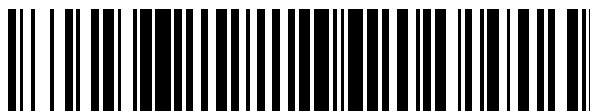


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 602**

51 Int. Cl.:

A61L 27/22 (2006.01)

A61K 38/39 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2013 PCT/AU2013/001435**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14089610**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2013 E 13863652 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2928512**

54 Título: **Fabricación de construcciones tridimensionales elásticas escalables**

30 Prioridad:

10.12.2012 AU 2012905409

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.03.2019

73 Titular/es:

**ALLERGAN PHARMACEUTICALS
INTERNATIONAL LIMITED (100.0%)
Clonshaugh Business & Technology Park
Dublin 17, D17 E400, IE**

72 Inventor/es:

**WEISS, ANTHONY STEVEN y
MITHIEUX, SUZANNE MARIE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 702 602 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

Fabricación de construcciones tridimensionales elásticas escalables

Campo de la invención

5 La invención se refiere a la producción de materiales elásticos a partir de tropoelastina, y especialmente a la formación de materiales con formas tridimensionales preferidas, y especialmente, aunque no exclusivamente, a materiales que pueden utilizarse para terapia y reparación de tejidos.

Antecedentes de la invención

10 La referencia a cualquiera de las técnicas anteriores en la especificación no es, ni debe interpretarse, como una admisión o como algún tipo de sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general común en Australia o en cualquier otra jurisdicción, o que esta técnica anterior pudiera de forma razonable esperarse que un experto en la técnica la haya determinado, entendido y considerado relevante.

15 Existe una demanda considerable y creciente de construcciones tridimensionales que puedan utilizarse para la reparación de tejidos humanos. Las construcciones basadas en biomateriales naturales (tales como la elastina) se han convertido en los principales candidatos para diversas aplicaciones de ingeniería de tejidos, debido a sus notables propiedades, que incluyen elasticidad, autoensamblado, estabilidad prolongada y actividad biológica.

La tropoelastina es el material de sustrato para la formación de elastina y de fibra elástica. La elastina se forma a partir de tropoelastina cuando esta última se reticula.

20 La tropoelastina es soluble en la mayor parte de soluciones acuosas, y es de hecho soluble en condiciones fisiológicas de concentración de sales y pH. Puede inducirse la precipitación de la tropoelastina a partir de una solución acuosa calentando una solución acuosa. El proceso se conoce como coacervación, en el que los monómeros de tropoelastina se asocian entre sí por el contacto de las regiones hidrófobas de un monómero de tropoelastina con las mismas regiones de otro monómero. Esta asociación de monómeros es reversible, y los monómeros de tropoelastina en tropoelastina coacervada pueden disociarse, por ejemplo mediante la modificación del pH, de la sal o de la temperatura, dando lugar a la disolución de monómeros de tropoelastina del coacervado en la solución y a la desaparición del coacervado. Esto quiere decir que un coacervado de tropoelastina no es lo suficientemente robusto para formar una estructura elástica tridimensional preferida que sea estable en condiciones fisiológicas.

25 La reticulación de monómeros de tropoelastina, sea en forma coacervada u otra, da lugar a una unión covalente de monómeros de tropoelastina que ostensiblemente representa una asociación de monómeros de tropoelastina que no pueden disociarse mediante el ajuste del pH, sal o temperatura. De forma general, los monómeros de tropoelastina reticulados, como los observados en la elastina y en fibra elástica, no pueden disociarse entre sí a menos que se hidrolicen los monómeros, como se describe en los procesos de la técnica anterior para la purificación de elastina a partir de fuentes naturales.

30 Dada la asociación generalmente irreversible de los monómeros de tropoelastina observada en la tropoelastina reticulada, como en la elastina o en la fibra elástica, se ha propuesto la reticulación de la tropoelastina como una solución para permitir la formación de estructuras elásticas tridimensionales preferidas. Ejemplos de esta tecnología se describen en Miyamoto y col. (2009), WO 2008/033847 y WO 2009/099570 por las cuales el material electrohilado se reticula en estructuras estables preferidas. Algunas de las tecnologías de reticulación requieren una etapa de calentamiento, por la cual se calienta una composición que contiene tropoelastina en la formación de una estructura elástica preferida. De forma general, la etapa de calentamiento es necesaria para evaporar el disolvente, y/o para proporcionar las condiciones de temperatura requeridas para la reacción de reticulación.

35 Un problema con los procesos que implican la reticulación es que los agentes de reticulación no sean biocompatibles en el contexto de la tolerancia del tejido a la química de los reticuladores, ni al reticulador residual sin reaccionar, ni a la función elástica del material reticulado. Otro problema es que es difícil formar una estructura preferida de material reticulado debido a que después de la reticulación, un material se solidifica rápidamente en un tipo de estructura que posteriormente no puede adaptarse a una forma robusta preferida. Por tanto existen limitaciones en cuanto al grado en que pueden utilizarse dichos procesos en la formación de estructuras mediante tecnologías de moldeo por pulverización y similares.

40 En último término, lo que se requiere para formar una estructura tridimensional estable preferida a partir de monómeros de tropoelastina es unir los monómeros entre sí de forma que se evite una disociación entre los mismos que pudiera dar lugar a la pérdida de la estructura o forma preferidas. Otro enfoque para formar una construcción tridimensional elástica estable es utilizar otras moléculas, que aparentemente actúan como enlazantes para la unión de un monómero de tropoelastina con otro. Los ejemplos incluyen en general polímeros sintéticos como se describe en WO 2009/099570. Otro enfoque es pulverizar o recubrir un sustrato insoluble en agua con una solución de monómeros elásticos solubles, como en WO 2012/080706, WO 2011/127478 y WO 2007/029913. En este último enfoque, el sustrato insoluble, tal como una red de nanofibras, como en WO 2007/029913, o un tubo, como en WO 2011/127478, enlaza aparentemente los monómeros de tropoelastina entre sí de forma que no se disocian en condiciones acuosas. El problema con estos enfoques es que inevitablemente es el sustrato insoluble el que proporciona la forma

tridimensional preferida, no los componentes moleculares, lo que afecta al perfil elástico general de la estructura, limitando la capacidad de formar estructuras tridimensionales. WO 2008/058323 describe un proceso para producir un material elástico a partir de tropoelastina que incluye el calentamiento a 37 °C de una solución de tropoelastina con un pH alcalino para formar un material elástico a partir de la tropoelastina en la solución. La tropoelastina está presente en una concentración de entre aproximadamente 10 mg/ml y 200 mg/ml

Son necesarios nuevos enfoques para la formación de estructuras tridimensionales elásticas.

La invención está definida por las reivindicaciones y pretende abordar, o al menos proporcionar una mejora a, una o más de las limitaciones, necesidades o problemas mencionados.

Sumario

- 10 Se proporciona un método para formar un material elástico, que incluye:
 - proporcionar una solución de monómeros de tropoelastina;
 - aplicar la solución a una superficie;
 - calentar la solución sobre la superficie a una temperatura suficiente para permitir que los monómeros de tropoelastina se unan entre sí para formar un material elástico que no se disocie en monómeros de tropoelastina cuando el material se pone en contacto con una solución acuosa,
- 15 formando de este modo el material elástico.
- Se proporciona un método para formar un material elástico que incluye:
 - proporcionar una solución de monómeros de tropoelastina;
 - aplicar la solución a una superficie;
- 20 - calentar la solución sobre la superficie a una temperatura dentro de un intervalo definido por un valor mínimo y un valor máximo;
- en donde el valor mínimo es una temperatura por encima de la cual los monómeros de tropoelastina se unen entre sí para formar un material que no se disocia en una solución acuosa; y
- en donde el valor máximo es una temperatura por encima de la cual se forma un material no elástico;
- 25 formando de este modo un material elástico.
- Se proporciona un material elástico formado mediante un método descrito anteriormente.
- Se proporciona un método para formar un hidrogel elástico, que incluye:
 - formar un material elástico según un método descrito anteriormente;
 - poner en contacto el material elástico con una solución acuosa.
- 30 Se proporciona un hidrogel elástico formado mediante un método descrito anteriormente.
- Se proporciona una construcción, implante o dispositivo que incluye un material elástico o hidrogel descrito anteriormente.
- Se proporcionan métodos y usos del material elástico, hidrogel, dispositivo, implante o construcción descritos anteriormente para reparar y/o restaurar tejidos biológicos, y para el uso del material elástico en aplicaciones de ensayo.
- 35 La presente invención se describirá ahora con mayor detalle con referencia a los ejemplos y figuras que la acompañan. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción que sigue tiene únicamente carácter ilustrativo y no debe interpretarse en modo alguno como una limitación de la generalidad de la invención según se define en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Solución de tropoelastina tratada con calor basada en agua A. Después de calentar a 160 °C B. Después de humedecer en PBS.

- 40 **Figura 2.** Solución de tropoelastina tratada con calor basada en HFP A. Después de calentar a 160 °C. B. Después de humedecer en PBS.

Figura 3. Solución de tropoelastina basada en etanol a 70 % A. Antes de calentar a 160 °C. B. Después de calentar a 160 °C. C. Vista lateral en PBS. D. Después de humedecer en PBS.

Figura 4. Solución de tropoelastina basada en HFP tratada con calor utilizada para recubrir los tubos. A. Después de calentar a 160 °C. B. Después de humedecer en PBS.

Figura 5. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de tropoelastina electrohilada tratada con calor. A. Después de calentar a 160 °C. B. Después de humedecer en PBS.

5 **Figura 6.** Imagen de microscopía electrónica de barrido de fibroblastos cultivados sobre tropoelastina electrohilada tratada con calor.

Figura 7. Imágenes de biopsias de piel teñidas con VVG que muestran la persistencia de la tropoelastina electrohilada tratada con calor.

10 **Figura 8.** Películas fabricadas a partir de una solución de tropoelastina tratada con calor basada en agua A) tras secar a 37 °C durante 16 h B) después de calentar adicionalmente a 160 °C durante 4 h.

Figura 9. Películas con micropatrones fabricadas a partir de una solución de tropoelastina basada en agua tratada con calor. Los patrones de ranuras tienen una profundidad de 500 nm y un ancho de 3,5 µm.

Figura 10. Cálculo de módulos a 0-105 % y extensión de 105-19 %.

Descripción detallada de las realizaciones

15 A continuación se hará una referencia en detalle a determinadas realizaciones de la invención. Aunque la invención se describirá junto con las realizaciones, se entenderá que la intención es no limitar la invención a dichas realizaciones. Por el contrario, la invención es tal como se define en las reivindicaciones.

20 Un experto en la técnica reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, que podrían utilizarse en la práctica de la presente invención según se define en las reivindicaciones. La presente invención no se limita en modo alguno a los métodos y materiales descritos.

25 El presente trabajo demuestra, por primera vez, que un material biocompatible que tenga propiedades deseables, tales como resistencia y elasticidad, puede sintetizarse mediante un proceso simple mediante el calentamiento de tropoelastina. Por tanto, la presente invención proporciona un modo fiable, escalable y económico de fabricar materiales elásticos tridimensionales biocompatibles. La invención es susceptible de una producción de alto rendimiento y utiliza proteína para producir una gama versátil de biomateriales (tales como láminas, tubos y fibras) que sean útiles en aplicaciones de ensayo terapéuticas e *in vitro*. Los materiales producidos por el proceso de la presente invención poseen las propiedades de elasticidad y resistencia que caracterizan a la elastina natural, pero desprovistos de los contaminantes químicos y de los subproductos tóxicos que frecuentemente se encuentran en, o están asociados a, las construcciones formadas a partir del uso de agentes de reticulación.

30 Las propiedades ventajosas de los materiales de la presente invención se explican a lo largo de la presente especificación y, en particular, se presentan en los ejemplos, que muestran que los materiales de la presente invención pueden elaborarse de forma simple mediante el calentamiento de una solución de tropoelastina, y que los materiales formados poseen las propiedades requeridas de biocompatibilidad, resistencia, resiliencia, unión a células e interacciones con la matriz extracelular que permiten su uso en aplicaciones de ingeniería de tejidos, así como en la construcción de ensayos *in vitro*.

40 Como se ha mencionado anteriormente, los esqueletos basados en biomateriales se han utilizado para aplicaciones de ingeniería de tejidos debido a su biocompatibilidad y a sus propiedades mecánicas. Sin embargo, los métodos de la técnica anterior para sintetizar las construcciones tridimensionales basadas en biomateriales son ineficientes, lentos y restringidos, y la alternativa, las tecnologías tradicionales de ingeniería de tejidos que requieren casi siempre el uso de métodos lentos y costosos (que pueden requerir semanas para producir una construcción), están de forma general limitadas en cuanto a la difusión a espesores de varios cientos de micras, y con frecuentes problemas de toxicidad de los componentes o de los subproductos que exigen el cumplimiento normativo.

Por lo tanto, se proporciona un método para formar un material elástico, que incluye:

- proporcionar una solución acuosa de monómeros de tropoelastina;

45 - aplicar la solución a una superficie;

- calentar la solución sobre la superficie a una temperatura suficiente para permitir que los monómeros de tropoelastina se unan entre sí para formar un material elástico que no se disocie en monómeros de tropoelastina cuando el material se pone en contacto con una solución acuosa,

formando de este modo el material elástico.

50 Un hallazgo importante de la invención es que la etapa de calentamiento permite la asociación de los monómeros de tropoelastina con una afinidad tal que los monómeros prácticamente no se disocian cuando el agregado se pone en

contacto con una solución acuosa. El calentamiento forma un agregado, masa o material elástico que es distinto de un coacervado en la medida en que no se disocia en monómeros individuales en condiciones fisiológicas, y distintos a la fibra elástica u otro material en el sentido de que no requiere la reticulación de monómeros con agentes de reticulación tóxicos tales como el glutaraldehído, ni el uso de un disolvente que tenga un pH básico, para mantenerse en una fase sólida, o para conservar la permanencia de la forma en donde se forma. La ventaja es que el proceso ensambla de forma más o menos permanente monómeros biocompatibles formando una estructura o forma permanente que pueden utilizarse en aplicaciones de tejidos sin problemas de toxicidad.

De forma típica la solución se calienta a una temperatura suficiente para permitir que los monómeros de tropoelastina se unan entre sí para formar un material elástico que no se disocie en monómeros de tropoelastina cuando el material se exponga a condiciones fisiológicas, especialmente en condiciones fisiológicas humanas. En particular, el agregado no se disocia en condiciones fisiológicas de temperatura y pH. De forma ventajosa, el agregado no se disocia en las siguientes condiciones de:

- temperatura (de aproximadamente 30 a aproximadamente 45 °C);
- sal (concentración de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 300 mM);
- pH (de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,0).

Por tanto, este material es adecuado para usar no únicamente en condiciones fisiológicas, sino también en otras aplicaciones, tales como en ensayos *in vitro*, en los que pueda exponerse a otras condiciones más exigentes. En particular, este material se consigue sin tener que realizar ninguna reticulación de los monómeros de tropoelastina y sin utilizar un esqueleto para unir los conjuntos del péptido de la misma.

El material formado mediante el proceso de la presente invención tiene una serie de ventajas. En primer lugar, los monómeros de tropoelastina permanecen unidos entre sí de modo que se conserva la forma tridimensional del material elástico formado a partir del agregado en un ambiente acuoso. En segundo lugar, las propiedades del material de partida que hace a la tropoelastina tan útil en aplicaciones de ingeniería de tejidos (por ejemplo, la elasticidad, resistencia, resiliencia y biocompatibilidad) se conservan en el producto final. En tercer lugar, aun cuando el agregado puede absorber agua en una solución acuosa para formar un hidrogel, al hacerlo, el agregado no se disocia, manteniendo así la estructura tridimensional del material elástico.

