustarse de manera predecible, selectivamente, y de manera controlada basándose en el tipo de célula.

Según la presente divulgación, se ha establecido un gradiente de concentración bioactivo de NGF. El gradiente de NGF puede controlarse variando el número de giros de la fibra enrollada por un área seleccionada. Más específicamente, PC12 respondieron a la concentración de NGF extendiendo neuritas de una manera similar a la observada en NGF soluble. Además, el crecimiento y la orientación de DRG también se vieron influidos por la presencia de los gradientes. La metodología de gradiente descrita en el presente documento permite la encapsulación de cualquier proteína para seleccionar como diana la célula de interés. La presente divulgación contempla el uso de los aparatos, métodos y composiciones dados a conocer con respecto a o bien reparación de huecos grandes en el sistema nervioso periférico o bien la guía axonal en la médula espinal lesionada.

Los métodos de formación de gradientes repetibles y programables dados a conocer en el presente documento tienen la capacidad de administrar de manera constante más agentes activos biológicos a un sitio deseado, tal como, por ejemplo, a un sitio de regeneración nerviosa con el propósito de guiar el crecimiento axonal. La concentración de gradiente puede controlarse mediante el número de giros (es decir, el paso) de la biofibra, o bien conductores o bien no conductores, que contienen el agente activo. Los métodos, aparatos y composiciones dados a conocer en el presente documento también pueden incorporarse a un aparato implantable para liberar agentes activos biológicos de una manera controlada en el tiempo o controlada en la calidad a través de difusión o estimulación eléctrica.

Por tanto, el gradiente controlado de los agentes activos (por ejemplo, productos químicos o sustancias biológicas, etc.) dado a conocer en el presente documento, puede aplicarse en la atracción y el guiado de la regeneración nerviosa tal como, por ejemplo, electrodos cocleares artificiales, en los que la administración controlada de sustancias tales como factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) pueden ser beneficiosas para atraer neuronas al electrodo y para preservar la viabilidad celular. También puede llevarse a cabo la administración farmacológica de agentes, en la que el gradiente de concentración es crítico para el efecto biológico. Este método es replicable y pueden conseguirse de manera predecible gradientes establecidos.

Más específicamente, en algunas variaciones, una pluralidad o secuencias de materiales de gradiente o matrices, tales como, por ejemplo, geles, etc. se apilan o se disponen de otra manera para proporcionar un gradiente. Los materiales de gradiente comprenden diferentes concentraciones de un agente terapéutico y por tanto pueden proporcionar un gradiente terapéutico. Los materiales de gradiente pueden tener cualquier combinación de propiedades terapéuticas u otras (tal como propiedades físicas) que no sean incompatibles con los objetivos de la presente invención y pueden usarse para modelar y/o recrear una variedad de entornos naturales, incluyendo entornos biológicos. Además, puede usarse cualquier número de geles. La Fig. 17 muestra un conducto 1700 que comprende tres secciones de material de gradiente 1702, 1704 y 1706, teniendo cada una diferentes concentraciones de un agente terapéutico, y estando dispuestas para formar un gradiente. Sin embargo, también es posible usar otros números de materiales de gradiente, tales como, por ejemplo, dos, cuatro, cinco o seis materiales de gradiente. En algunos casos pueden usarse más de seis materiales de gradiente. Tal como se muestra en la Fig. 17, la sección de material de gradiente 1702 tiene la concentración más alta; la sección 1704 está menos concentradas; y la sección 1706 es la menos concentrada.

Además, también se contemplan métodos de formación de un gradiente usando un componente biocompatible blando. Estos métodos pueden modificarse de diversas maneras para conseguir diversos objetivos. Además, tal como se describe en el presente documento, puede conseguirse la encapsulación de diversos factores mediante la inclusión de diversos portadores de micropartículas para formar un gradiente. Las variaciones contempladas incluyen micropartículas que se incorporan/suspenden en un gel (por ejemplo, un hidrogel, etc.) para proporcionar un gradiente terapéutico. La Fig. 18 ilustra una imagen de microscopio electrónico de barrido (SEM) de una composición según una variación, en la que se muestran micropartículas 1802 suspendidas en una matriz portadora 1802, tal como, por ejemplo, un gel tal como un hidrogel.

Además, en algunas variaciones, una pluralidad de materiales de gradiente o matrices, tales como, por ejemplo, geles que comprenden agentes activos, tales como, por ejemplo, agentes terapéuticos comprendiendo cada material preferiblemente una concentración variable de un agente activo, múltiples agentes activos, o concentraciones variables de múltiples agentes activos, pueden disponerse en una orientación para proporcionar una región de gradiente preseleccionada, predeterminada y predecible y, si se desea, una región no de gradiente.

Se han descrito diversas realizaciones de la presente invención en cumplimiento de los diversos objetivos de la invención. Debe reconocerse que estas realizaciones son meramente ilustrativas de los principios de la presente invención. Numerosas modificaciones y adaptaciones de las mismas resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

REIVINDICACIONES

1.- Una composición que comprende:

un material polimérico enrollado que comprende un agente activo que puede hacerse funcionar para difundir fuera del material polimérico cuando el material polimérico se dispone en un compartimento biológico, en la que la composición crea un gradiente del agente activo dentro del compartimento biológico.

2.- La composición según la reivindicación 1, en la que el material polimérico es biodegradable.

3.- La composición según la reivindicación 1, en la que el material polimérico comprende un poli(ácido láctico-co-glicólico), un poli(ácido láctico), una caprolactona, poli(p-dioxanona), o una combinación de los mismos.

4.- La composición según la reivindicación 1, en la que el gradiente del agente activo es a lo largo de un eje longitudinal del material polimérico enrollado.

5.- La composición según la reivindicación 1, en la que el material polimérico enrollado tiene un paso no uniforme.

6.- La composición según la reivindicación 1, en la que el material polimérico enrollado tiene un diámetro de fibra de entre 10 µm y 100 µm.

7.- La composición según la reivindicación 1, en la que el material polimérico enrollado tiene un diámetro externo de entre 50 µm y 1000 µm.

8.- La composición según la reivindicación 1 para su uso en la creación de un gradiente químico predeterminado, preseleccionado y controlado de manera predecible.

9.- La composición según la reivindicación 1 para su uso en la administración de un agente activo a un tejido.

10.- La composición según la reivindicación 9, en la que el tejido comprende tejido que requiere reparación.

11.- La composición según las reivindicaciones 9 o 10, en la que el tejido comprende un conducto nervioso.

12.- La composición según las reivindicaciones 9 a 11, en la que el agente activo comprende un fármaco, un péptido, una proteína, un factor de inhibición del crecimiento o un factor de promoción del crecimiento.