En una realización, la solución se calienta a una temperatura suficiente para permitir que los monómeros de tropoelastina se unan entre sí para formar un material elástico que no se disocie en monómeros de tropoelastina cuando el material entre en contacto con una solución acuosa que tenga un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,0. Como se utiliza en la presente memoria, una redacción que defina los límites de un intervalo de longitud, tales como por ejemplo “de 1 a 5” significa cualquier número entero de 1 a 5, es decir, 1, 2, 3, 4 y 5. En otras palabras, cualquier intervalo definido por dos números enteros mencionados explícitamente pretende incluir y describir cualquier número entero que defina dichos límites y cualquier número entero incluido en dicho intervalo. Por ejemplo, la solución puede tener un pH de aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,7, aproximadamente 6,8, aproximadamente 6,9, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,1, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,4, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,6, aproximadamente 7,7, aproximadamente 7,8, aproximadamente 7,9, o aproximadamente 8,0.

En una realización, la solución se calienta a una temperatura suficiente para permitir que los monómeros de tropoelastina se unan entre sí para formar un material elástico que no se disocie en monómeros de tropoelastina cuando el material se pone en contacto con una solución acuosa que tenga una temperatura de aproximadamente 30 a aproximadamente 45 °C. Por ejemplo, la temperatura puede ser de aproximadamente 31 °C, aproximadamente 32 °C, aproximadamente 33 °C, aproximadamente 34 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 36 °C, aproximadamente 37 °C, aproximadamente 38 °C, aproximadamente 39 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 41 °C, aproximadamente 42 °C, aproximadamente 43 °C, aproximadamente 44 °C, o aproximadamente 45 °C.

En una realización, la solución se calienta a una temperatura suficiente para permitir que los monómeros de tropoelastina se unan entre sí para formar un material elástico que no se disocie en monómeros de tropoelastina cuando el material se pone en contacto con una solución acuosa que tiene una concentración de sal de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 300 mM. Por ejemplo, la concentración de sal puede ser de aproximadamente 75 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 85 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 95 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 110 mM, aproximadamente 120 mM, aproximadamente 130 mM, aproximadamente 140 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 160 mM, aproximadamente 170 mM, aproximadamente 180 mM, aproximadamente 190 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 210 mM, aproximadamente 220 mM, aproximadamente 230 mM, aproximadamente 240 mM, aproximadamente 250 mM, aproximadamente 260 mM, aproximadamente 270 mM, aproximadamente 280 mM, aproximadamente 290 mM, o aproximadamente 300 mM.

En una realización, la solución se calienta a una temperatura suficiente para permitir que los monómeros de tropoelastina se unan entre sí para formar un material elástico que no se disocie en monómeros de tropoelastina cuando se expone el material a condiciones fisiológicas (p. ej., pH de entre aproximadamente 7,2 y aproximadamente 7,5, una temperatura de entre aproximadamente 36 y aproximadamente 37 °C, y una concentración de sal de aproximadamente 150 mM).

De acuerdo con el proceso, la solución se calienta para formar el material elástico de la presente invención. Como se ha explicado anteriormente, el propósito de la etapa de calentamiento es formar un material que contiene monómeros de tropoelastina asociados, más específicamente, permitir que los monómeros de tropoelastina se unan entre sí para formar un material elástico que no se disocie en monómeros de tropoelastina cuando el material elástico se pone en contacto con una solución acuosa. La etapa de calentamiento se lleva a cabo a una temperatura suficiente para permitir que los monómeros de tropoelastina en el concentrado se unan entre sí para formar un agregado o material que incluya monómeros de tropoelastina. De forma típica, el calentamiento se llevará a cabo a una temperatura de aproximadamente 100 °C o superior, por ejemplo, de 100 °C a 160 °C. Por ejemplo, la temperatura de la etapa de calentamiento puede ser 110 °C o superior, 120 °C o superior, 130 °C o superior, 140 °C o superior, 150 °C o superior, 160 °C o superior, 170 °C o superior, o 180 °C o superior. Preferiblemente, la temperatura está entre aproximadamente 120 °C y aproximadamente 180 °C, entre aproximadamente 130 °C y aproximadamente 170 °C, o entre aproximadamente 140 °C y aproximadamente 160 °C. Con máxima preferencia, la temperatura es aproximadamente 160 °C.

Se proporciona un método para formar un material elástico que incluye:

- proporcionar una solución de monómeros de tropoelastina;

- aplicar la solución a una superficie;

- calentar la solución sobre la superficie a una temperatura dentro de un intervalo definido por un valor mínimo y un valor máximo;

en donde el valor mínimo es una temperatura por encima de la cual los monómeros de tropoelastina se unen entre sí para formar un material que no se disocia en una solución acuosa; y

en donde el valor máximo es una temperatura por encima de la cual se forma un material no elástico.

Según la realización, el material elástico de la invención no se forma por debajo del valor mínimo. Esto equivale a decir que lo que se forma es disociable en solución acuosa, especialmente en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, por debajo del valor mínimo, puede formarse algo que se parece más a un coacervado. Por debajo del valor máximo, el material retiene las propiedades elásticas descritas en la presente memoria. Por encima del valor máximo, el material puede perder propiedades de elasticidad.

Los períodos de tiempo adecuados en los que debe llevarse a cabo el calentamiento de la solución incluyen aproximadamente 10 minutos o más, aproximadamente 20 minutos o más, aproximadamente 30 minutos o más, aproximadamente 40 minutos o más, aproximadamente 50 minutos o más, aproximadamente 1 hora o más, aproximadamente 2 horas o más, aproximadamente 3 horas o más, aproximadamente 4 horas o más, o aproximadamente 5 horas o más. Sin embargo, un experto en la técnica entenderá que la temperatura a la que debe calentarse la solución, así como el tiempo durante el cual debe calentarse la solución, variarán dependiendo de diversos factores, tales como:

- el tipo de método de calentamiento empleado (por ejemplo, calentamiento en seco, calentamiento instantáneo, etc.);
- la concentración de monómeros de tropoelastina en la solución;
- el volumen de la solución;
- la composición de los monómeros de tropoelastina;
- el grado de asociación deseado en el agregado o en el material elástico;
- la humedad relativa durante el calentamiento.

En determinadas realizaciones, puede utilizarse el calentamiento de 8 a 16 horas para proporcionar una sustancia que sea más cristalina y que no obstante conserve propiedades elásticas.

En general, la humedad durante el calentamiento puede ser de aproximadamente 20 a aproximadamente 80 %, preferiblemente una humedad relativa de aproximadamente 35, 45, 55, 65 o 75 %.

Como se describe en la presente memoria, la etapa de calentamiento puede dar lugar a la formación de un material elástico que desarrolla un cambio de color. Por ello, en ciertas realizaciones, puede probarse la formación de un material elástico o comprobarse el completado de la etapa de calentamiento, determinando si el material ha desarrollado un cambio de color. Un cambio de color es de forma general un cambio de un aspecto normal traslúcido de la elastina a un color que puede ser amarillo o parduzco. No es necesario que todo el material desarrolle un cambio de color. En general, el cambio de color puede reducirse en el material elástico mediante hidratación.

Un experto en la técnica también será consciente de que al utilizar distintos métodos de calentamiento, pueden obtenerse agregados con distintas estructuras internas. Por ejemplo, el calentamiento instantáneo implicaría someter el concentrado a una fuente intensa de calor únicamente durante un periodo de tiempo muy limitado. Por tanto, el

calentamiento se producirá durante un tiempo suficiente para asociar los monómeros para formar el agregado, pero será demasiado rápido para que todo el disolvente atrapado en el agregado se evapore del agregado, formando así un agregado que tiene una estructura de tipo vacuola. Además, el agregado podría calentarse de nuevo de modo que el disolvente atrapado se evapore, forzándose así que las vacuolas se expandan, y dando lugar la formación de un agregado poroso. El experto en la técnica será también consciente de que el disolvente puede no estar presente internamente en el agregado, pero puede estar presente en la superficie externa del agregado (además de, o como alternativa a, que el disolvente esté presente dentro del agregado).

Una ventaja especialmente importante del proceso es que en determinadas realizaciones el material formado por el proceso puede ser ostensiblemente impermeable a los gases, como resultado de una estrecha alineación de las moléculas de proteína, que se conserva mediante la etapa de calentamiento. Esto permite soplar el material para obtener una forma particular, de modo muy similar a lo que ocurre en las técnicas de soplado de vidrio.

Independientemente del método de calentamiento utilizado, un experto en la técnica entenderá que el agregado formado mediante el calentamiento de la solución puede incluir por tanto agua en grados variables. Por ejemplo, el agregado puede incluir una cantidad significativa de agua (por ejemplo, más de aproximadamente 60 % p/p de agua), siendo prácticamente un hidrogel. De forma alternativa, el agua puede estar presente en el agregado en una cantidad de tan solo aproximadamente 10 % p/p. Dado que el contenido de agua influye en la elasticidad, es posible variar la elasticidad del agregado (y por tanto del material) variando el contenido de agua del agregado que, a su vez, puede variar cambiando diversos factores tales como la cantidad de agua presente en el concentrado antes del calentamiento, así como el tiempo, el método y la temperatura de calentamiento.

En una realización, el material elástico tiene un contenido de disolvente mayor que de aproximadamente 0 a aproximadamente 50 % (p/p) del material al completar la etapa de calentamiento. Por ejemplo, el material elástico puede tener un contenido en disolvente de aproximadamente 0,5 % (p/p), aproximadamente 1 % (p/p), aproximadamente 2 % (p/p), aproximadamente 3 % (p/p), aproximadamente 4 % (p/p), aproximadamente 5 % (p/p), aproximadamente 10 % (p/p), aproximadamente 15 % (p/p), aproximadamente 20 % (p/p), aproximadamente 25 % (p/p), aproximadamente 30 % (p/p), aproximadamente 35 % (p/p), aproximadamente 40 % (p/p), aproximadamente 45 % (p/p), o aproximadamente 50 % (p/p). En una realización, el disolvente es agua.

La solución puede calentarse calentando directamente la solución o calentando la superficie sobre la cual se pone la solución. En la última realización, la superficie puede calentarse antes de que la solución se aplique a la misma, o puede estar a temperatura ambiente en el momento de la aplicación de la solución y luego calentarse a la temperatura pertinente. Por lo tanto, en una realización, la superficie se calienta para calentar la solución.

Como se ha explicado anteriormente, una ventaja importante del proceso de la presente invención es que los materiales biocompatibles pueden formarse debido a que el proceso no requiere el uso de agentes tales como los reticulantes para que se forme el polímero. Por tanto, en una realización, el proceso de la presente invención excluye el uso de agentes de reticulación.

En otra realización, el proceso puede excluir el uso de sales, u otros agentes de coacervación, para ayudar a la formación de polímeros basados en tropoelastina.

En otra realización, el proceso puede excluir el uso de agentes modificadores del pH que producen la agregación irreversible de los monómeros de tropoelastina. En particular, en una realización, la etapa de calentamiento se lleva a cabo a un pH que no es un pH alcalino; por ejemplo, el pH puede ser generalmente inferior a 8,5 u 8,0.

Como se ha explicado anteriormente, los materiales de la presente invención se forman calentando una solución de tropoelastina sobre una superficie (tal como, por ejemplo, en un molde con forma). Sin pretender imponer ninguna teoría o modo de acción, los presentes inventores creen que en una solución concentrada de tropoelastina, los monómeros de tropoelastina están estrechamente empaquetados. Este empaquetado estrecho facilita la unión entre los monómeros al calentar la solución, produciéndose de este modo un material elástico que no se disocia en monómeros separados de tropoelastina cuando se pone en un entorno acuoso.

La solución que forma el disolvente de los monómeros de tropoelastina puede ser una solución acuosa o una solución no acuosa.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “solución acuosa” se refiere a una solución que contiene agua. Una solución acuosa puede incluir otros componentes, tales como tampones, y excipientes farmacéuticamente aceptables, y pueden incluir también otros disolventes orgánicos miscibles en agua, tales como metanol, etanol y hexafluoropropanol, y combinaciones de los mismos. Cuando la solución acuosa incluye otros disolventes, un experto en la técnica entenderá que el agua será el principal componente disolvente y el(los) otro(s) disolvente(s) completará(n) la porción menor del componente disolvente. El uso de una solución acuosa es particularmente ventajoso porque significa que el concentrado de tropoelastina, y por tanto el material, se forma a partir de una composición que no contiene ningún componente que sea no biocompatible o tóxico, o que pueda degradarse en el organismo para formar subproductos tóxicos o no deseables. Por tanto, preferiblemente, la solución acuosa no contiene ningún componente (disolventes, tampones, etc.) que sean tóxicos o no biocompatibles y/o que formen especies tóxicas o no biocompatibles cuando el material esté en uso (por ejemplo, en el cuerpo o en un ensayo).

Como se utiliza en la presente memoria, el término “solución no acuosa” se refiere a una solución que no contiene agua, o que contiene agua como componente disolvente menor. Ejemplos de disolventes no acuosos incluyen el HFP, por ejemplo, como se ilustra en estos ejemplos. Una ventaja de utilizar un disolvente no acuoso para formar una solución no acuosa es que de forma general el disolvente puede tener un punto de ebullición inferior al del agua. Esto permitiría que el disolvente se evapore según sea necesario durante el proceso sin la adición sustancial de calor.

En una realización, la solución se forma mediante un proceso que incluye las etapas de:

- proporcionar una solución de monómeros de tropoelastina;
- aumentar la concentración de monómeros de tropoelastina en la solución.

El producto final recibe el nombre de “concentrado”. El concentrado puede obtenerse mediante cualquier método conocido por ser adecuado para una persona experta en la técnica. Se cree que en el concentrado, los monómeros de tropoelastina se ponen en contacto estrecho entre sí, de modo que, al calentarse, los monómeros formarán un agregado o masa que puede conformarse a la forma de la superficie sobre la que se forma y que no se disocia ni experimenta una alteración significativa de los enlaces formados durante el calentamiento cuando el agregado se coloca en un entorno acuoso.

El concentrado puede obtenerse evaporando el disolvente de la solución, por ejemplo, calentando la solución, o soplando aire o nitrógeno por encima de la solución. Por ello, en una realización, la concentración de monómeros de tropoelastina aumenta evaporando el disolvente de la solución.

El disolvente puede evaporarse de la solución cuando la solución se aplica a la superficie. El disolvente puede evaporarse, permitiendo la concentración de los monómeros de tropoelastina, dado que la solución se calienta en la superficie a una temperatura que permite que los monómeros de tropoelastina se unan entre sí para formar un material elástico que no se disocia en monómeros de tropoelastina cuando el material se pone en contacto con una solución acuosa.

En una realización, se aumenta la concentración de monómeros de tropoelastina separando los monómeros de tropoelastina del disolvente. Los monómeros de tropoelastina pueden separarse del disolvente mediante el electrohilado de los monómeros de tropoelastina. El “electrohilado” es un proceso en el que se forman las fibras a partir de una solución o material fundido haciendo pasar una solución o material fundido eléctricamente cargados a través de un orificio a lo largo de un gradiente de potencial. En una realización, la solución tiene una concentración de monómeros de tropoelastina de aproximadamente 1 % a aproximadamente 40 % (p/v) en el momento en que la solución se aplica a la superficie. Por ejemplo, la concentración de monómeros de tropoelastina en la solución puede ser aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 22 %, aproximadamente 24 %, aproximadamente 26 %, aproximadamente 28 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 32 %, aproximadamente 34 %, aproximadamente 36 %, aproximadamente 38 %, o aproximadamente 40 % (p/v).

“Material electrohilado” es cualquier molécula o sustancia que forma una estructura o grupo de estructuras (tales como fibras, redes o gotitas), como resultado del proceso de electrohilado. De forma general, este material puede ser natural, sintético o una combinación de estos, pero en la presente invención se prefiere el uso de tropoelastina.

El material de matriz puede depositarse sobre la plantilla textil utilizando electrohilado. Esta tecnología de plataforma se utiliza ampliamente en la ingeniería de tejidos para fabricar esqueletos compuestos de arquitecturas de nanofibras y microfibras (Li y col. (2006) y Li y col. (2005)).

El proceso de electrohilado implica poner un fluido que contiene polímero o monómero (por ejemplo, una solución de polímero o monómero, una suspensión de polímero o monómero, o material fundido de polímero o monómero) en un depósito provisto de un pequeño orificio, como una aguja o punta de pipeta, y una bomba de medición. Un electrodo de una fuente de alto voltaje se pone en contacto eléctrico con el fluido u orificio, mientras que el otro electrodo se pone en contacto eléctrico con un objetivo (de forma general, un tamiz colector o mandril giratorio). Durante el electrohilado, el fluido se carga mediante la aplicación de alto voltaje a la solución u orificio (por ejemplo, de aproximadamente 3 a aproximadamente 15 kV) y que seguidamente se fuerza a través del pequeño orificio mediante la bomba de medición, proporcionando un flujo estable. Aun cuando el fluido en el orificio normalmente tuviera una forma hemisférica debido a la tensión superficial, la aplicación de alto voltaje hace que el fluido que tendría forma hemisférica en el orificio se alargue para formar una forma cónica conocida como cono de Taylor. Con la aplicación de una tensión lo suficientemente elevada al fluido y/o al orificio, la fuerza electrostática de repulsión del fluido cargado se hace superior a la tensión superficial, y se expulsa un chorro de fluido cargado desde la punta del cono de Taylor y se acelera hacia el destino, que de forma típica se polariza entre -2 y -10 kV. De forma opcional puede utilizarse un anillo de enfoque con una polarización aplicada (por ejemplo, de 1 a 10 kV) para dirigir la trayectoria del chorro de fluido cargado. A medida que el chorro de fluido cargado se desplaza hacia el destino polarizado, éste experimenta un movimiento complejo de oscilación y flexión. Si el fluido es una solución o suspensión de monómero o polímero, de forma típica el disolvente se evapora a mitad de trayecto, dejando detrás de una fibra de polímero o monómero en el destino polarizado. Si el fluido es un material fundido de polímero o monómero, el polímero/monómero fundido se enfría y solidifica a mitad de trayecto y se recoge como una fibra de

monómero/polímero en el destino polarizado. Dado que las fibras de polímero/monómero se acumulan sobre el destino polarizado, se forma una malla porosa en el destino polarizado.

Las propiedades de la matriz electrohilada pueden personalizarse variando las condiciones de electrohilado. Por ejemplo, cuando la plantilla está relativamente cerca del orificio, la malla electrohilada resultante tiende a contener fibras de espesor no uniforme, de modo que algunas áreas de la fibra tienen el aspecto de un “rosario”. Sin embargo, a medida que la plantilla se aleja del orificio, las fibras de la malla tienden a tener un espesor más uniforme. Además, la plantilla puede moverse con respecto al orificio. En determinadas realizaciones, la plantilla se mueve hacia atrás y hacia adelante de forma regular y periódica, de manera que las fibras de la malla son prácticamente paralelas entre sí. Cuando es este el caso, la malla resultante puede tener una mayor resistencia a la deformación en la dirección paralela a las fibras, comparado con la dirección perpendicular a las fibras. En otras realizaciones, el blanco polarizado se mueve con respecto al orificio en un patrón bidimensional o tridimensional para crear una malla que comprenda una o más capas con patrones con orientación de hilos, espesor, etc. similares o distintos. En otras realizaciones, la plantilla se mueve de forma aleatoria con respecto al orificio, de modo que la resistencia a la deformación en el plano de la malla sea isotrópica. Las propiedades de la matriz de electrohilado también pueden variarse cambiando la magnitud de las tensiones aplicadas al sistema electrohilado. En un ejemplo no limitativo, el aparato de electrohilado incluye un orificio polarizado a 20 kV. En otro ejemplo no limitativo, el aparato de electrohilado incluye una plantilla polarizada a -7 kV. En otro ejemplo no limitativo adicional, el aparato de electrohilado incluye un anillo de enfoque polarizado a 3 kV.

En una realización, la concentración de tropoelastina en la solución es de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 350 mg/ml en el momento en que la solución se aplica a la superficie. Por ejemplo, la concentración tropoelastina es aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 35 mg/ml, 40 mg/ml, aproximadamente 45 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 55 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 65 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 85 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 95 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 110 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 130 mg/ml, aproximadamente 140 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 170 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml, aproximadamente 190 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 210 mg/ml, aproximadamente 220 mg/ml, aproximadamente 230 mg/ml, aproximadamente 240 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 260 mg/ml, aproximadamente 270 mg/ml, aproximadamente 280 mg/ml, aproximadamente 290 mg/ml, aproximadamente 300 mg/ml, aproximadamente 310 mg/ml, aproximadamente 320 mg/ml, o aproximadamente 340 mg/ml.

En una realización, la concentración de tropoelastina en la solución puede depender del tipo de disolvente y de la temperatura del disolvente a la que se añade la tropoelastina.

La solución o el concentrado de tropoelastina que se aplica a la superficie puede tener un intervalo de viscosidades. Puede incluir tropoelastina precipitada no reticulada, tal como un coacervado.

En una realización determinada, la solución aplicada a la superficie puede también incluir monómeros de tropoelastina coacervados.

Se proporciona un método para formar un material elástico, que incluye:

- proporcionar una solución de monómeros de tropoelastina;

- aumentar la concentración de monómeros de tropoelastina en la solución para formar un concentrado de tropoelastina;

- aplicar el concentrado a una superficie;

- calentar el concentrado en la superficie a una temperatura suficiente para permitir que la tropoelastina del concentrado se una entre sí para formar un material elástico que no se disocia en monómeros de tropoelastina cuando el material se pone en contacto con una solución acuosa,

formando de este modo el material elástico. En una realización, el concentrado se calienta a una temperatura dentro de un intervalo definido por un valor mínimo y un valor máximo;

en donde el valor mínimo es una temperatura por encima de la cual los monómeros de tropoelastina se unen entre sí para formar un material que no se disocia en una solución acuosa; y

en donde el valor máximo es una temperatura por encima de la cual se forma un material no elástico;

formando así un material elástico. El método puede incluir la etapa de calentar el concentrado sobre la superficie para permitir una pérdida de agua de aproximadamente 1 % a 20 % de agua (p/p), preferiblemente aproximadamente 15 % de agua (p/p) del concentrado.

La tropoelastina es una proteína monomérica codificada por la secuencia genómica de la elastina (ELN) (o gen). Los monómeros de tropoelastina tienen un tamaño de aproximadamente 60-70 kDa. Hay aproximadamente 36 dominios

pequeños en la tropoelastina y cada uno de ellos pesa aproximadamente 2 kDa. Dentro de los exones hay dominios hidrófobos alternantes ricos en aminoácidos no polares como glicina, valina, prolina, isoleucina y leucina (cuyos dominios aparecen con frecuencia en repeticiones de tres a seis péptidos, como GVGVP, GGVP y GVGVAP), y dominios hidrófobos ricos en lisina y alanina. Los dominios hidrófilos a menudo constan de secuencias de lisina separadas por dos o tres residuos de alanina, tal como AAKAAKAA. Además, la tropoelastina finaliza con una secuencia carboxiterminal hidrófila que contiene sus únicos dos residuos de cisteína. La tropoelastina no experimenta escisión durante el ensamblado, y la formación de la microfibrilla se consigue mediante un proceso de autoasociación denominado coacervación.

La tropoelastina se agrega a temperatura fisiológica debido a las interacciones entre los dominios hidrófobos. Este proceso es reversible y está controlado termodinámicamente. El coacervado se estabiliza mediante reticulación por medio de la lisil oxidasa. El coacervado se vuelve insoluble y el proceso es irreversible. Seguidamente se condensa para formar una estructura reticulada de dos residuos o cuatro residuos en la desmosina o la isodesmosina.

En determinadas realizaciones, el monómero de tropoelastina que se utiliza en la presente invención incluye dominios tanto hidrófilos como hidrófobos. Los dominios hidrófilos contribuyen a la función elástica (por ejemplo, uniéndose al agua). También contribuyen a una mayor variedad de funciones biológicas, que incluyen la unión a células y a la matriz extracelular. Se cree que los dominios hidrófobos son importantes para proporcionar la elasticidad, que es una característica de los materiales de la presente invención.

Algunos ejemplos de secuencias de aminoácidos que pueden estar presentes en un monómero de tropoelastina son las siguientes:

GGVPGAIPGGVPGGVFYF

GVGLPGVYP

GVPLGYP

PYTTGKLPGYGP

GGVAGAAGKAGYP

TYGVGAGGFP

KPLKP

ADAAAAYKAACA

GAGVKPGKV

GAGVKPGKV

TGAGVKPKA

QIKAPKL

VAPGVG

VPGVG

AAAAAAKAAAK

AAAAAAAAAKAAYGAAAGLV

EAAKAAKAAKAYGAR

EAQAAAAKAAKAYGVGT

AAAAKAAKAAQFGLV

GGVAAAASAAKVAQAQLRAAAGLGAGI

GALAAKAAKYGAAV

AAAAAAKAAAKAA

AAAKAAKYGAA

CLGKACGRKRK.

En determinadas realizaciones, la tropoelastina de uso en la presente invención puede incluir o consistir en una cualquiera de las secuencias descritas anteriormente.

En una realización, la tropoelastina de uso en la presente invención incluye o consiste en una secuencia que se muestra a continuación:

5 VXPGVG

en donde x es cualquier residuo aminoácido o ningún residuo

ZXPGZG

en donde Z es un residuo alifático

VXP(I/L/V)V(I/L/V)

10 en donde (I/L/V) es isoleucina, leucina o valina.

En una realización, los monómeros de tropoelastina contienen dominios hidrófobos e hidrófilos de tropoelastina.

Son conocidas en la técnica otras secuencias adecuadas de tropoelastina, e incluyen CAA33627 (*Homo sapiens*), P15502 (*Homo sapiens*), AAA42271 (*Rattus norvegicus*), AAA42272 (*Rattus norvegicus*), AAA42268 (*Rattus norvegicus*), AAA42269 (*Rattus norvegicus*), AAA80155 (*Mus musculus*), AAA49082 (*Gallus gallus*), P04985 (*Bos taurus*), ABF82224 (*Danio rerio*), ABF82222 (*Xenopus tropicalis*) y P11547 (*Ovis aries*). En una realización preferida, los monómeros de tropoelastina para usar en la presente invención se derivan de la tropoelastina humana. En una realización, tienen la secuencia que corresponde a los residuos de aminoácidos 27-724 de la entrada AAC98394 de GenBank. Como se ha indicado en la presente memoria, la presente invención también incluye variantes, por ejemplo variantes de especies o variantes polimórficas de tropoelastina.

20 Los monómeros de tropoelastina de uso en la presente invención pueden obtenerse de fuentes recombinantes. También pueden extraerse de fuentes naturales o sintetizarse (mediante, por ejemplo, técnicas de síntesis de fase sólida). Los monómeros de tropoelastina también se comercializan.

Existen varias isoformas de tropoelastina, por lo que variará el número exacto de aminoácidos que constituyen el polipéptido de tropoelastina. El término “polipéptido” o “cadena polipeptídica” se refiere a un polímero de aminoácidos, generalmente unidos por enlaces amida. Un polímero funcionalmente activo de aminoácidos se denomina de forma general “proteína”. La presente invención también incluye variantes de tropoelastina, por ejemplo variantes de especies o variantes polimórficas. La presente invención pretende abarcar todas las variantes funcionalmente activas de tropoelastina que presentan la misma actividad (es decir, biocompatibilidad y elasticidad). Esto incluye, además, las formas apo y holo de tropoelastina, formas modificadas postraduccionalmente, así como derivados glicosilados o desglicosilados. Estos fragmentos y variantes funcionalmente activos incluyen, por ejemplo, aquellos que tienen sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En una realización, los monómeros son monómeros recombinantes de tropoelastina con la secuencia de una isoforma de tropoelastina humana.

El término “funcionalmente activo” en relación con un fragmento o variante de la tropoelastina significa que el fragmento o variante (tal como un análogo, derivado o mutante) que sea capaz de formar un material elástico, como se explica a continuación. Estas variantes incluyen variantes de aparición natural y variantes no presentes de forma natural. Se contemplan adiciones, deleciones, sustituciones y derivatizaciones de uno o más de los aminoácidos, siempre que las modificaciones no den lugar a la pérdida de actividad funcional del fragmento o variante. Puede determinarse fácilmente un fragmento funcionalmente activo acortando la secuencia de aminoácidos utilizando, por ejemplo, una exopeptidasa, o sintetizando secuencias de aminoácidos de longitud más corta, y seguidamente ensayando la capacidad de formación de material elástico tal como mediante los métodos ilustrados en los ejemplos que siguen.

45 Cuando se producen variaciones no naturales, el fragmento puede denominarse un peptidomimético, que también está dentro del ámbito de la invención. Por ejemplo, los aminoácidos sintéticos y sus análogos pueden ser sustituidos por uno o más de los aminoácidos nativos que proporcionan actividad formadora de construcciones, como se describe más adelante.

Un “peptidomimético” es un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente la misma estructura y/o características funcionales de una tropoelastina para usar en la presente invención. Un peptidomimético contiene, de forma general, al menos un residuo que no se sintetiza de forma natural. Los componentes no naturales de compuestos peptidomiméticos pueden corresponderse con uno o más de: a) grupos de enlace de residuos que no sean enlaces de amida natural (“enlace peptídico”); b) residuos no naturales en lugar de residuos de aminoácidos naturales; o c) residuos que inducen un mimetismo estructural secundario es decir, para inducir o estabilizar una estructura secundaria, por ejemplo, una conformación de giro beta, giro gamma, giro de poliprolina, lámina beta, hélice alfa, y similar.

Los peptidomiméticos pueden sintetizarse utilizando diversos procedimientos y metodologías descritos en la literatura científica y de patentes (por ejemplo, Gilman y col., al-Obeidi y col. (1998), Hruby y col. (1997) y Ostergaard y Holm (1997)).