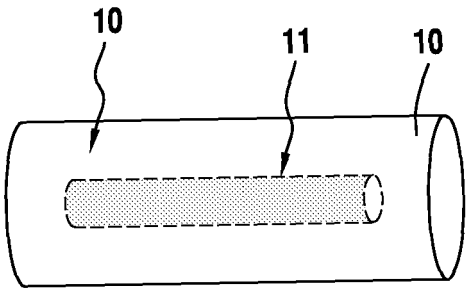

FIG. 1A

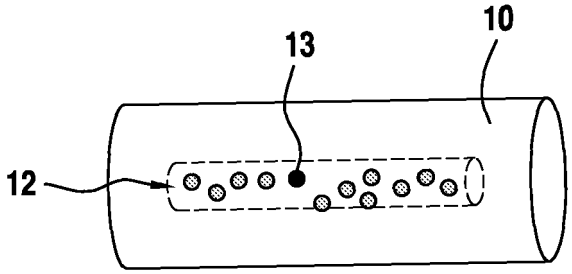

FIG. 1B

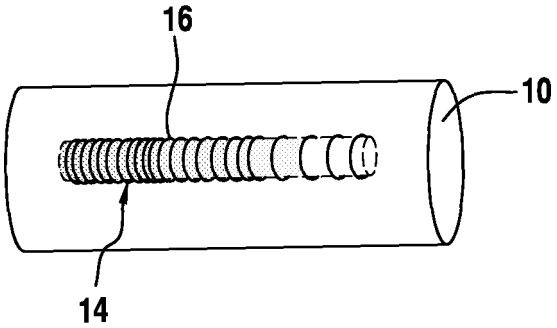

FIG. 1C

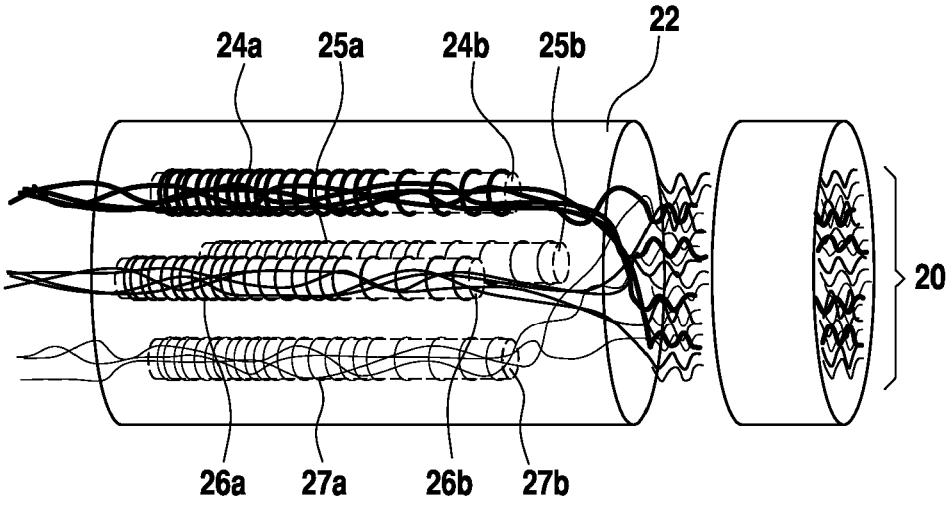
24a
25a
24b
25b
22
20
26a
27a
26b
27b

FIG. 2

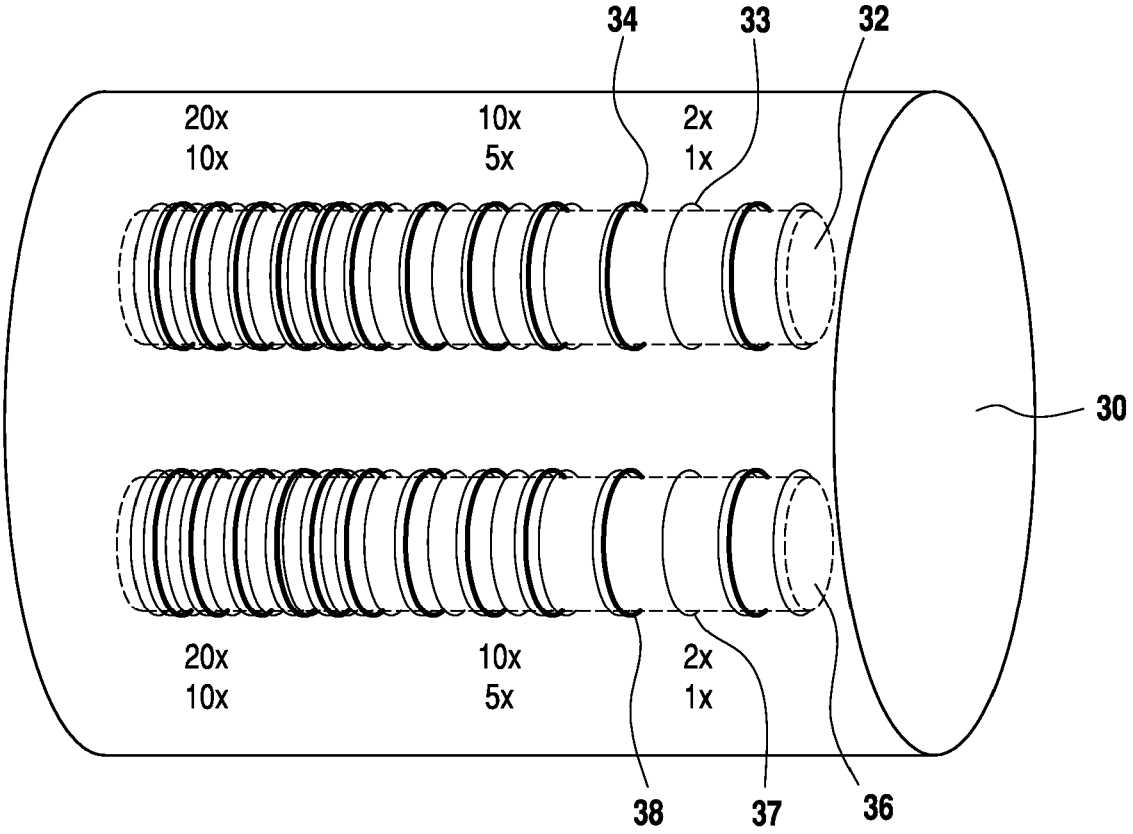
34
33
32
20x
10x
10x
5x
2x
1x
30
20x
10x
10x
5x
2x
1x
38
37
36