Preferiblemente, el fragmento funcionalmente activo tiene una longitud aproximada de 100 aminoácidos. En general, el fragmento más corto para usar en la presente invención tendrá una longitud aproximada de 10 aminoácidos. Por tanto, el fragmento puede tener una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 aminoácidos. Los fragmentos más cortos son ventajosos cuando, por ejemplo, se busca que los fragmentos se elaboren mediante técnicas de síntesis, dado que la preparación de fragmentos largos mediante, por ejemplo, síntesis de fase sólida, puede ser difícil de lograr. Los fragmentos se sintetizan, de modo general, *in vitro*, cuando se desee obtener productos muy puros. La ventaja de los fragmentos más largos es que la naturaleza hidrófoba/hidrófila del fragmento puede ajustarse finamente con mayor facilidad, al igual que sus propiedades elásticas. Preferiblemente, el fragmento o variante funcionalmente activo tiene al menos aproximadamente 60 % de identidad con un péptido tal como se ha descrito anteriormente, más preferiblemente una identidad de al menos aproximadamente 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 % u 85 %, aún más preferiblemente 90 % de identidad, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad. El fragmento o variante funcionalmente activo puede corresponder a, o tener identidad con, una secuencia contigua de aminoácidos de la tropoelastina; no obstante, se contempla también que un fragmento funcionalmente activo corresponde a, o tiene identidad con, secuencias de aminoácidos que están agrupadas espacialmente en la estructura tridimensional de la tropoelastina.

Estos fragmentos y variantes funcionalmente activos incluyen, por ejemplo, aquellos que tienen sustituciones de aminoácidos conservadoras. Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros adecuados para medir la alineación, incluidos cualesquiera algoritmos (a continuación se describen ejemplos no limitativos) necesarios para lograr la alineación máxima a lo largo de toda la longitud de las secuencias que se comparan. Cuando se alinean las secuencias de aminoácidos, la identidad porcentual de la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A respecto a, con, o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que puede redactarse de forma alternativa como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o incluye una determinada identidad porcentual de la secuencia de aminoácidos a, con, o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) puede calcularse como: identidad porcentual de la secuencia de aminoácidos = $(X/Y) \times 100$, donde X es el número de residuos de aminoácido puntuados como coincidencias idénticas por el alineamiento del programa o algoritmo de alineación de secuencias de A y B, e Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, la identidad porcentual de la secuencia aminoácidos de A respecto a B no será igual a la identidad porcentual de la secuencia de aminoácidos de B respecto a A.

Al calcular la identidad porcentual, se cuentan las coincidencias exactas. La determinación de la identidad porcentual entre dos secuencias puede lograrse utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990), modificado como en Karlin y Altschul (1993). Este algoritmo se incorpora a los programas BLASTN y BLASTX de Altschul y col. (1990). Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST (en BLAST 2.0) según se describe en Altschul y col. (1997). De forma alternativa puede utilizarse PSI-Blast para llevar a cabo una búsqueda iterada que detecte relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul y col. (1997) *supra*. En una realización preferida, utilizando los programas BLAST, Gapped BLAST, y PSI-Blast, se utilizan los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, BLASTX y BLASTN). La alineación también puede realizarse manualmente mediante inspección. Otro ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo ClustalW (Higgins y col. (1994)). ClustalW compara secuencias y alinea la totalidad de la secuencia de aminoácidos o de ADN por lo que puede proporcionar datos sobre la conservación de secuencias de la secuencia completa de aminoácidos. El algoritmo ClustalW se utiliza en varios paquetes de software de análisis de ADN/aminoácidos comercializados, tales como el módulo ALIGNX del Vector NTI Program Suite (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Después de alinear las secuencias de aminoácidos con ClustalW, puede evaluarse el porcentaje de identidad de aminoácidos. Un ejemplo no limitativo de un programa de software útil para el análisis de alineaciones de ClustalW es GENEDOC™ o JalView (<http://www.jalview.org/>). GENEDOC™ permite la evaluación de la similitud e identidad de aminoácidos (o ADN) entre múltiples proteínas. Otro ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (CABIOS 1988; 4: 11-17). Dicho algoritmo se incorpora al programa ALIGN (versión 2.0), que forma parte del GCG Wisconsin Genetics Software Package, Versión 10 (comercializado por Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, CA, EE. UU.). En una realización preferida, utilizando el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, al evaluar la identidad porcentual se utiliza una tabla de residuos por peso PAM 120, una penalización de longitud de interrupción de 12, y una penalización de interrupción de 4.

El término “sustituciones de aminoácido conservadoras” se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro de la misma clase, siendo las clases las siguientes:

No polares: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp

Polares no cargados: Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln

Ácidos: Asp, Glu

Básicos: Lis, Arg, His.

También pueden hacerse otras sustituciones conservadoras de aminoácidos del siguiente modo:

Aromáticos: Phe, Tyr, His

Donadores de protones: Asn, Gln, Lys, Arg, His, Trp

5 Aceptores de protones: Glu, Asp, Thr, Ser, Tyr, Asn, Gln.

En una realización, los monómeros tienen una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la tropoelastina humana en al menos 50 aminoácidos consecutivos.

En una realización, los monómeros tienen una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con la secuencia de tropoelastina humana en una secuencia de aminoácidos consecutiva que consiste en VPGVG.

10 Puede utilizarse un tipo de monómero de tropoelastina en la presente invención, o pueden utilizarse combinaciones de distintos monómeros de tropoelastina. Por ejemplo, la combinación de monómeros de tropoelastina puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, o más, distintos tipos de monómeros de tropoelastina. En otra realización pueden utilizarse al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 o más, distintos monómeros de tropoelastina. En otra realización pueden utilizarse 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, o 10 o más tipos distintos de monómeros de tropoelastina.

Además, en otras realizaciones, los monómeros de tropoelastina son cualquier número o combinación de monómeros de tropoelastina humanos y/o no humanos (p. ej., de primate, bovino, equino, oveja, cabra, cerdo, perro, gato o roedor).

Además, se apreciará que variar la relación y/o la identidad de cada uno de los monómeros de tropoelastina presentes en una combinación puede generar hidrogeles basados en tropoelastina con la elasticidad, resistencia a la tracción, y moldeabilidad deseadas, y que por tanto pueden variarse la resistencia, elasticidad, potencial de reticulación y otros comportamientos físicos y bioquímicos de los polímeros de tropoelastina, y posiblemente controlarse, incorporando diversas formas polimórficas de tropoelastina en los esqueletos poliméricos.

Además, la relación y/o identidad de cada uno de los monómeros de tropoelastina presentes en una combinación puede variarse para que coincida con los monómeros de tropoelastina presentes en el tejido que está siendo reparado, sustituido, o regenerado.

En una realización, la solución se aplica a la superficie rociando la solución sobre la superficie.

El término “superficie”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier objeto o dispositivo que puede utilizarse para fabricar una construcción de polímero basado en tropoelastina con una forma complementaria. Por ejemplo, la superficie puede ser una superficie plana, de modo que el agregado forme una película plana sobre la misma, o puede ser un molde. Se entiende que de forma general los moldes son objetos o dispositivos que incluyen una parte hueca. Esta parte puede llenarse con la solución de monómeros de tropoelastina, de modo que cuando el concentrado se calienta, se endurece o se asienta dentro del molde, adoptando su forma. El molde puede tener cualquier forma deseada por un experto en la técnica. Por ejemplo, el molde puede tener una forma tal que la construcción formada a partir del mismo tenga la forma de un tejido biológico específico a reparar y/o a sustituir (por ejemplo, cartilago, tejido vascular o hueso) o puede incluir un patrón (de canales, ranuras y similar, como se describe más adelante) que puede utilizarse para aplicaciones de ensayo. Por tanto, en una realización, la superficie se proporciona en forma de una matriz, molde o vaciado, lo que permite que el material elástico formado por el proceso reciba una forma predefinida.

En una realización, un material elástico puede formar una “superficie” a la que puede aplicarse la solución de monómeros de tropoelastina según el proceso anteriormente descrito. Por ejemplo, una primera aplicación puede dar lugar a la formación de un material elástico sobre una superficie no proteínica. Puede hacerse una segunda aplicación a dicho material elástico formado en la superficie no proteínica, dando lugar a la formación de un material elástico sobre el material elástico derivado de la primera aplicación. El proceso puede repetirse múltiples veces, permitiendo la construcción de estructuras, por ejemplo mediante la aplicación gota a gota de soluciones de monómeros de tropoelastina.

La presente descripción se refiere, además, a un material elástico formado por un proceso que incluye:

- 45 - proporcionar una solución de monómeros de tropoelastina;
- aplicar la solución a una superficie; y
- calentar la solución sobre la superficie a una temperatura suficiente para permitir que los monómeros de tropoelastina en la solución se unan entre sí para formar un agregado de monómeros de tropoelastina.

La presente invención también se refiere a un material elástico formado mediante un proceso según se define en las reivindicaciones.

La presente descripción también se refiere a una construcción que incluye un material elástico formado por la asociación asistida por calor de monómeros de tropoelastina.

La presente invención también se refiere a una construcción que incluye un material elástico formado por la asociación asistida por calor de monómeros de tropoelastina, obtenido u obtenible mediante un método según las reivindicaciones.

5 Un material elástico puede ser una estructura polimérica tridimensional que puede utilizarse para reparar, aumentar o sustituir (al menos una parte de) un tejido natural de un paciente (por ejemplo, para aplicaciones veterinarias o médicas (humanas)). Además, el material elástico puede incorporarse a, o formar parte de, una construcción tridimensional. Por ejemplo, el agregado puede incorporarse, como una capa, a una construcción que se utilice para la reparación de cartílagos, o puede incorporarse a un stent.

10 Un experto en la técnica entenderá que el grado de contacto entre los monómeros de tropoelastina en la solución antes de la etapa de calentamiento también puede afectar a las propiedades del material. Por ejemplo, cuanto más concentrada esté la solución (en términos de la cantidad de tropoelastina presente en el concentrado) antes del calentamiento, más monómeros de tropoelastina interactuarán para formar el agregado, y menos elástico será el material resultante. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la concentración de monómero de tropoelastina en la solución puede estar directamente correlacionada con el grado de polimerización. También pueden contribuir a las propiedades del material otros factores, que incluyen, por ejemplo, el tipo de monómero de tropoelastina utilizado, la temperatura a la que se lleva a cabo la etapa de calentamiento y el tiempo durante el que se lleva a cabo el calentamiento, como se ha explicado anteriormente.

20 Como se ha mencionado anteriormente, los materiales descritos en la presente memoria pueden ser porosos, es decir, pueden tener porosidad, es decir, un volumen fraccionario del material puede estar compuesto de espacio abierto, por ejemplo, poros u otras aberturas. Por lo tanto, la porosidad mide los espacios vacíos en un material y es una fracción del volumen de espacios vacíos respecto al volumen total, como porcentaje entre 0 y 100 % (o entre 0 y 1) (véase, por ejemplo, Coulson y col. (1978)). La determinación de la porosidad de la matriz es bien conocida para el experto en la técnica, utilizando, por ejemplo, técnicas estandarizadas como la porosimetría de mercurio y la adsorción de gases (tal como la adsorción de nitrógeno). De forma general, la porosidad del material puede ser de 0,5 a 0,99, de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 0,99, o de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 0,95. Preferiblemente, la porosidad del material es al menos 0,75, más preferiblemente al menos 0,8, y con máxima preferencia al menos 0,9.

30 Los materiales porosos pueden tener cualquier tamaño de poro. Como se utiliza en la presente memoria, el término “tamaño de poro” se refiere a un diámetro o un diámetro efectivo de las secciones transversales de los poros. El término “tamaño de poro” puede referirse también a un diámetro promedio o a un diámetro efectivo promedio de las secciones transversales de los poros, con respecto a las mediciones de una pluralidad de poros. El diámetro efectivo de una sección transversal que no sea circular es igual al diámetro de una sección transversal circular que tenga la misma área en sección transversal que la de la sección transversal no circular. Los poros pueden llenarse con un líquido tal como agua o aire. En algunas realizaciones, los poros del material pueden tener una distribución de tamaño de poro en el intervalo de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 1000 μm , de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 500 μm , de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 250 μm , de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 200 μm , de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 150 μm , de aproximadamente 15 μm a aproximadamente 125 μm , de aproximadamente 20 μm a aproximadamente 100 μm , o de aproximadamente 40 μm a aproximadamente 65 μm . En algunas realizaciones, el material puede tener un tamaño de poro de aproximadamente 12 μm , aproximadamente 25 μm , aproximadamente 45 μm , aproximadamente 50 μm , o aproximadamente 65 μm . En algunas realizaciones, el material puede tener un tamaño de poro de $11,7 \pm 3,3 \mu\text{m}$, $23,4 \pm 5,8 \mu\text{m}$, o $51 \pm 9 \mu\text{m}$.

45 El experto en la técnica entenderá que los poros pueden presentar una distribución de tamaños alrededor del “tamaño” indicado. Salvo que se indique lo contrario, el término “tamaño”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la moda de distribución de tamaño de poros, es decir, el valor que aparece con mayor frecuencia en la distribución del tamaño.

50 Los poros pueden tener una sección transversal o abertura prácticamente redonda. El término “prácticamente redondo” significa que la relación de las longitudes de los ejes perpendiculares más largos a más cortos de la sección transversal del poro es inferior o igual a aproximadamente 1,5. Prácticamente redondo no requiere una línea de simetría. En algunas realizaciones, la relación de longitudes entre los ejes más largos y más cortos de la sección transversal de poro es inferior o igual a aproximadamente 1,5, inferior o igual a aproximadamente 1,45, inferior o igual a aproximadamente 1,4, inferior o igual a aproximadamente 1,35, inferior o igual a aproximadamente 1,30, inferior o igual a aproximadamente 1,25, inferior o igual a aproximadamente 1,20, inferior o igual a aproximadamente 1,15, inferior o igual a aproximadamente 1,1.

55 De forma ventajosa, los materiales de la presente invención son elásticos. Un material “elástico” es uno que regresa a una forma o conformación particular después de que se haya dejado de aplicar una fuerza (tal como compresión o extensión) al mismo. También recibe el nombre de material comprimible y extensible resiliente, mecánicamente duradero, o material flexible con una histéresis relativamente baja. Este material puede denominarse estirable, extensible, resiliente o capaz de retroceder. Por ejemplo, el material puede tener una extensibilidad de aproximadamente 20 a aproximadamente 400 %.

En algunas realizaciones, el material puede tener un módulo elástico en el intervalo de aproximadamente 1 kPa a aproximadamente 10^3 kPa. Como se utiliza en la presente memoria, el término “módulo elástico” se refiere a la tendencia del objeto o sustancia a deformarse elásticamente (es decir, no de forma permanente) cuando se le aplica una fuerza. De forma general, el módulo elástico de un objeto se define como la pendiente de su curva de tensión-deformación en la región de deformación elástica. Especificar cómo se van a medir la tensión y la deformación, incluidas las direcciones, permite definir muchos tipos de módulos elásticos. El módulo de Young (E) describe la elasticidad de tracción o la tendencia de un objeto a deformarse a lo largo de un eje cuando se aplican fuerzas opuestas a lo largo de dicho eje; se define como la relación de tensión de tracción respecto a la deformación de tracción. A menudo recibe simplemente el nombre de módulo elástico. También se apreciará que el material elástico formado mediante el proceso responde elásticamente a la compresión. En algunas realizaciones, el material puede tener un módulo elástico en el intervalo de aproximadamente 1 kPa a aproximadamente 1000 kPa. En algunas realizaciones, el material puede tener un módulo elástico de aproximadamente 10 kPa, aproximadamente 100 kPa, o aproximadamente 200 kPa.

Puede lograrse un módulo de Young más alto para un material dado según la invención mediante uno cualquiera de los siguientes procesos:

- calentar durante un período de tiempo más largo, por ejemplo 8 a 16 horas
- añadir seda antes de la solubilización de la tropoelastina y el calentamiento
- añadir enlazantes

Estos ajustes dan lugar a un material con un módulo de Young de hasta 10 megapascales.

El material de la presente invención puede agregarse al agua para formar un hidrogel. Por tanto, la presente invención se refiere a un hidrogel que incluye un material elástico, en donde el material elástico se forma mediante un proceso según se define en las reivindicaciones.

La presente descripción se refiere a un hidrogel que incluye un material elástico, en donde el material elástico se forma mediante un proceso que incluye:

- proporcionar una solución de monómeros de tropoelastina;

- aplicar la solución a una superficie; y

- calentar la solución sobre la superficie a una temperatura suficiente para permitir que los monómeros de tropoelastina en el concentrado se unan entre sí para formar un agregado de monómeros de tropoelastina,

formando de este modo el material elástico.

De forma general, se entiende que un hidrogel es una red de cadenas de polímero (hidrófilas) en las que el agua es el medio de dispersión. Los hidrogeles son muy absorbentes: pueden contener más de 99,9 % de agua y poseen un grado de flexibilidad muy similar al de los tejidos naturales, debido a su importante contenido de agua.

Por tanto, un hidrogel que incluya un material elástico o agregado de la presente invención contendrá de forma típica una cantidad sustancial de agua. Sin embargo, la cantidad de agua en la que se añade o sumerge el agregado para formar un hidrogel dependerá de factores tales como el grado de elasticidad deseado en el hidrogel. Es decir, la cantidad de agua añadida al agregado puede ser una cantidad que sea apenas suficiente para impartir elasticidad. De forma alternativa, puede agregarse una cantidad significativa de agua para hacer que el hidrogel resultante sea muy elástico. Un experto en la técnica entenderá que la cantidad de agua utilizada dependerá también de la elasticidad del agregado mismo (es decir, si el agregado ya es bastante elástico, será necesario añadir una cantidad menor de agua que si el agregado es menos elástico).

Un experto en la técnica entenderá que las explicaciones de la presente memoria en relación con componentes adicionales (p. ej., células, ingredientes farmacéuticamente activos y similares) de los materiales de la presente invención, así como las formas de los materiales de la presente invención (p. ej., como construcciones y ensayos de ingeniería de tejidos) también son aplicables a las construcciones e hidrogeles que comprenden el material elástico de la presente invención.

Los materiales descritos en la presente memoria pueden utilizarse para aplicaciones de ingeniería de tejidos. En algunas realizaciones, la ingeniería de tejidos tiene como fin sustituir, reparar y/o regenerar el tejido y/o la función del órgano o para crear tejidos y órganos artificiales para el trasplante. En general, los esqueletos utilizados en la ingeniería de tejidos imitan la extracellular matrix (matriz extracelular - ECM) natural y proporciona un soporte para la adhesión celular, migración, y proliferación. De forma ideal, permiten una función diferenciada, generación de tejido nuevo y su organización tridimensional. Las características deseadas de los esqueletos incluyen parámetros físicos tales como resistencia mecánica y degradabilidad, mientras que las propiedades biológicas incluyen la biocompatibilidad y la capacidad de proporcionar un microambiente biológicamente relevante. Los materiales biodegradables son ventajosos en algunas aplicaciones (tales como en la regeneración de tejidos) porque después de que el tejido crece, las estructuras resultantes están hechas totalmente o casi totalmente de componentes biológicos.

En algunas realizaciones, los materiales descritos en la presente memoria pueden utilizarse para muchas aplicaciones de ingeniería de tejidos, que incluyen el crecimiento y/o sustitución de tejidos vasculares, tejidos cardíacos, vejiga, piel, pulmones, ligamentos, tendones, glándulas endocrinas, hígado, tejido renal, nódulos linfáticos, páncreas, hueso, cartílago y otros tejidos. En algunas realizaciones, los materiales pueden utilizarse para proporcionar señales a las células, actuar como estructuras de soporte para el crecimiento y la función celular, y proporcionar llenado de espacios.

Formas deseadas ilustrativas del material elástico incluyen, aunque no de forma limitativa, a láminas, tubos y cualquier otra forma tridimensional. Los materiales elásticos a los que se ha dado forma de lámina pueden utilizarse en la preparación de implantes, construcciones e injertos para proporcionar terapia reparadora, sustitutiva, y/o regenerativa de tejidos dérmicos, membranas para procedimientos de recubrimiento de raíces dentales, tejidos membranosos y similares. Los materiales elásticos a los que se ha dado forma de tubo pueden utilizarse en la preparación de implantes, construcciones e injertos para proporcionar terapia reparadora, sustitutiva y/o regenerativa para arterias, venas, uréteres, uretras, nervios, huesos largos y similares. Los materiales elásticos a los que se ha dado forma de cualquier otro objeto tridimensional pueden utilizarse en la preparación de implantes, construcciones e injertos para proporcionar terapia reparadora, sustitutiva y/o regenerativa para trasplantes de órganos, remodelado o enmendado óseo, implantes dentales, o para injertos de músculo, tendones, ligamentos, y cartílagos.

En una realización, el material elástico puede recibir una forma que permita su uso como parche premoldeado, que puede entonces suturarse o de otro modo adherirse sobre una superficie. Ejemplos incluyen un parche cardíaco, un parche dérmico, o un parche adecuado para la córnea.

Un material elástico biocompatible formado, colado o moldeado en forma de una lámina puede ser una lámina plana, o una lámina con curvaturas que se ajusten estrechamente a los contornos del tejido lesionado, dañado o enfermo o del órgano que se está reparando, sustituyendo o regenerando. Las láminas pueden tener cualquier forma geométrica incluidos, aunque no de forma limitativa, cuadrados, rectángulos, trapezoides, triángulos, círculos, elipses y similares.

Áreas ilustrativas de las láminas incluye áreas de aproximadamente 1 mm² a aproximadamente 1 m², aproximadamente 1 mm² a aproximadamente 50 cm², aproximadamente 1 mm² a aproximadamente 25 cm², aproximadamente 1 mm² a aproximadamente 10 cm², aproximadamente 1 mm² a aproximadamente 1 cm², aproximadamente 1 cm² a aproximadamente 1 m², aproximadamente 1 cm² a aproximadamente 500 cm², 1 cm² a aproximadamente 250 cm², 1 cm² a aproximadamente 200 cm², 1 cm² a aproximadamente 150 cm², 1 cm² a aproximadamente 100 cm², aproximadamente 1 cm² a aproximadamente 50 cm², aproximadamente 1 cm² a aproximadamente 25 cm², aproximadamente 1 cm² a aproximadamente 10 cm², aproximadamente 1 cm² a aproximadamente 5 cm², aproximadamente 1 cm² a aproximadamente 2,5 cm², aproximadamente 10 mm² a aproximadamente 10 cm², aproximadamente 0,1 cm² a aproximadamente 10 cm², aproximadamente 0,1 cm² a aproximadamente 1 cm², o cualquier intervalo intermedio de las mismas. Por ejemplo, el intervalo de áreas de 1 cm² a 100 cm² de una lámina ilustrativa incluye áreas de aproximadamente 1 cm², aproximadamente 5 cm², aproximadamente 10 cm², aproximadamente 20 cm², aproximadamente 30 cm², aproximadamente 40 cm², aproximadamente 50 cm², aproximadamente 60 cm², aproximadamente 70 cm², aproximadamente 80 cm², aproximadamente 90 cm², y aproximadamente 100 cm².

Grados ilustrativos de espesor de un material elástico formado, colado o moldeado en forma de lámina, incluyen un intervalo de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 10 mm, aproximadamente 0,25 mm a aproximadamente 7,5 mm, aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 5 mm, aproximadamente 0,75 mm a aproximadamente 2,5 mm, aproximadamente 1 mm a aproximadamente 2 mm o cualquier intervalo intermedio de los mismos.

En otra realización, el espesor puede ser aproximadamente 0,1 mm, aproximadamente 0,25 mm, aproximadamente 0,5 mm, aproximadamente 0,75 mm, aproximadamente 1 mm, aproximadamente 2 mm, aproximadamente 3 mm, aproximadamente 4 mm, aproximadamente 5 mm, aproximadamente 7,5 mm, o aproximadamente 10 mm o más.

Un material elástico formado, colado o moldeado en la forma de un tubo puede tener cualquier longitud, diámetro y grosor deseados de forma que el tamaño del esqueleto sea adecuado para reparar, sustituir, y/o regenerar un tejido u órgano lesionado, dañado o enfermo. Longitudes ilustrativas del tubo incluyen aproximadamente 0,5 cm, aproximadamente 1 cm, aproximadamente 2,5 cm, aproximadamente 5 cm, aproximadamente 10 cm, aproximadamente 25 cm, aproximadamente 50 cm, aproximadamente 100 cm, aproximadamente 150 cm, aproximadamente 200 cm, aproximadamente 250 cm, aproximadamente 300 cm, aproximadamente 350 cm, aproximadamente 400 cm, aproximadamente 450 cm, aproximadamente 500 cm o más. Diámetros ilustrativos del tubo incluyen aproximadamente 0 mm (p. ej., una fibra sólida), 0,5 mm, aproximadamente 1 mm, aproximadamente 1,5 mm, aproximadamente 2 mm, aproximadamente 2,5 mm, aproximadamente 3 mm, aproximadamente 3,5 mm, aproximadamente 4 mm, aproximadamente 4,5 mm, aproximadamente 5 mm, aproximadamente 5,5 mm, aproximadamente 6 mm, aproximadamente 6,5 mm, aproximadamente 7 mm, aproximadamente 7,5 mm, aproximadamente 8 mm, aproximadamente 8,5 mm, aproximadamente 9 mm, aproximadamente 9,5 mm, aproximadamente 10 mm, aproximadamente 11 mm, aproximadamente 12 mm o más mm de diámetro. En una realización preferida, un tubo de la invención tiene de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 10 mm de diámetro.

Un material elástico formado, colado o moldeado en forma de otros objetos tridimensionales puede tener cualquier volumen y forma deseados de forma que el tamaño del esqueleto sea adecuado para reparar, sustituir y/o regenerar un tejido u órgano lesionado, dañado o enfermo.

- Los volúmenes ilustrativos de los esqueletos de forma tridimensional son de aproximadamente 100 mm³ a aproximadamente 5 m³, aproximadamente 100 mm³ a aproximadamente 1000 cm³, aproximadamente 1 cm³ a aproximadamente 1000 cm³, aproximadamente 1 cm³ a aproximadamente 100 cm³, aproximadamente 1 cm³ a aproximadamente 10 cm³, aproximadamente 10 cm³ a aproximadamente 1000 m³, aproximadamente 10 cm³ a aproximadamente 100 cm³, aproximadamente 500 cm³ a aproximadamente 1000 cm³, aproximadamente 100 mm³ a aproximadamente 5 cm³, aproximadamente 100 mm³ a aproximadamente 2,5 cm³, aproximadamente 1 cm³ a aproximadamente 5 cm³, aproximadamente 1 cm³ a aproximadamente 2,5 cm³, aproximadamente 750 cm³ a aproximadamente 1250 cm³, aproximadamente 850 cm³ a aproximadamente 1150 cm³, aproximadamente 950 cm³ a aproximadamente 1050 cm³, aproximadamente 900 cm³ a aproximadamente 1000 cm³, o cualquier intervalo intermedio de los mismos. Por ejemplo, el intervalo de volúmenes de 1 cm³ a 10 cm³ de una forma tridimensional ilustrativa incluye volúmenes de aproximadamente 1 cm³, aproximadamente 2 cm³, aproximadamente 3 cm³, aproximadamente 4 cm³, aproximadamente 5 cm³, aproximadamente 6 cm³, aproximadamente 7 cm³, aproximadamente 8 cm³, aproximadamente 9 cm³ y aproximadamente 10 cm³. En una realización, el esqueleto puede tener un volumen de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 microlitros.
- En algunas realizaciones, el material elástico tiene forma de película. El espesor de la película puede ser de nanómetros a milímetros. Por ejemplo, el espesor de la película puede variar de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1000 nm. En algunas realizaciones, el espesor de la película puede ser de aproximadamente 1 nm a 1000 nm, de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 1000 µm, de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 1000 mm. En algunas realizaciones, el espesor de la película puede ser de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 750 µm, de aproximadamente 750 nm a aproximadamente 500 µm, de aproximadamente 1000 nm a aproximadamente 250 µm, de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 100 µm, de aproximadamente 25 µm a aproximadamente 75 µm. En algunas realizaciones, el espesor de la película varía de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 1 mm. En algunas realizaciones, el espesor de la película puede ser de aproximadamente 50 µm.
- En algunas realizaciones, el material elástico es una espuma. Las espumas pueden fabricarse a partir de métodos conocidos en la técnica incluidos, por ejemplo, liofilización y espumado con gas en donde el agua es el disolvente, o el nitrógeno u otro gas es el agente de soplado, respectivamente.
- En algunas realizaciones, los materiales pueden utilizarse para construir dispositivos de suministro complejos capaces de proporcionar perfiles de liberación definidos con precisión. Esto podría lograrse mediante la combinación de medicamentos o dispositivos de suministro de medicamentos (es decir, nanopartículas o micropartículas) con los materiales descritos en la presente memoria, y utilizar estos para construir sistemas de suministro de medicamentos más complejos. Para dar un ejemplo, los materiales descritos en la presente memoria pueden incluir de forma adicional un agente terapéutico a suministrar (por ejemplo, un medicamento de molécula pequeña, ácido nucleico, proteína, lípido y/o carbohidrato). Dichos materiales pueden ser útiles para suministrar un medicamento a un lugar destinado a la regeneración de tejidos. Por ejemplo, un material que comprende células osteoinductivas, que se administra a un paciente con el fin de regenerar hueso nuevo, puede incluir de forma adicional una o más proteínas morfogenéticas óseas (BMP) que, en el momento de su liberación, pueden ayudar a estimular de forma adicional el crecimiento de hueso nuevo.
- El material elástico descrito en la presente memoria puede combinarse con otro material, por ejemplo, un biomaterial, para formar un material compuesto. El término “biomaterial” como se utiliza en la presente memoria se refiere en general a materiales naturales biocompatibles. Biomateriales ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, biopolímeros, esponjas, seda, tejidos descelularizados y gelatina. Como se utiliza en la presente memoria, el término “biopolímero” se refiere a un polímero natural, o a un polímero sintético que es compatible con un sistema biológico o que imita a polímeros naturales. Biopolímeros ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, oligosacáridos, polisacáridos tales como los glicosaminoglicanos, péptidos, proteínas, oligonucleótidos, ácidos nucleicos, policétidos, peptoides, hidrogeles, poli (glicoles) tales como el polietilenglicol, colágeno, seda y polilactatos.
- En una realización, el material elástico puede combinarse con una sal, o con polivinilpirrolidona.
- El material elástico de la presente invención también puede incluir otros componentes tales como excipientes farmacéuticamente aceptables y agentes biológicamente activos (por ejemplo, medicamentos, vitaminas y minerales), para ayudar en la reparación y/o regeneración del tejido de destino y/o para proporcionar un método para lograr el suministro dirigido de compuestos biológicamente activos. Dichos componentes pueden añadirse a la solución de tropoelastina antes del calentamiento (de forma que se incorporen al material elástico a medida que se forma) o pueden ponerse en el material elástico después de que se haya formado. Además, los componentes pueden estar presentes en la solución acuosa utilizada para formar un hidrogel a partir del material elástico. Un experto en la técnica entenderá que cuando los componentes que vayan a añadirse no son estables en las condiciones necesarias para formar el material elástico, los componentes deberán añadirse después de que ya se haya formado el material elástico.
- Para que cualquier agente biológicamente activo conocido por un experto en la técnica sea beneficioso en el diagnóstico, tratamiento o prevención de una enfermedad, se contempla como agente terapéutico en el contexto de la presente invención. Agentes terapéuticos incluyen hormonas, factores de crecimiento, enzimas, ADN, ADN plasmídico, ARN, ARNip, virus, proteínas, lípidos, moléculas proinflamatorias, anticuerpos, antibióticos, agentes antiinflamatorios, nucleótidos antisentido y ácidos nucleicos transformantes o combinaciones de los mismos. Cualquiera de los agentes terapéuticos puede combinarse en la medida en que dicha combinación sea biológicamente compatible.