FIG. 3

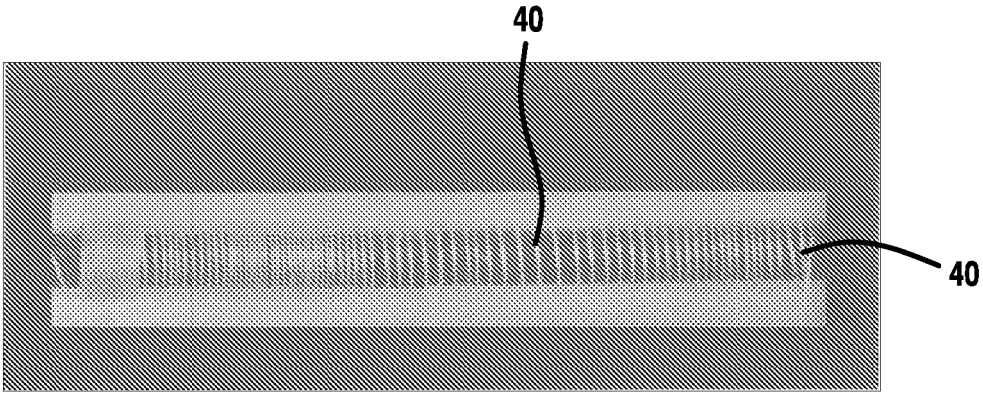

FIG. 4A

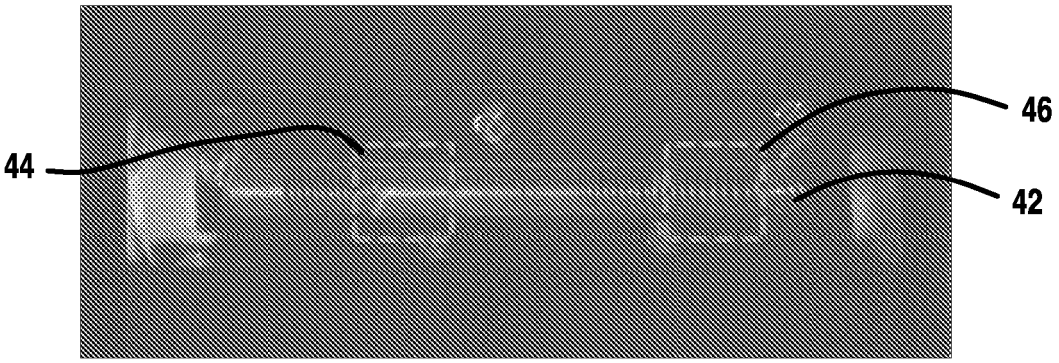

FIG. 4B

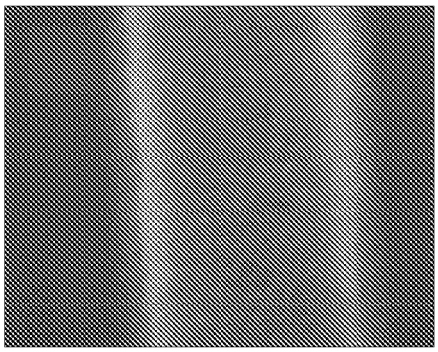

FIG. 4C

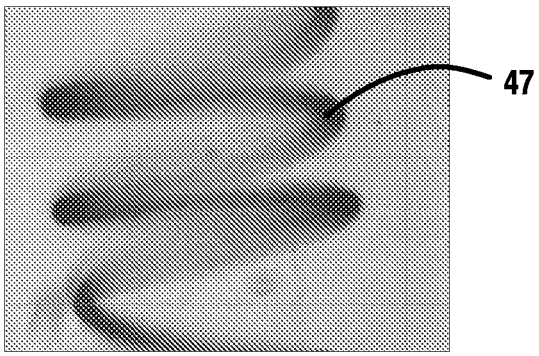

FIG. 4D

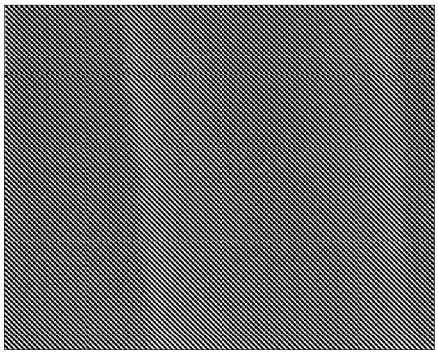

FIG. 4E

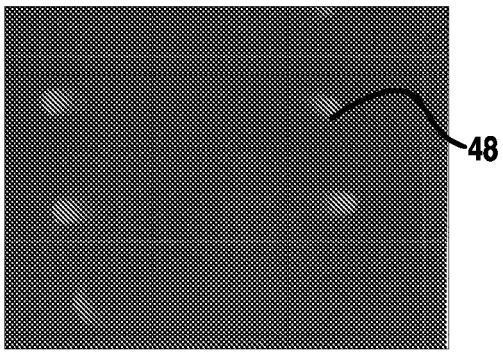

FIG. 4F

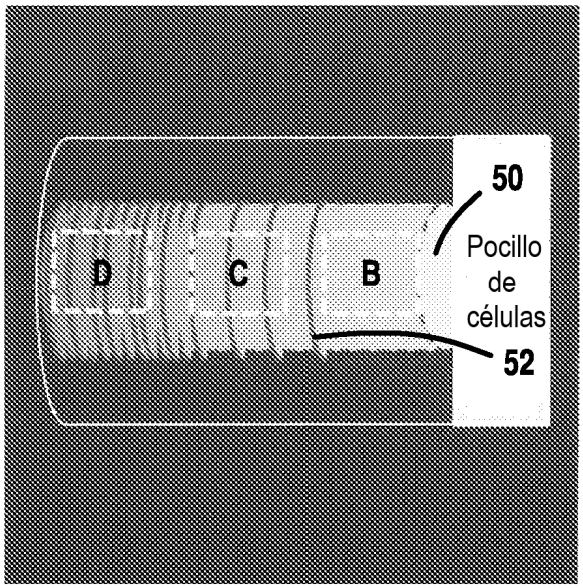

FIG. 5A

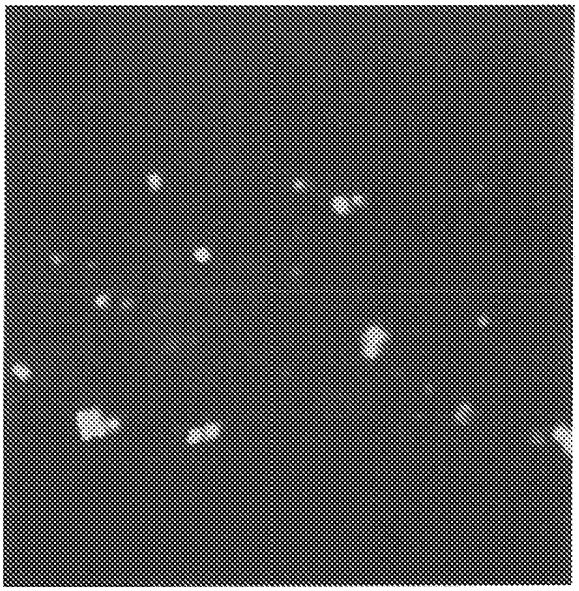

FIG. 5B

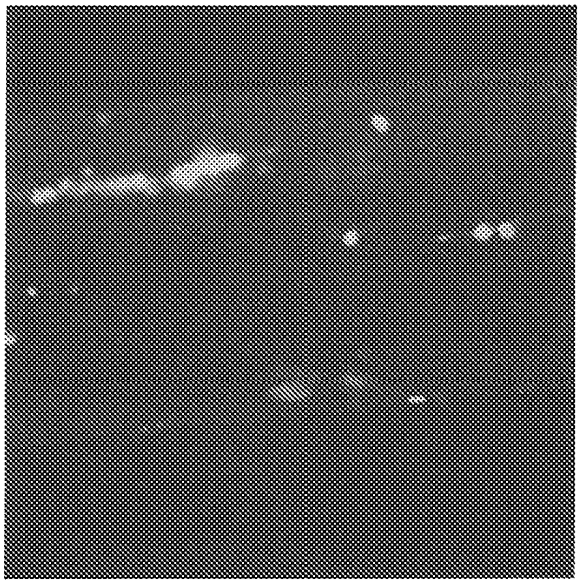

FIG. 5C

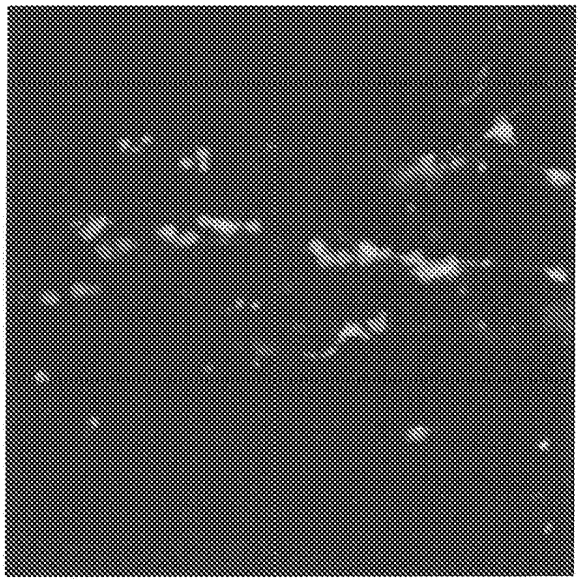

FIG. 5D

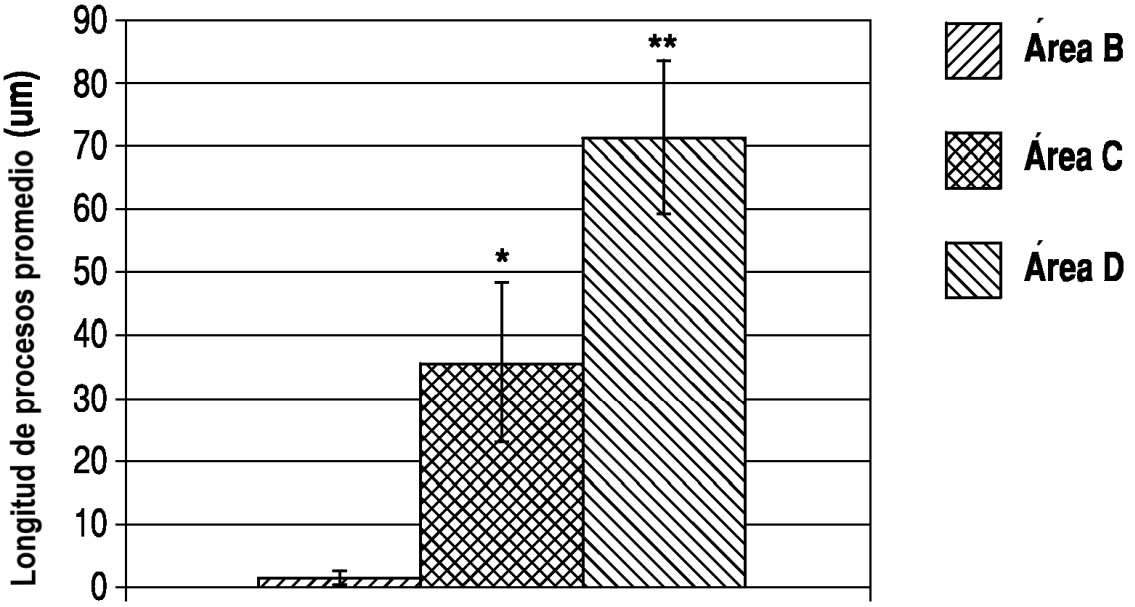
Longitud de procesos promedio (um)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
**
Área B
Área C
Área D