Factores de crecimiento y citoquinas adecuadas incluyen, aunque no de forma limitativa, stem cell factor (factor de células madre - SCF), granulocyte-colony stimulating factor (factor estimulante de colonias de granulocitos - G-CSF), granulocyte-macrophage stimulating factor (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos - GM-CSF), factor derivado de células estromales 1, factor steel, VEGF, TGF β , platelet derived growth factor (factor de crecimiento derivado de plaquetas - PDGF), angiopoietins (angiopoyetinas - Ang), epidermal growth factor (factor de crecimiento epidérmico - EGF), bFGF, HNF, NGF, bone morphogenic protein (proteína morfogénica del hueso - BMP), fibroblast growth factor (factor de crecimiento de fibroblastos - FGF), factor de crecimiento de hepatocitos, (insulin-like growth factor (factor de crecimiento insulínico - IGF-1), interleuquina (IL)-3, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, e IL-13, factores estimulantes de colonias, trombopoyetina, eritropoyetina, ligando de Flt3, y factor de necrosis tumoral 1 α (TNF α). Otros ejemplos se describen en Dijke y col. (1989); Mulder y col. (1998); Ziegler y col. (1997). Hormonas adecuadas incluyen, aunque no de forma limitativa, la hormona antimülleriana (o factor inhibidor mülleriano u hormona inhibidora mülleriana), adiponectina, hormona adrenocorticotrópica (o corticotropina), angiotensinógeno y angiotensina, hormona antidiurética (o vasopresina, arginina vasopresina), péptido atrial-natriurético (o atriopeptina), calcitonina, colecistoquinina, hormona liberadora de corticotropina, eritropoyetina, hormona estimulante del foliculo, gastrina, grelina, glucagón, hormona liberadora de la gonadotropina, hormona liberadora de la hormona del crecimiento, gonadotropina coriónica humana, lactógeno placentario humano, hormona del crecimiento, factor de crecimiento insulínico tipo 1, factor de crecimiento insulínico (o somatomedina), leptina, hormona luteinizante, hormona estimuladora de melanocitos MSH, orexina, oxitocina, hormona paratiroidea, prolactina, relaxina, secretina, somatostatina, trombopoyetina, hormona estimulante del tiroides (o tirotropina), y hormona liberadora de tirotropina.

Compuestos farmacéuticamente activos ilustrativos (por ejemplo, agentes terapéuticos) incluyen, aunque no de forma limitativa, los encontrados en Harrison y col., Physicians Desk Reference, Pharmacological Basis of Therapeutics (1990), United States Pharmacopeia, edición actual de *The Pharmacological Basis of Therapeutics* de Goodman y Oilman; y edición actual de *The Merck Index*.

En otra realización, el material elástico (o hidrogel formado a partir del mismo) incluye una población de células madre multipotentes o pluripotentes (descritas más adelante), y hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, morfógenos (p. ej., ácido retinoico, etc.) u otros de matriz extracelular (p. ej., fibronectina, laminina, colágeno, etc.) y otros materiales (p. ej., ADN, virus, otros tipos de células, etc.) que facilitan la diferenciación de la población celular a lo largo de una ruta de desarrollo específica una vez que el material elástico o hidrogel se ha implantado en el paciente. De forma alternativa o adicional, las células pueden diferenciarse *in vitro* durante el cultivo celular con el material o hidrogel elástico.

El agente bioactivo puede enlazarse covalentemente con el material elástico a través de un enlazante. El enlazante puede ser un enlazante escindible o un enlazante no escindible, dependiendo de la aplicación. Como se utiliza en la presente memoria, un “enlazante escindible” se refiere a los enlazantes susceptibles de escisión en diversas condiciones. Las condiciones adecuadas para la escisión pueden incluir, aunque no de forma limitativa, pH, irradiación con UV, actividad enzimática, temperatura, hidrólisis, eliminación y reacciones de sustitución, reacciones redox y propiedades termodinámicas de la unión. En muchos casos, la naturaleza prevista de la interacción de la conjugación o de acoplamiento, o el efecto biológico deseado, determinarán la elección del grupo enlazante.

Excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, diluyentes u otros vehículos líquidos, coadyuvantes de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según sea adecuado para la forma de dosificación específica deseada. Gennaro (2006) describe varios excipientes utilizados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de las mismas. Salvo en la medida en que algún excipiente convencional resulte incompatible con una sustancia o sus derivados, tal como al producir un efecto biológico no deseable o de cualquier otra forma al interactuar de forma nociva con otro(s) componente(s) del hidrogel, se contempla su uso dentro del ámbito de esta invención.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables utilizados en la elaboración de composiciones farmacéuticas incluyen, aunque no de forma limitativa, diluyentes inertes, agentes dispersantes y/o granulantes, agentes tensioactivos y/o emulsionantes, agentes desintegrantes, agentes aglutinantes, conservantes, agentes tamponadores, agentes lubricantes y/o aceites. Dichos excipientes pueden incluirse de forma opcional en las soluciones que contienen tropoelastina. Excipientes tales como agentes colorantes, agentes de recubrimiento, edulcorantes, agentes saborizantes y agentes de perfume pueden estar presentes en la solución, de acuerdo con el criterio del formulador. Pueden encontrarse consideraciones generales en la formulación y/o fabricación de agentes farmacéuticos en, por ejemplo, Gennaro (2006).

La cantidad de tropoelastina y de agente biológicamente activo presente en el material dependerá necesariamente del medicamento en particular y de la condición a tratar. Un experto en la técnica conocerá los agentes y cantidades de uso adecuados para tratar la condición.

Puede suministrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de un material de la presente invención a un paciente y/o a un organismo antes de, simultáneamente con, y/o después del diagnóstico, con una enfermedad, trastorno y/o condición. En algunas realizaciones, se suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de un material de la presente invención a un paciente y/o organismo antes de, simultáneamente con, y/o después de, la aparición de síntomas de una enfermedad, trastorno, y/o condición.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz”, como se usa en la presente memoria, se refiere a una cantidad del material de la presente invención que sea suficiente para tratar, aliviar, mejorar, retrasar el inicio de, inhibir la progresión de, o reducir la severidad de, y/o reducir la incidencia de, uno o más síntomas o características de la enfermedad, trastorno o condición.

- 5 Como se ha mencionado anteriormente, los materiales de la presente invención pueden utilizarse para aplicaciones de ingeniería de tejidos. En algunas realizaciones, la ingeniería de tejidos tiene como fin sustituir, reparar y/o regenerar el tejido y/o la función del órgano o para crear tejidos y órganos artificiales para el trasplante. En general, los esqueletos utilizados en ingeniería de tejidos (por ejemplo, esqueletos de hidrogel) imitan a la ECM natural y proporcionan un soporte para la adhesión, migración, y proliferación de células. De forma ideal, permiten una función
- 10 diferenciada, generación de tejido nuevo y su organización tridimensional. Las características deseadas de los esqueletos elásticos incluyen parámetros físicos tales como resistencia mecánica y degradabilidad, mientras que las propiedades biológicas incluyen biocompatibilidad y la capacidad de proporcionar un microambiente biológicamente relevante. Los materiales biodegradables son ventajosos porque después de que haya crecido el tejido, las estructuras resultantes están hechas totalmente o casi totalmente de componentes biológicos.
- 15 En algunas realizaciones, los materiales a utilizar para el suministro de medicamentos pueden alterarse en modos que dan lugar a mejores tiempos de residencia, un mejor suministro sostenido del medicamento y/o a un mejor suministro dirigido del medicamento. Las propiedades del material, tales como la permeabilidad (por ejemplo, aplicaciones de liberación prolongada), naturaleza que responde al ambiente (por ejemplo, aplicaciones de liberación pulsátil), funcionalidad de superficie (por ejemplo, recubrimientos de PEG para una liberación invisible), biodegradabilidad (por
- 20 ejemplo, aplicaciones bioreabsorbibles), y sitios de biorreconocimiento de superficies (por ejemplo, aplicaciones de liberación dirigida y bioadhesión), pueden alterarse y/o optimizarse para aplicaciones de suministro controlado de medicamentos. Por ejemplo, controlando la longitud de cadena de la tropoelastina, la composición de la tropoelastina y/o la concentración de tropoelastina, es posible controlar la densidad del material. El control de la densidad hace posible, entre otras cosas, controlar las propiedades de liberación sostenida del material resultante.
- 25 En algunas realizaciones, las enzimas pueden encapsularse dentro de los materiales para crear sistemas de suministro de medicamentos sensibles a los analitos biológicos.

Los materiales elásticos descritos en la presente memoria pueden incluir adicionalmente uno o más aditivos. Los aditivos se pueden resolver (biodegradables) polímeros, manitol, azúcar de almidón, inosita, sorbitol, glucosa, lactosa, sacarosa, cloruro de sodio, cloruro de calcio, aminoácidos, cloruro de magnesio, ácido cítrico, ácido acético, ácido hidroxil

30 butanodioico, ácido fosfórico, ácido glucurónico, ácido glucónico, polisorbitol, acetato sódico, citrato sódico, fosfato sódico, estearato de cinc, estearato de aluminio, estearato de magnesio, carbonato sódico, bicarbonato sódico, hidróxido sódico, polivinilpirrolidona, polietilenglicoles, carboximetilcelulosas, metilcelulosas, almidón, micropartículas, nanopartículas, aprotinina, Factor XIII, o sus mezclas. Sin pretender imponer ninguna teoría, uno o más aditivos en el material pueden alterar (por ejemplo, reducir o aumentar) la velocidad de degradación del material.

- 35 En algunas realizaciones, los materiales descritos en la presente memoria pueden utilizarse para aplicaciones de cultivos de tejidos *in vitro*. En determinadas realizaciones, los materiales descritos pueden utilizarse para desarrollar ensayos que sean útiles para el descubrimiento de medicamentos y para estudios biológicos (por ejemplo, ensamblar conjuntos de materiales bien definidos para la selección de medicamentos de alto rendimiento). Por ejemplo, puede utilizarse la presencia de células alimentadoras (por ejemplo, células endoteliales o fibroblastos) en presencia de células funcionales
- 40 (por ejemplo, hepatocitos) para aumentar el mantenimiento del tipo de célula funcional. Por lo tanto, es posible generar estructuras tridimensionales que imiten la estructura nativa de órganos funcionales que puedan utilizarse posteriormente para el descubrimiento de medicamentos y/o de ensayos de diagnóstico.

Un experto en la técnica entenderá que cuando las células que se incorporen al material elástico no son estables en las condiciones necesarias para formar el material elástico, las células deberán añadirse después de que ya se haya formado el material elástico. Por ejemplo, las células pueden estar presentes en la solución acuosa utilizada para formar un hidrogel a partir del material elástico.

45

En algunas realizaciones, los materiales descritos en la presente memoria pueden utilizarse para ensayos de toxicidad que puedan ensayar la toxicidad de una sustancia de prueba (por ejemplo, utilizando materiales en los que se han encapsulado hepatocitos).

- 50 En algunas realizaciones, los materiales descritos en la presente memoria pueden utilizarse para elaborar y recubrir diversas estructuras, tales como canales microfluídicos. En este enfoque, las paredes de los microcanales pueden fabricarse a partir de conjuntos de construcción en vez a partir de materiales más comúnmente utilizados, tales como poliestireno, vidrio y PDMS. Los canales microfluídicos fabricados a partir de conjuntos de construcción podrían ser útiles para muchos propósitos, por ejemplo, en aplicaciones en las que es deseable que las paredes
- 55 del canal microfluídico atraigan y se unan a células.

En algunas realizaciones, los materiales descritos en la presente memoria pueden utilizarse para aplicaciones de diagnóstico. Como un simple ejemplo, los materiales cargados con células pueden utilizarse para generar materiales similares a tejidos y/o conjuntos de materiales que pueden utilizarse en ensayos que prueben la

presencia de uno o más microbios específicos. Por ejemplo, si se supiera que un microbio (por ejemplo, bacterias, virus, hongos, etc.) se une específicamente a un tejido particular, podrían fabricarse materiales similares a tejidos que pudieran determinar la presencia del microbio en la muestra.

Los materiales descritos en la presente memoria pueden tener un patrón (p. ej., un material elástico con micropatrones). Los materiales con micropatrones pueden prepararse utilizando, por ejemplo, un método que incluye poner en contacto una solución de tropoelastina con una superficie de un molde, incluyendo el molde, en al menos una superficie del mismo, una configuración negativa tridimensional de un micropatrón predeterminado que se dispone sobre, y que forma parte de, al menos una superficie del material elástico, y calentando la solución mientras está en contacto con la superficie con micropatrones del molde, proporcionando con ello un material elástico con micropatrones. Los materiales elásticos preparados de este modo incluyen un micropatrón predeterminado y diseñado en al menos una superficie del material, cuyo patrón es eficaz para facilitar el alineamiento celular, la reparación, el crecimiento o la regeneración del tejido, o es eficaz para proporcionar el suministro de una proteína o de un agente terapéutico. La geometría del micropatrón puede controlarse utilizando los moldes del patrón o tamaño adecuados. Además, el micropatrón puede caracterizarse en cuanto a la morfología superficial mediante técnicas conocidas, tales como microscopía de barrido de emisión de campo y microscopía de fuerza atómica.

En algunas realizaciones, el micropatrón tiene forma de surcos o canales. El tamaño de la ranura (anchura) puede ser de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 500 μm . En algunas realizaciones, el tamaño de la ranura puede ser de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 250 μm , de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 100 μm , o de aproximadamente 20 μm a aproximadamente 75 μm . En algunas realizaciones, el tamaño de la ranura es aproximadamente 50 μm o aproximadamente 20 μm .

La separación entre las ranuras también puede optimizarse para su uso deseado. Por ejemplo, la separación entre las ranuras puede variar de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 500 μm . En algunas realizaciones, la distancia entre las ranuras puede ser de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 250 μm , de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 100 μm , o de aproximadamente 20 μm a aproximadamente 75 μm . En algunas realizaciones, la distancia entre las ranuras es aproximadamente 50 μm o aproximadamente 20 μm .

La profundidad del grosor de la ranura puede ser de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 500 μm . En algunas realizaciones, el espesor de la ranura puede ser de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 250 μm , o de aproximadamente 750 nm a aproximadamente 1000 nm.

Como se ha mencionado anteriormente, los materiales elásticos descritos en la presente memoria pueden utilizarse en la ingeniería y reparación de tejidos. Como se utiliza en la presente memoria, el término “reparación” se refiere a cualquier corrección, refuerzo, reacondicionamiento, remedio, reposición, sanación, renovación, enmienda, parcheado, o similar que restaure la función. Por tanto, el término “reparación” también puede querer decir corregir, reforzar, reacondicionar, remediar, reponer, sanar, renovar, enmendar, parchear o de otro modo restablecer la función.