FIG. 6

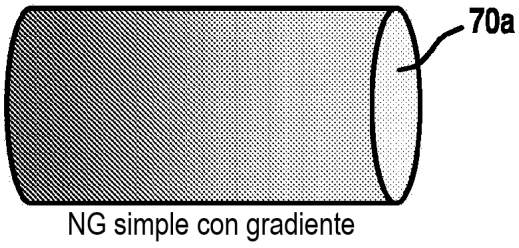

FIG. 7A

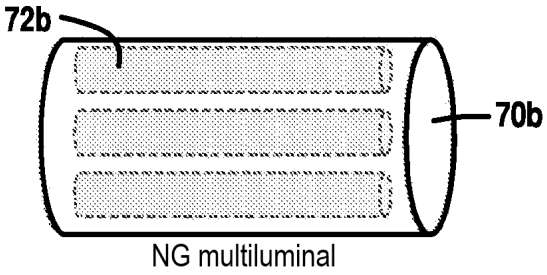

FIG. 7B

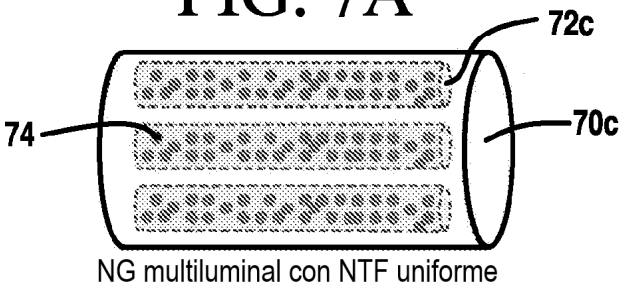

FIG. 7C

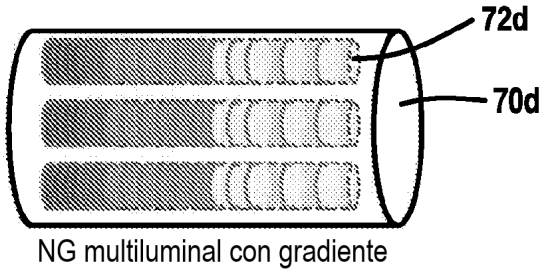

FIG. 7D

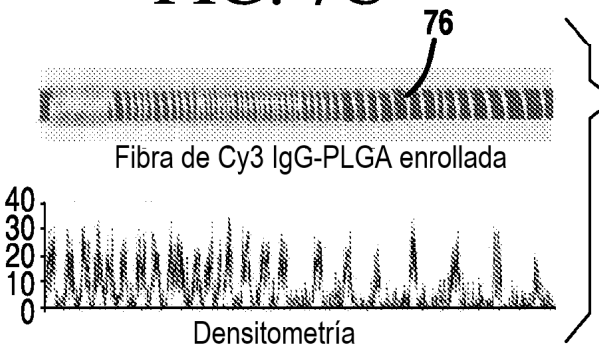

FIG. 7E

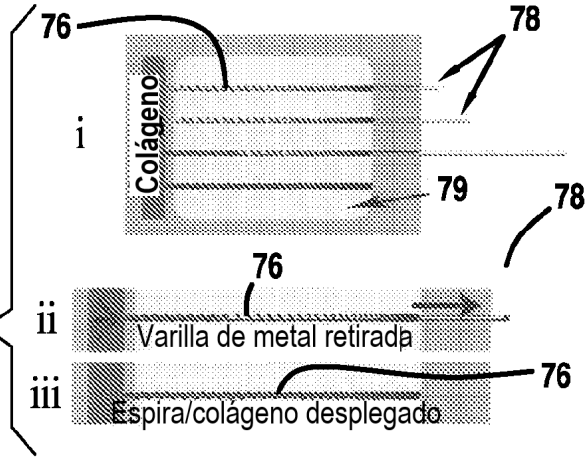

FIG. 7F

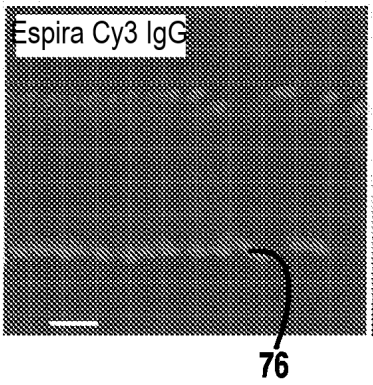

FIG. 7G

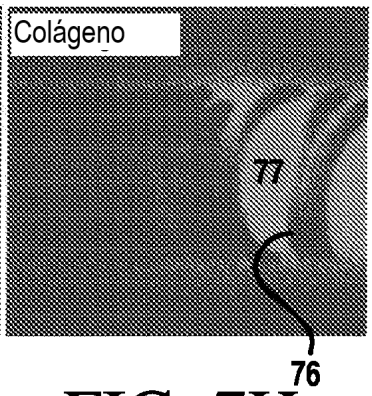

FIG. 7H

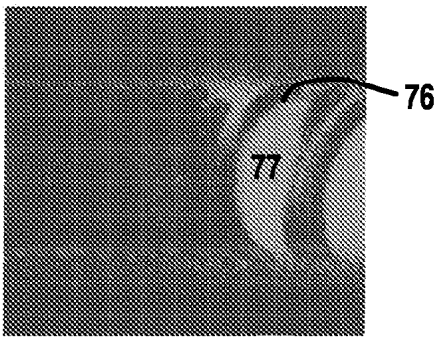

FIG. 7I

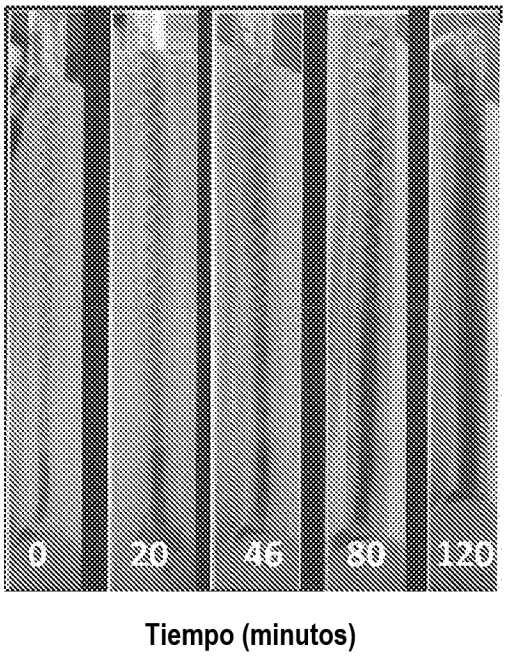

FIG. 8A

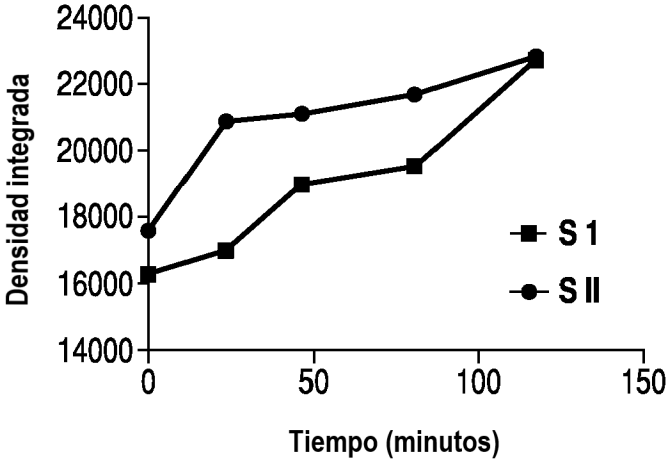

FIG. 8B

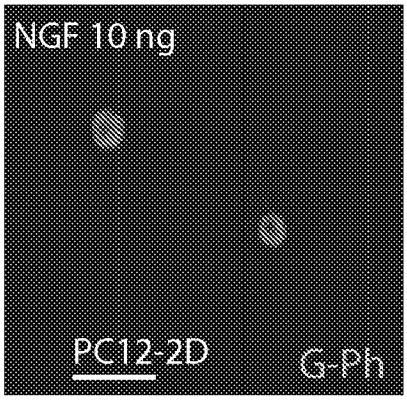

FIG. 9A

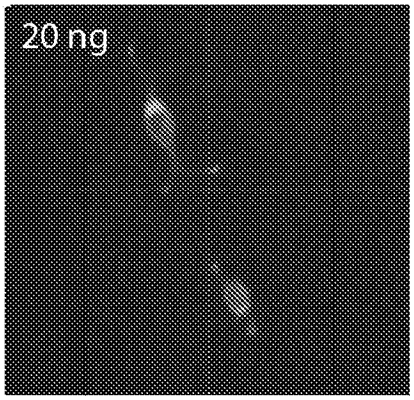

FIG. 9B

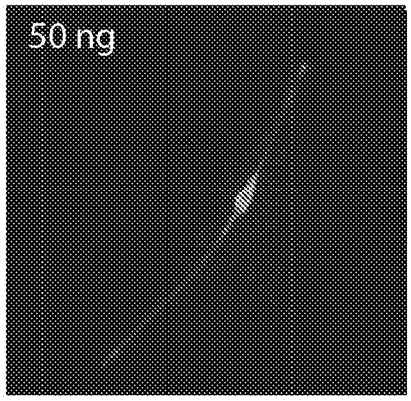

FIG. 9C

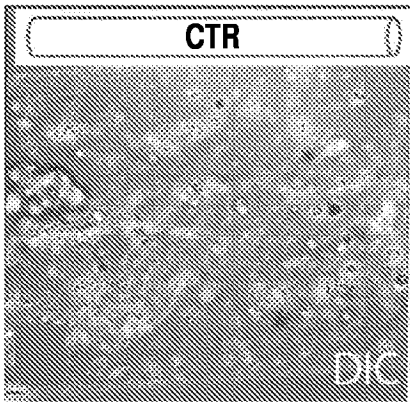

FIG. 10A

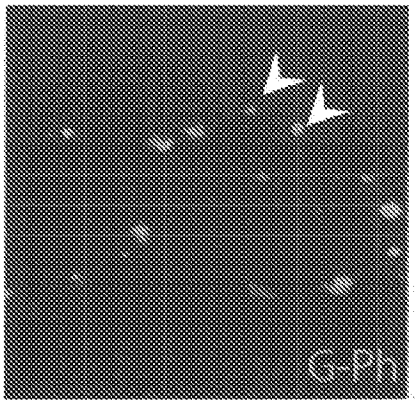

FIG. 10B

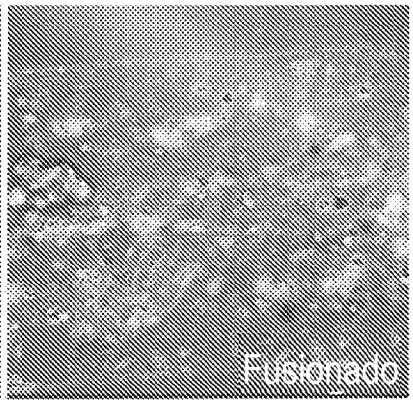

FIG. 10C

FIG. 10D

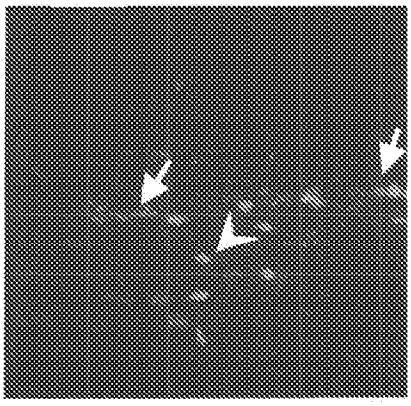

FIG. 10E

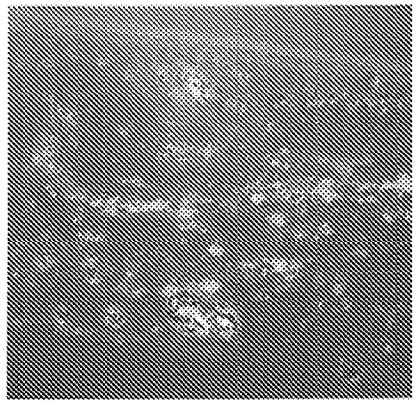

FIG. 10F

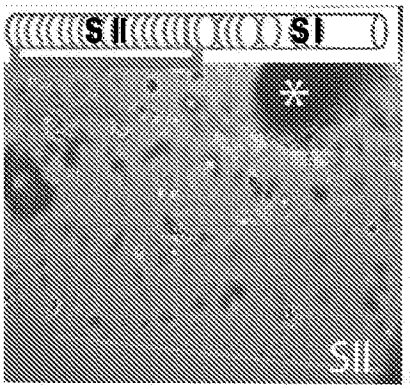