Un experto en la técnica entenderá que los hidrogeles formados a partir de los materiales elásticos de la presente invención también pueden utilizarse en la reparación e ingeniería de tejidos.

Por ello, cuando el material elástico de la presente invención se menciona en estos contextos, se entenderá que, cuando proceda, los hidrogeles formados a partir de los materiales pueden utilizarse además de, o como una alternativa a, los materiales elásticos mismos. Un experto en la técnica entenderá también que los hidrogeles pueden formarse a partir de los materiales elásticos simplemente por el contacto de los materiales elásticos con condiciones fisiológicas, gracias a que el material elástico absorbe agua del entorno circundante.

Por “tratamiento”, “prevención” o “mejora” se quiere decir retardar o evitar el inicio, revertir, aliviar, mejorar, inhibir, ralentizar o detener la progresión, agravamiento, deterioro o la progresión de la severidad de una condición asociada a una enfermedad o trastorno.

Los materiales elásticos de la presente invención pueden administrarse utilizando cualquier cantidad y cualquier vía de administración eficaz para el tratamiento. La cantidad exacta requerida variará de un paciente a otro, dependiendo de la especie, edad y estado general del paciente, de la severidad de la infección, del hidrogel particular, de su modo de administración, de su modo de actividad, etc.

En otra realización, los materiales elásticos descritos en la presente memoria se utilizan en medicina regenerativa para aplicaciones osteopáticas que incluyen, aunque no de forma limitativa, aplicaciones craneofaciales, dentales, y periodónticas. En una realización se proporciona una construcción o dispositivo que incluye un material elástico (o hidrogel formado a partir de un material elástico) para usar en la reconstrucción y regeneración de tejidos orales y craneofaciales.

En realizaciones particulares, el material elástico (o hidrogel formado a partir del material elástico) incluye uno o más monómeros de tropoelastina y colágeno humano. Los materiales resultantes y los hidrogeles se diseñan para lograr la topografía superficial, porosidad, resistencia y elasticidad deseadas. En algunas realizaciones, el material elástico o hidrogel no contiene proteínas o polipéptidos que no sean tropoelastina.

En una realización, el material elástico se moldea en forma de lámina y puede utilizarse como una membrana regenerativa en diversas aplicaciones clínicas, p. ej., la guided tissue regeneration (regeneración tisular guiada - GTR) o los procedimientos de cobertura de raíz. En una realización, el material elástico se moldea como una lámina y se siembra con periodontal ligament cells (células de ligamento periodontal - PDL) formando un implante o injerto que es adecuado para usar en un procedimiento de cobertura de la raíz. Una vez se ha formado el implante, un cirujano injerta el implante en un procedimiento de cobertura de raíz utilizando métodos conocidos por un experto en la técnica.

En otra realización, el material elástico se moldea en una forma tridimensional para usar como material de relleno óseo. Puede conseguirse prácticamente cualquier forma debido a que la solución precalentada es moldeable. Una vez puesta en un molde o en el área deseada, la solución puede “endurecerse” aplicando calor. Además, el material puede soportar aplicaciones clínicas únicas en medicina periodontal para procedimientos de guided bone regeneration (regeneración ósea guiada- GBR) y eliminar la necesidad de una carga ósea y de una membrana para contener el injerto óseo.

En una realización particular, el material elástico (o hidrogel formado a partir del material), o un implante que comprende el material elástico o el hidrogel formado a partir del material, se moldea a una forma deseada, e incluye una o más poblaciones de células.

En general, las células que se utilizarán según la presente invención son cualquier tipo de células. Las células deberán ser viables cuando se incorporan a los materiales elásticos de la presente invención (o hidrogeles formados a partir de los materiales elásticos). En algunas realizaciones, las células adecuadas incluyen, aunque no de forma limitativa, células de mamífero (por ejemplo las células humanas, células de primate, células de mamífero, células de roedores, etc.), células aviares, células de peces, células de insectos, células vegetales, células fúngicas, células bacterianas, y células híbridas. En algunas realizaciones, las células ilustrativas incluyen las células madre, las células totipotentes, células pluripotentes, y/o células madre embrionarias. En algunas realizaciones, las células ilustrativas incluyen, aunque no de forma limitativa, células primarias y/o líneas celulares procedentes de cualquier tejido. Según la presente invención pueden utilizarse, por ejemplo, cardiomiocitos, miocitos, hepatocitos, queratinocitos, melanocitos, neuronas, astrocitos, células madre embrionarias, células madre adultas, células madre hematopoyéticas, células hematopoyéticas (por ejemplo monocitos, neutrófilos, macrófagos, etc.), ameloblastos, fibroblastos, condrocitos, osteoblastos, osteoclastos, neuronas, células espermáticas, óvulos, hepatocitos, células epiteliales de pulmón, células epiteliales del intestino, células epiteliales del intestino, hígado, células epiteliales de la piel, etc., y/o híbridos de las mismas.

Células de mamífero ilustrativas incluyen, aunque de forma no limitativa, human umbilical vein endothelial cells (células endoteliales humanas de la vena umbilical - HUVEC), Chinese hamster ovary (células de ovario de hámster chino - CHO), células HeLa, Madin-Darby canine kidney (células renales caninas de Madin-Darby - MDCK), riñón de hámster pequeño (células BHK), células NS0, células MCF-7, células MDA-MB-438, células U87, células A172, células HL60, células A549, células SP10, células DOX, células DG44, células HEK 293, SHSY5Y, células Jurkat, células BCP-1, células COS, células Vero, células GH3, células 9L, células 3T3, células C3T3, células C3H-10T1/2, células NIH-3T3, y células C6/36.

En una determinada realización, una o más poblaciones celulares incluyen células madre de médula ósea, células madre mesenquimales o células preosteoblásticas para facilitar la regeneración del tejido o del hueso. Además, el potencial osteogénico del material/hidrogel/implante puede utilizarse como una terapia sola o en combinación con productos comerciales de carga ósea actualmente disponibles o como extracciones óseas autólogas primarias. Un experto en la técnica reconocerá que puede repararse, reemplazarse o regenerarse mediante las técnicas anteriores cualquier tipo de hueso.

En algunas realizaciones, las condiciones en las que se incluyen células en los materiales elásticos (o hidrogeles formados a partir de los mismos) se alteran para maximizar la viabilidad celular. En algunas realizaciones, puede ser necesario regular y/o alterar las condiciones (por ejemplo de pH, fuerza iónica, disponibilidad de nutrientes, temperatura, disponibilidad de oxígeno, osmolaridad, etc.) del entorno circundante para maximizar la viabilidad celular.

La viabilidad celular puede medirse monitorizando uno de los muchos indicadores de viabilidad celular. En algunas realizaciones, los indicadores de viabilidad celular incluyen, aunque no de forma limitativa, actividad esterasa intracelular, integridad de la membrana plasmática, actividad metabólica, expresión génica, y expresión de proteínas. Por mencionar solo un ejemplo, cuando se exponen las células a un sustrato fluorogénico de esterasa (por ejemplo la calceína AM), las células vivas presentan una fluorescencia verde como resultado de la actividad esterasa intracelular que hidroliza el sustrato de la esterasa para formar un producto fluorescente verde. Otro ejemplo, cuando las células se exponen a una tinción de ácido nucleico fluorescente (por ejemplo, homodímero 1 de etidio), las células muertas emiten fluorescencia roja porque sus membranas plasmáticas están comprometidas siendo, por tanto, permeables a la tinción de ácido nucleico de alta afinidad.

En general, el porcentaje de células en el material (o en el hidrogel formado a partir del mismo) es un porcentaje que permite la formación de materiales elásticos y/o de hidrogeles según la presente invención. En algunas realizaciones, el porcentaje de células adecuado está comprendido entre aproximadamente 0,1 % p/p y aproximadamente 80 % p/p, entre aproximadamente 1,0 % p/p y aproximadamente 50 % p/p, entre aproximadamente 1,0 % p/p y aproximadamente 40 % p/p, entre aproximadamente 1,0 % p/p y aproximadamente 30 % p/p, entre aproximadamente 1,0 % p/p y aproximadamente 20 % p/p, entre aproximadamente 1,0 % p/p y aproximadamente 10 % p/p, entre

aproximadamente 5,0 % p/p y aproximadamente 20 % p/p, o entre aproximadamente 5,0 % p/p y aproximadamente 10 % p/p. En algunas realizaciones, el porcentaje de células en una solución que sea adecuada para formar materiales elásticos según la presente invención es aproximadamente 5 % p/p. En algunas realizaciones, la concentración de células en una solución acuosa que es adecuada para formar hidrogeles según la invención está comprendida entre 1×10^5 células/ml y 1×10^8 células/ml, o entre aproximadamente 1×10^6 células/ml y 1×10^7 células/ml. En algunas realizaciones, un único material elástico o hidrogel formado a partir del mismo incluye una población de células y/o de tipos celulares idénticos. En algunas realizaciones, un único material elástico o hidrogel formado a partir del mismo incluye una población de células y/o de tipos celulares que no son idénticos. En algunas realizaciones, un único material elástico o hidrogel formado a partir del mismo puede incluir al menos dos tipos distintos de células. En algunas realizaciones, un único material elástico o hidrogel formado a partir del mismo puede incluir 3, 4, 5, 10, o más tipos de células.

Para cultivar y/o mantener células pueden utilizarse cualquiera de los diversos medios de cultivo celular existentes, incluidos medios complejos y/o medios de cultivo libres de suero, que sean capaces de soportar el crecimiento de uno o más tipos celulares o líneas celulares. De forma típica, un medio de cultivo celular contiene un tampón, sales, una fuente de energía, aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, etc.), vitaminas, y/o elementos traza. Los medios de cultivo celular pueden contener de forma opcional diversos otros ingredientes, incluidos, aunque no de forma limitativa, fuentes de carbono (por ejemplo, azúcares naturales, no azúcares naturales, etc.), cofactores, lípidos, azúcares, nucleósidos, componentes derivados de animales, hidrolizados, hormonas, factores de crecimiento, tensioactivos, indicadores, minerales, activadores de enzimas específicas, activadores, inhibidores de enzimas específicas, enzimas, sustancias orgánicas, y/o metabolitos de moléculas pequeñas. Los medios de cultivo celular adecuados para usar según la presente invención se comercializan desde diversas fuentes, por ejemplo, ATCC (Manassas, va.). En determinadas realizaciones, uno o más de los siguientes medios se utilizan para cultivar células: Medio RPMI 1640, medio Eagle modificado por Dulbecco, medio mínimo esencial Eagle, medio F-12K, medio de Dulbecco modificado por Iscove.

Como se ha explicado anteriormente, una ventaja significativa de la invención es el desarrollo de materiales (y de los hidrogeles correspondientes) con propiedades únicas, p. ej., resistencia a la tensión, elasticidad y flexibilidad/rigidez, generadas combinando 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más isoformas individuales de tropoelastina que en sí mismas tienen propiedades únicas. Estos materiales únicos (y los hidrogeles correspondientes) pueden personalizarse para usar en lugares en el cuerpo en donde sus propiedades únicas sean las más ventajosas. Por ejemplo, las fibras más fuertes pueden utilizarse para reparar músculos, las fibras más elásticas pueden utilizarse para fabricar vejigas y otros órganos flexibles (p. ej. vasos sanguíneos y tejidos cardíacos), y las fibras más rígidas pueden utilizarse en la reparación del cartílago.

La presente invención también se refiere a un método para reparar y/o restaurar el tejido biológico, comprendiendo el método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un material elástico de la presente invención a un paciente que lo necesite.

La presente invención también se refiere al uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un material elástico de la presente invención para reparar y/o restaurar tejido biológico.

En una realización, la invención proporciona un material elástico de la presente invención, cuando se utiliza en un método de reparación y/o restauración de tejido biológico.

La presente invención también se refiere al uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un material elástico de la presente invención para la reparación y/o regeneración de tejidos biológicos. La invención también incluye el uso de este material para la fabricación de un medicamento para la reparación y/o restauración de tejido biológico.

Como se ha mencionado anteriormente, se apreciará que, en estas realizaciones, un hidrogel formado a partir del material elástico de la presente invención, puede utilizarse como alternativa al material elástico, siempre que se trate adecuadamente (mediante, por ejemplo, la exposición a agua) para formar un hidrogel.

La presente invención también se refiere a un método para reparar y/o restaurar tejido biológico, que comprende las etapas de:

- identificar un paciente que tenga una lesión de tejido; y
- administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del material elástico de la presente invención,
- administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un hidrogel formado a partir del material elástico de la presente invención, o
- administrar al paciente una cantidad del material elástico de la presente invención para formar una cantidad terapéuticamente eficaz del hidrogel, seguido del tratamiento del material elástico de la presente invención para formar el hidrogel.

La presente invención también se refiere a un método para acelerar la reparación y/o regeneración de tejidos biológicos que comprende administrar a un paciente que lo necesite:

- una cantidad terapéuticamente eficaz del material elástico de la presente invención,
- una cantidad terapéuticamente eficaz de un hidrogel formado a partir del material elástico de la presente invención, o
- una cantidad del material elástico de la presente invención para formar una cantidad terapéuticamente eficaz del hidrogel, seguido del tratamiento del material elástico para formar el hidrogel.

- 5 Los materiales elásticos de la presente invención y los hidrogeles formados a partir de los mismos se formulan de forma típica en forma de unidades de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de los materiales y/o hidrogeles de la presente invención será decidido por el médico asistente dentro del ámbito de un juicio médico razonable.
- 10 El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente u organismo particular dependerá de diversos factores, incluido el trastorno que se está tratando y la severidad del trastorno; la actividad del ingrediente activo específico empleado; el polímero y/o las células específicas empleadas; edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el momento de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del ingrediente activo específico empleado; la duración del tratamiento; medicamentos utilizados en combinación o en coincidencia con el ingrediente activo específico empleado; y factores similares bien conocidos en la industria médica.
- 15 Los materiales de la presente invención (y los hidrogeles formados a partir de los mismos) pueden administrarse por cualquier ruta. En algunas realizaciones, los materiales de la presente invención se administran mediante diversas rutas, incluida la administración directa en un sitio afectado. Por ejemplo, los materiales (y/o hidrogeles formados a partir de los mismos) pueden administrarse localmente cerca de un sitio que necesita regeneración tisular.
- 20 En determinadas realizaciones, los materiales elásticos de la presente invención (y/o hidrogeles formados a partir de los mismos) pueden administrarse de modo que las células incluidas y/o los agentes terapéuticos a suministrar se liberan a concentraciones que van de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de peso corporal del paciente al día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado. La dosificación deseada puede administrarse, por ejemplo, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas, o cada cuatro semanas. En ciertas realizaciones, la dosificación deseada puede suministrarse utilizando administraciones múltiples (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o más administraciones).
- 25 30 En algunas realizaciones, la presente invención abarca “cócteles terapéuticos” que comprenden los materiales elásticos de la presente invención (y/o hidrogeles formados a partir de los mismos). En algunas realizaciones, los materiales incluyen un único tipo celular y, de forma opcional, un agente terapéutico. En algunas realizaciones, los materiales incluyen múltiples tipos distintos de células y, de forma opcional, un agente terapéutico.
- 35 Se apreciará que los materiales elásticos cargados de células según la presente invención (y los hidrogeles formados a partir de los mismos) pueden emplearse en terapias combinadas. La combinación particular de terapias (terapéutica o procedimientos) a emplear en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de la terapéutica y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico deseado a conseguir. Se apreciará que las terapias empleadas pueden conseguir el efecto deseado para el mismo propósito (por ejemplo, un hidrogel que comprende un determinado tipo de célula que se utilice para favorecer el crecimiento de los tejidos puede administrarse simultáneamente con otro agente terapéutico utilizar para estimular el crecimiento del mismo tejido), o pueden conseguir efectos distintos (por ejemplo, control de cualquier efecto adverso, tal como inflamación, infección, etc.).
- 40 La invención proporciona diversos kits que comprenden uno o más de los materiales de la presente invención. Por ejemplo, la invención proporciona un kit que comprende un material elástico e instrucciones de uso. Un kit puede incluir múltiples materiales elásticos distintos. Un kit puede incluir de forma opcional monómeros de tropoelastina, una solución concentrada de monómeros de tropoelastina, monómeros de tropoelastina asociados, compuestos biológicamente activos, y similares. Un kit puede incluir cualquiera de varios componentes o reactivos adicionales en cualquier combinación. No se explican de forma explícita todas las diversas combinaciones, pero cada combinación se incluye en el ámbito de la invención. Algunos kits ilustrativos proporcionados según la presente invención se describen en los párrafos siguientes.
- 45 50 Según determinadas realizaciones de la invención, un kit puede incluir, por ejemplo, (i) una solución de monómeros de tropoelastina; (ii) un molde; y (iii) instrucciones para calentar y formar un material elástico a partir de la solución.
- Un kit también puede incluir, por ejemplo, (i) concentrado de monómeros de tropoelastina; (ii) un molde; y (iii) instrucciones para formar un material elástico a partir del concentrado.
- 55 Los kits también pueden incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

Los kits incluyen de forma típica instrucciones de uso de los materiales de la presente invención. Las instrucciones pueden incluir, por ejemplo, protocolos y/o describir condiciones para la producción de materiales elásticos, administración de los materiales a un paciente que los necesite, producción de conjuntos de material, etc. Los kits incluirán de forma general uno o más recipientes o envases para que algunos o todos los componentes y reactivos individuales puedan alojarse por separado. Los kits pueden incluir también un medio para contener recipientes individuales en un confinamiento relativamente reducido para su venta comercial, por ejemplo, una caja de plástico, en la que puedan confinarse las instrucciones, materiales de envasado tales como espuma de poliestireno, etc.