FIG. 10G

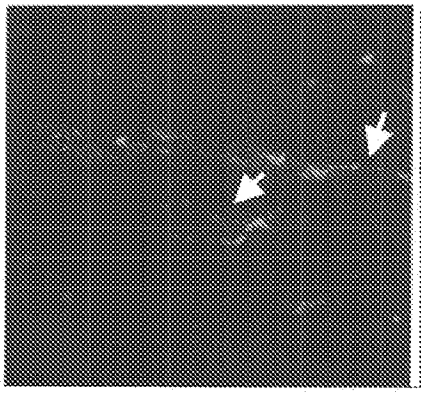

FIG. 10H

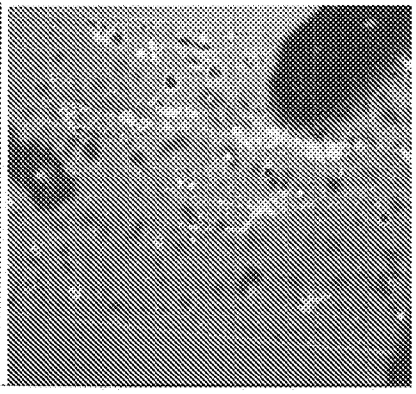

FIG. 10I

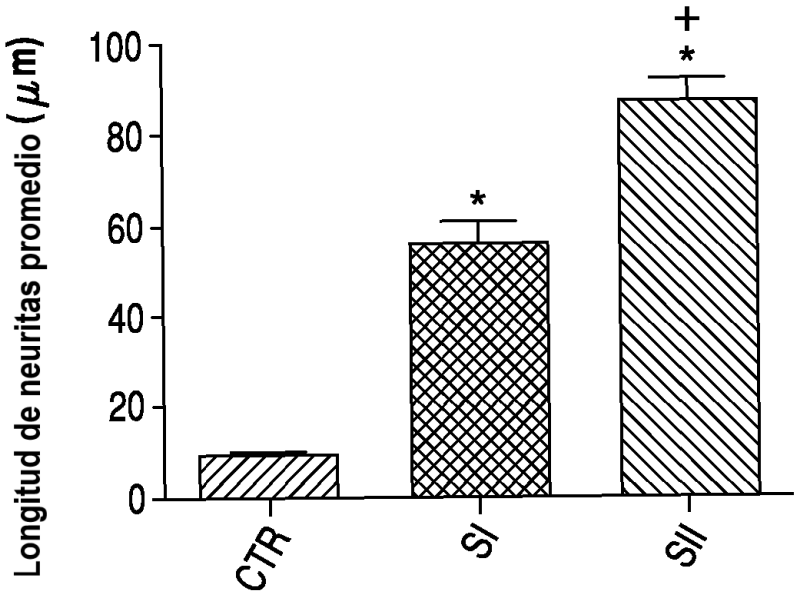

FIG. 10J

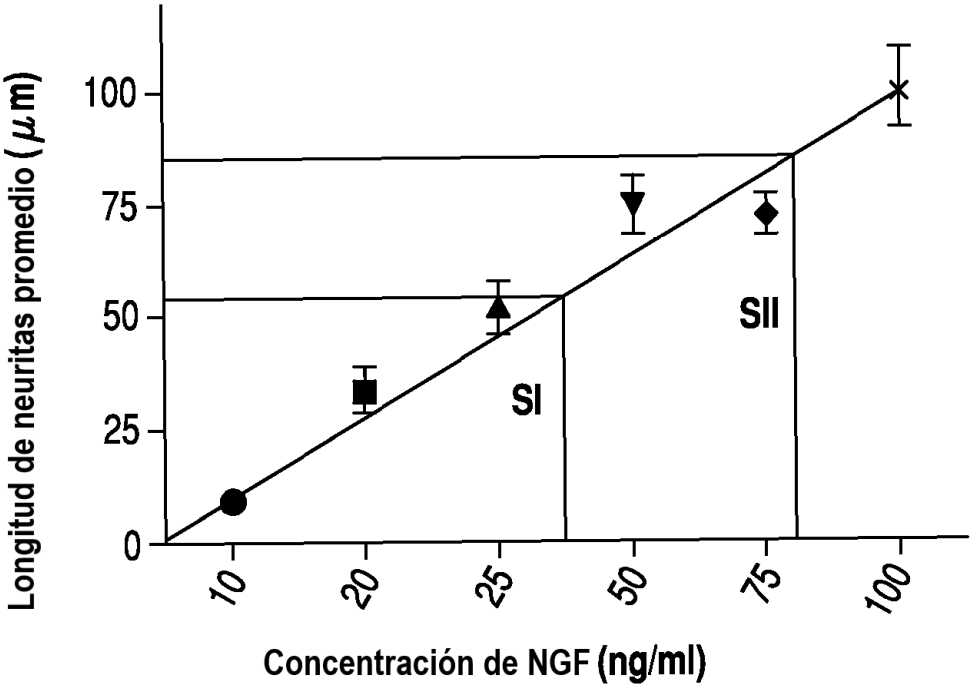

FIG. 10K

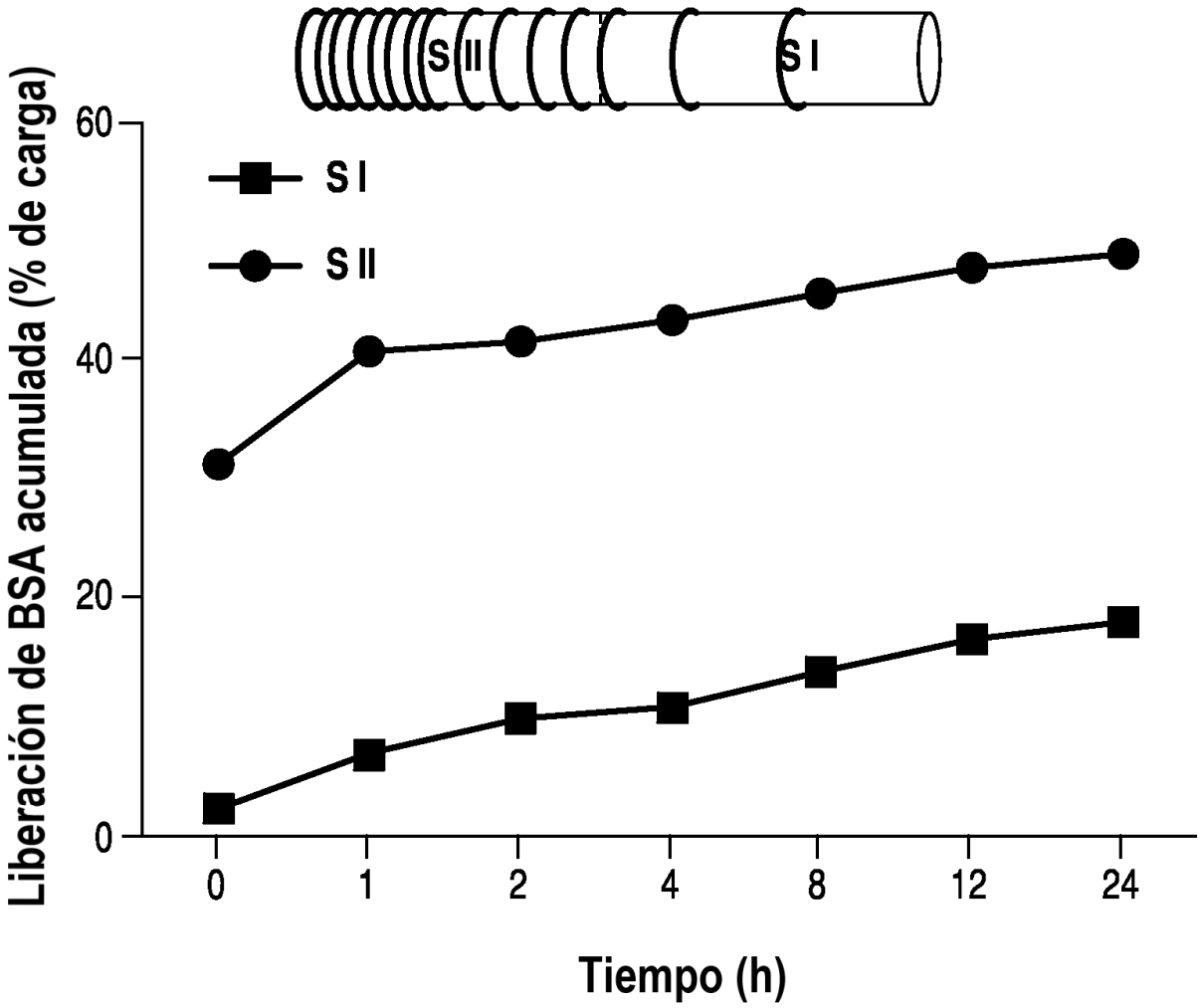
S II
S I
S I
S II
Liberación de BSA acumulada (% de carga)
60
40
20
0
0
1
2
4
8
12
24
Tiempo (h)

FIG. 11

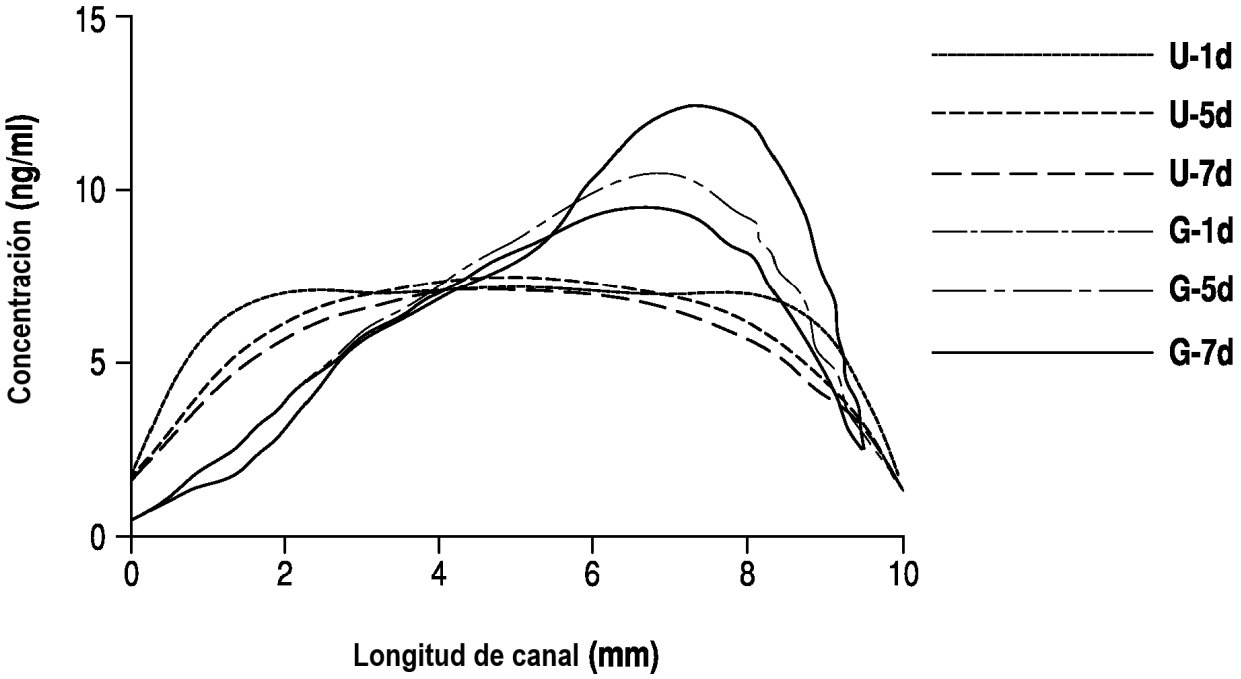
15
10
5
0
Concentración (ng/ml)
0
2
4
6
8
10
Longitud de canal (mm)
U-1d
U-5d
U-7d
G-1d
G-5d
G-7d

FIG. 12

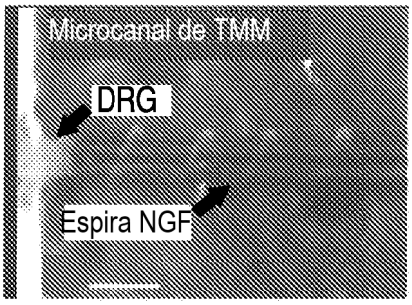

FIG. 13A

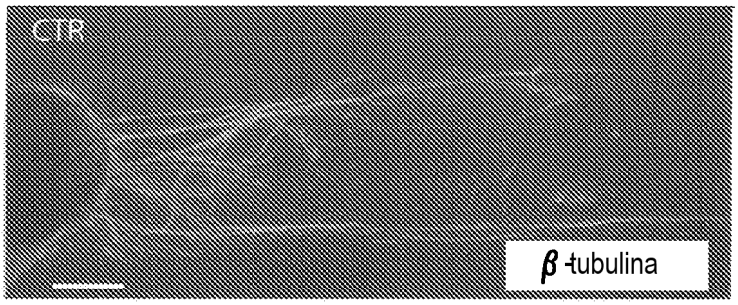

FIG. 13B

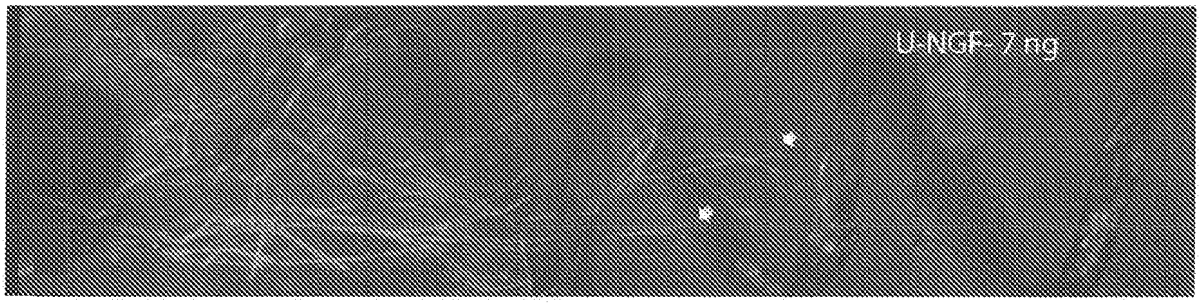

FIG. 13C

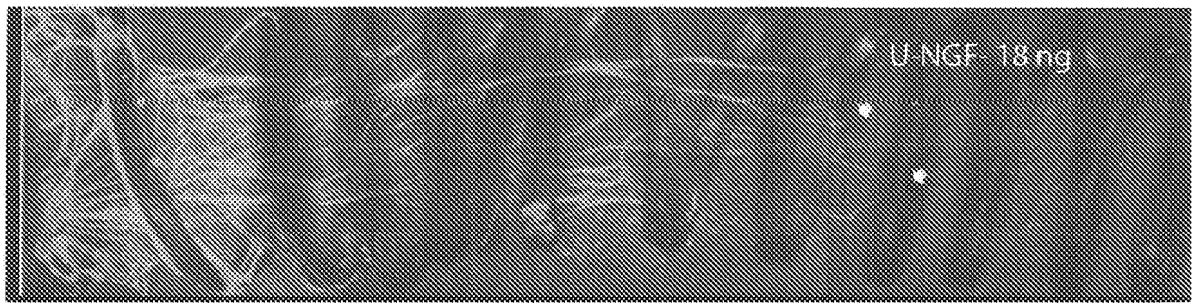

FIG. 13D

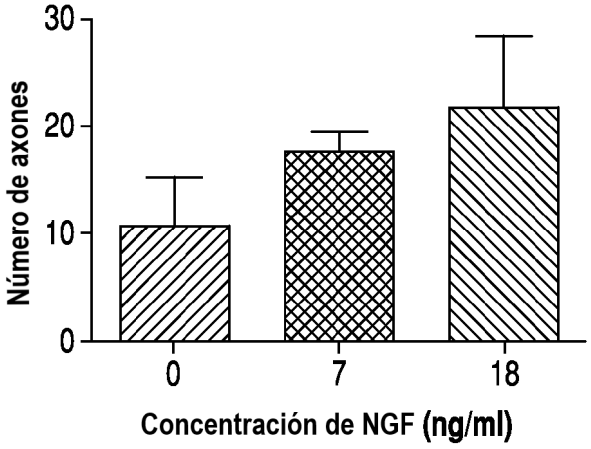

FIG. 13E

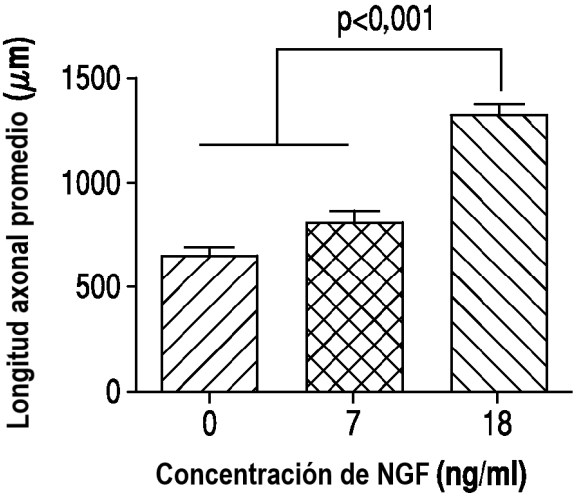

FIG. 13F

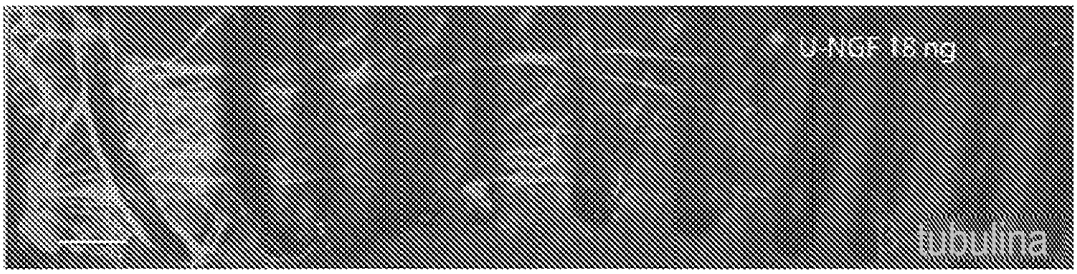

FIG. 14A

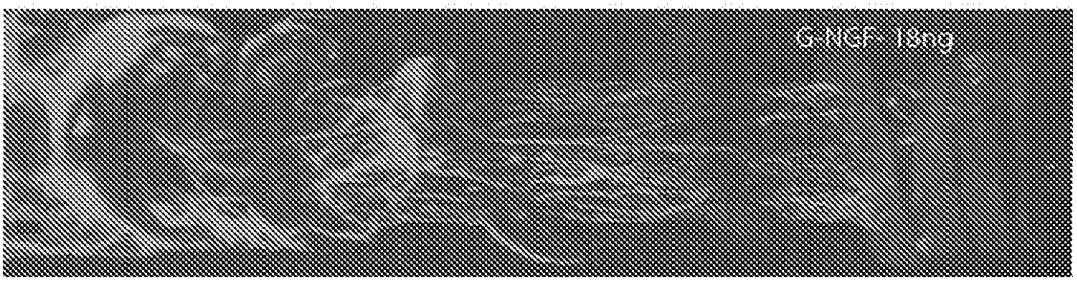

FIG. 14B

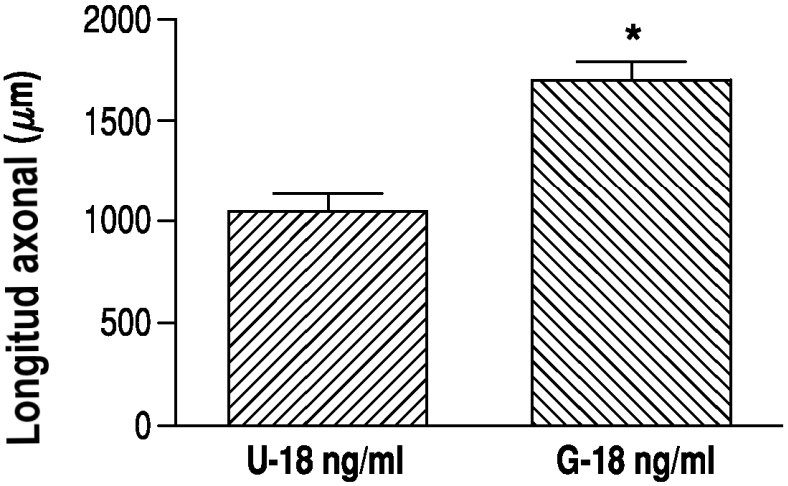

FIG. 14C

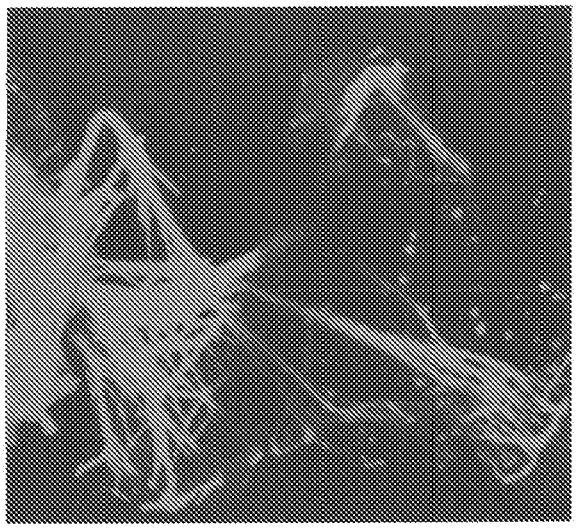

FIG. 15A

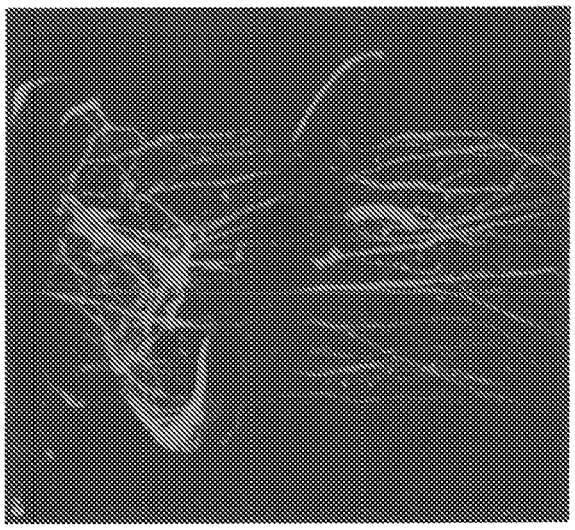

FIG. 15B

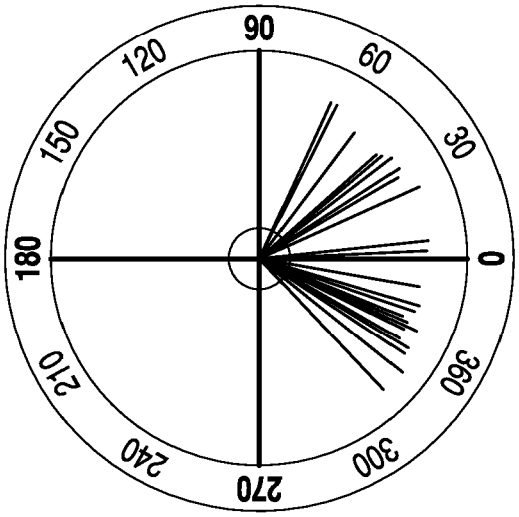

FIG. 15C

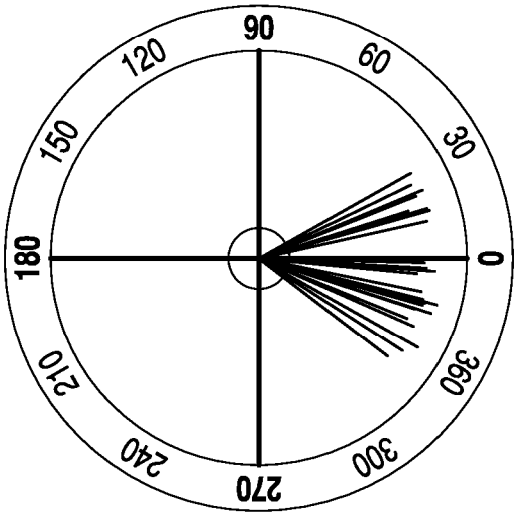

FIG. 15D

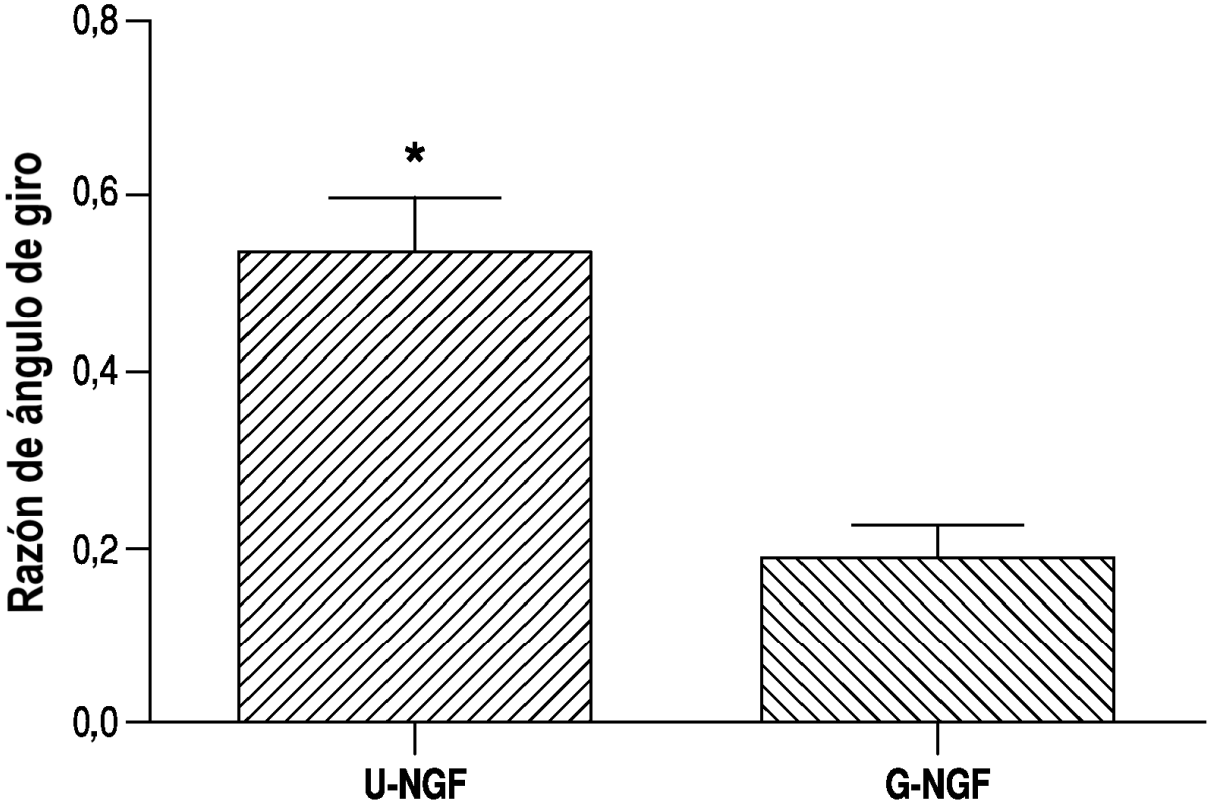

FIG. 16

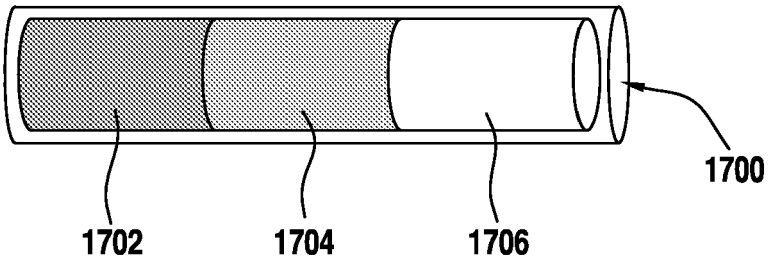

FIG. 17

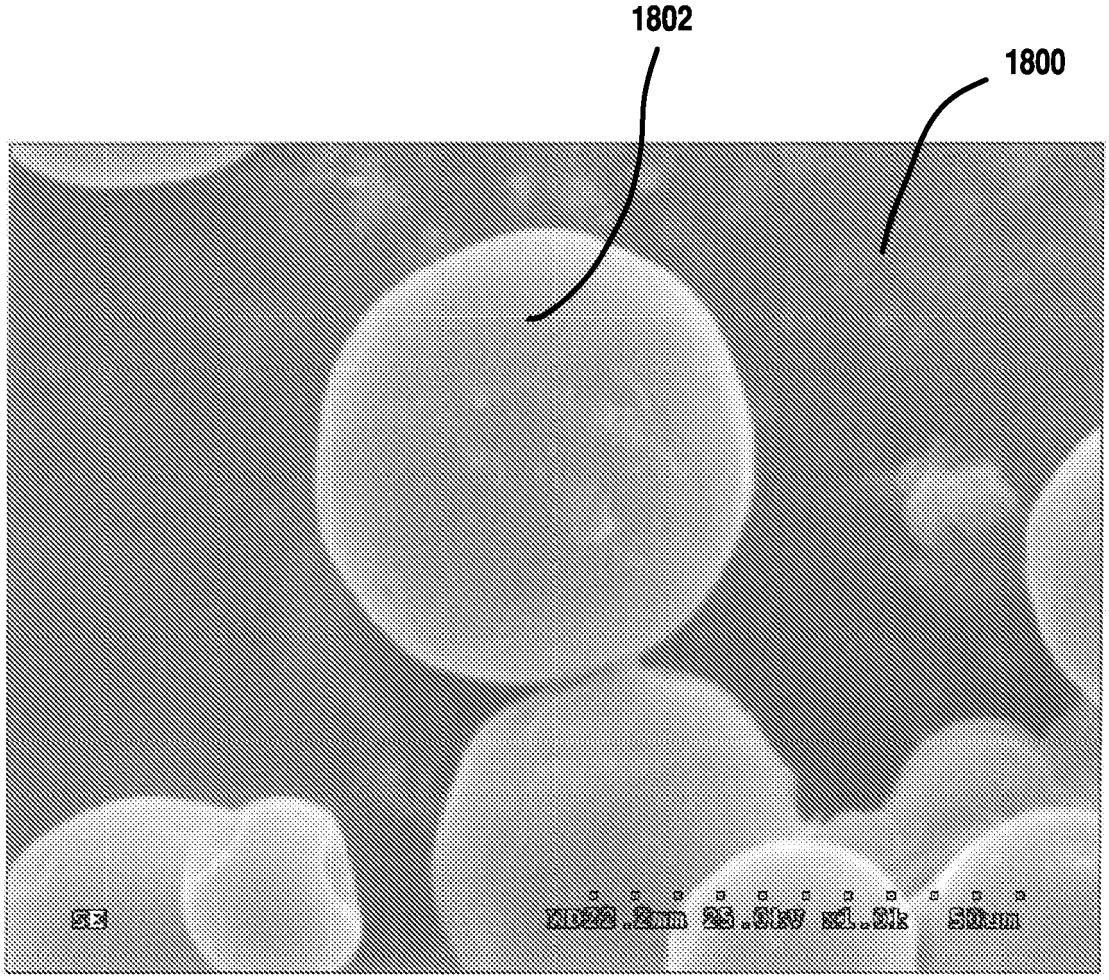

FIG. 18