El kit o “artículo de fabricación” puede incluir un envase y una etiqueta o prospecto sobre, o asociado con, el envase. Unos recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, envases de blíster, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de diversos materiales, tales como vidrio o plástico. La etiqueta o el prospecto indican que la construcción o composición se utilizan para tratar la condición correspondiente. En una realización, la etiqueta o el prospecto incluye instrucciones de uso e indica que la composición terapéutica puede utilizarse para reparar o regenerar tejidos.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Uso de agua como disolvente para la tropoelastina

Se disolvieron 100 mg de tropoelastina en 333 µl de agua a 4 °C. Se utilizó una jeringa de calibre 31 de 1 ml para poner una gota de solución de tropoelastina sobre un portaobjetos de vidrio. Puesta a 160 °C durante 1 minuto. Se añadió una gota adicional de tropoelastina; se dejó durante 1 min antes de añadir otra gota más. Se repitió aproximadamente 10 veces. Se dejó a 160 °C durante 4 h. El material se tornó vítreo y marrón oscuro (A). Se puso en PBS, se humedeció lentamente, no se disolvió y se volvió bastante elástico (B).

Ejemplo 2 - Uso de HFP como disolvente para la tropoelastina

Se disolvieron 100 mg de tropoelastina en 500 µl de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP) durante la noche a temperatura ambiente. Se utilizó una jeringa de calibre 31 de 1 ml para poner gotas de solución de tropoelastina sobre un portaobjetos de vidrio puesto encima de un bloque calefactor puesto a 70 °C. Se puso a 160 °C durante 4 h. El material pareció burbujear en el horno y se volvió vítreo y marrón (A). Se puso en PBS, humedecido lentamente, se volvió blando y elástico, parecía tener burbujas de gas atrapadas dentro del material (B).

Ejemplo 3 - Uso de etanol a 70 % como disolvente para la tropoelastina

Se disolvieron 100 mg de tropoelastina en 650 µl de etanol a 70 % (154 mg/ml). Se utilizó una jeringa de calibre 31 de 1 ml para poner gotas de solución de tropoelastina sobre un portaobjetos de vidrio puesto encima de un bloque calefactor puesto a 85 °C. Se pudo crear una estructura 3D gota a gota esperando ~1 min entre cada gota. Se puso en un horno a 160 °C durante 4 h. El material pareció burbujear en el horno y se volvió vítreo y marrón oscuro.

Ejemplo 4 - Recubrimiento de un objeto inanimado

Se utilizó tropoelastina en HFP a 20 % p/v para recubrir una pieza de tubos Tygon mediante inmersión repetida en la solución. El tubo recubierto se puso a 160 °C durante 4 h. La solución de tropoelastina se volvió dura y vítrea y no podría retirarse del tubo. Se humedeció con PBS. El material se volvió blando y elástico, podía desprenderse del tubo y no se disolvió.

Ejemplo 5 - Electrohilado

Tropoelastina electrohilada a 20 % (p/v) en HFP, 1 cm³/h (1 ml/h), ~17 cm de la punta de jeringa al colector, 20 kV(+)/puesto a tierra, 0,1 ml de solución, hilos alineados en el colector a 2 cm de distancia entre sí y 4 cm de longitud. Se puso a 160 °C durante 24 h. Humedecido con PBS no se disolvió; se volvió similar a un gel, conservó la forma. Comprobado por SEM.

Ejemplo 6 - Crecimiento in vitro de fibroblastos dérmicos humanos sobre tropoelastina electrohilada tratada con calor.

La tropoelastina en HFP a 20 % (p/v) se electrohiló como se ha descrito anteriormente. Se sembraron fibroblastos dérmicos neonatales humanos (NHF8909; 5 x 10⁵ células/pocillo) sobre fibras alineadas electrohiladas tratadas con calor ancladas a cubreobjetos de plástico en 6 placas de pocillos. Después de 48 horas de cultivo en DMEM + 10 % FBS + Pen/estrep a 37 °C en 5 % de CO₂ se prepararon las muestras para análisis por SEM. Las muestras se fijaron con glutaraldehído a 2 % en cacodilato sódico 0,1 M/sacarosa 0,1 M, se fijaron con osmio a 1 %, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, se montaron y se recubrieron con oro. La tropoelastina electrohilada tratada con calor favoreció la adhesión, dispersión y proliferación celular.

Ejemplo 7 - Implantación subcutánea de tropoelastina electrohilada tratada con calor en ratones.

Se prepararon construcciones electrohiladas no alineadas de tropoelastina utilizando tropoelastina en HFP a 20 %. Las muestras se electrohilaban a 20 kV en un colector redondo (no alineado) a una distancia de 17 cm, 1 cm³/h (1 ml/h). Se utilizaron 0,2 ml de solución por construcción. Se puso a 160 °C durante 22 h.

Se implantó a cada ratón una construcción de tropoelastina electrohilada no alineada tratada con calor y un control Integra. Dos ratones para cada punto temporal a 1 semana, 3 semanas y 6 semanas. La implantación subcutánea se llevó a cabo con dos incisiones de 10 mm realizadas en el dorso de cada ratón y se diseccionaron para crear bolsas subcutáneas. Se insertaron dentro de cada bolsa esqueletos electrohilados o el esqueleto Integra (Integra LifeSciences Corporation) sin una capa externa de silicona. Las heridas se cerraron con suturas de seda 6-0 y se cubrieron utilizando apósitos para heridas IV3000 (Smith & Nephew) durante 5 días. Se administró carprofeno (5 mg/kg) en el momento de la anestesia y seguidamente al día siguiente posterior a la cirugía para analgesia. Tras la cirugía, cada ratón se enjauló individualmente durante los primeros dos días y seguidamente dos ratones por jaula posteriormente, con libre acceso a agua y comida. Se recogieron las biopsias de piel para análisis histológico 1, 3 y 6 semanas después de la implantación. Los esqueletos explantados y la piel circundante se tiñeron con Verhoeff Van Gieson (VVG), demostrando la naturaleza elástica del implante.

La tropoelastina electrohilada tratada con calor persistió en ratones durante un mínimo de 6 semanas tras la implantación.

Ejemplo 8 - Películas de tropoelastina basada en agua tratada con calor

Se disolvieron 100 mg de tropoelastina en 1 ml de agua a 4 °C. La solución se pipeteó en pocillos de un portaobjetos de cámara de vidrio de 8 pocillos. La solución se concentró y secó poniéndola a 37 °C durante 16 h. Las muestras se calentaron posteriormente a 160 °C durante 4 horas. Tras calentar a 37 °C, los esqueletos son traslúcidos y de color marrón claro. Tras calentar a 160 °C, las muestras son todavía translúcidas pero de color más oscuro.

Ejemplo 9 - Películas de tropoelastina basadas en agua y tratadas con calor con micropatrones

Se disolvieron 70 mg tropoelastina en 1 ml de agua a 4 °C. La solución se pipeteó a un molde de PDMS (polidimetilsiloxano) que contenía surcos de 3,5 µm de ancho, y 500 nm de profundidad. La solución se concentró y se secó poniéndola a 37 °C durante 16 h. Las muestras se calentaron posteriormente a 160 °C durante 4 horas. Se obtuvieron imágenes utilizando un microscopio óptico con objetivos de 20x y 40x.

Referencias

al-Obeidi, F. y col. Peptide and peptidomimetic libraries: molecular diversity and drug design. *Mol Biotechnol* 9(3), 205-223 (1998).

Altschul, S. F. y col. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3), 403-410 (1990).

Altschul, S. F. y col. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25(17), 3389-3402 (1997).

Anderson y col. Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 22, 863-866 (2004).

Anderson y col. Biomaterial microarrays: rapid, microscale screening of polymer-cell interaction. *Biomaterials* 26, 4892-4897 (2005).

Coulson J. M. y col., Chemical Engineering, 1978, volume 2, 3rd Edition, Pergamon Press, 126.

Dijke y col. Growth factors for wound healing. *Bio/Technology* 7, 793-798 (1989).

Falsey y col. Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays. *Bioconjugate Chemistry* 12, 346-353 (2001).

Gennaro, A. R., *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st ed. (2006), Lippincott Williams & Wilkins.

Gilman y col. (eds) *Organic Syntheses Collective Volumes*, John Wiley & Sons, Inc., NY.

Harrison, T. R. y col. (eds) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 13th Edition, McGraw-Hill N.Y., NY.

Higgins, D. G. y col. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22), 4673-4680 (1994).

Hruby, V. J. y col. Synthesis of oligopeptide and peptidomimetic libraries. *Curr OpinChem Biol* 1(1), 114-119 (1997).

Karlin, S. y Altschul, S. F. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(6), 2264-2268 (1990).

Karlin, S. y Altschul, S. F. Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(12), 5873-5877 (1993).

Miyamoto, K. y col. Creation of cross-linked electrospun isotypic-elastin fibers controlled cell-differentiation with new cross-linker. *Int J Biol Macromolecules* 45, 33-41 (2009).

- Li, M. y col. Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials* 26(30), 5999-6008 (2005).
- Li, M. y col. Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications. *Biomaterials* 27(13), 2705-2715 (2006).
- Liu y col. Nanostructured materials designed for cell binding and transduction. *Biomacromolecules* 2(2), 362-368 (2001).
- 5 Mulder GD, Haberer PA, Jeter KF (eds). Clinicians' Pocket Guide to Chronic Wound Repair. 4th ed. Springhouse, PA: Springhouse Corporation; 1998:85.
- Orner y col. Arrays for the combinatorial exploration of cell adhesion. *Journal of the American Chemical Society* 126, 10808-10809 (2004).
- 10 Ostergaard, S. y Holm, A. Peptomers: a versatile approach for the preparation of diverse combinatorial peptidomimetic bead libraries. *Mol Divers* 3(1), 17-27 (1997).
- Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th Edition, Goodman and Gilman, 1990.
- Physicians Desk Reference, 50th Edition, 1997, Oradell New Jersey, Medical Economics Co.
- Tauriari, G. y col. Polymer microarrays for cellular adhesion. *Chem Comm* 2118-2120 (2006).
- United States Pharmacopeia, The National Formulary, USP XII NF XVII, 1990.
- 15 Ziegler T.R., Pierce, G.F., y Herndon, D.N., 1997, International Symposium on Growth Factors and Wound Healing: Basic Science & Potential Clinical Applications (Boston, 1995, Sero Symposia USA), Publisher: Springer Verlag.

REIVINDICACIONES

1. Un método para formar un material elástico, que incluye:
 - proporcionar una solución acuosa de monómeros de tropoelastina;
 - aplicar la solución a una superficie;
- 5 - calentar la solución sobre la superficie a una temperatura de 60 °C a 200 °C para permitir que los monómeros de tropoelastina se unan entre sí para formar un material elástico que no se disocie en monómeros de tropoelastina cuando el material se expone a condiciones fisiológicas, formando de este modo el material elástico.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el material elástico no se disocia en monómeros de tropoelastina cuando el material:
 - 10 - se pone en contacto con una solución acuosa con un pH de 6,5 a 8,0,
 - se pone en contacto con una solución acuosa con una temperatura de 30 a 45 °C, y/o
 - se pone en contacto con una solución acuosa con una concentración de sal de 75 mM a 300 mM.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el material elástico tiene un contenido de disolvente superior a 0 a 50 % (p/p) del material en el momento de completar la etapa de calentamiento.
- 15 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la solución se forma mediante un proceso que incluye las etapas de:
 - proporcionar una solución de monómeros de tropoelastina;
 - aumentar la concentración de monómeros de tropoelastina en la solución.
5. El método de la reivindicación 4, en donde se aumenta la concentración de monómeros de tropoelastina mediante evaporación del disolvente de la solución, en donde preferiblemente el disolvente se evapora de la solución cuando la solución se aplica a la superficie, y en donde preferiblemente el disolvente se evapora permitiendo la concentración de los monómeros de tropoelastina a medida que la solución se calienta en la superficie a una temperatura que permite que los monómeros de tropoelastina se unan entre sí para formar un material elástico que no se disocie en monómeros de tropoelastina cuando el material se pone en contacto con una solución acuosa.
- 20 25 6. El método de la reivindicación 4, en donde la concentración de monómeros de tropoelastina aumenta separando los monómeros de tropoelastina del disolvente, y en donde preferiblemente los monómeros de tropoelastina se separan del disolvente mediante el electrohilado de los monómeros de tropoelastina.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la solución tiene una concentración de monómeros de tropoelastina de 1 a 40 % (p/V) en el momento en que la solución se aplica a la superficie.
- 30 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la solución incluye monómeros de tropoelastina coacervados.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los monómeros contienen dominios hidrófobos e hidrófilos de tropoelastina.
- 35 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los monómeros tienen una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la tropoelastina humana a lo largo de al menos 50 aminoácidos consecutivos, y en donde preferiblemente los monómeros son monómeros de tropoelastina recombinante que tienen la secuencia de una isoforma de tropoelastina humana.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la solución se aplica a la superficie pulverizando la solución sobre la superficie.
- 40 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la superficie se proporciona en forma de una matriz, molde o colada que permite que el material elástico formado por el proceso reciba una forma predefinida.
13. Un método para formar un hidrogel elástico, que incluye:
 - 45 - formar un material elástico según un método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores;
 - poner en contacto el material elástico con una solución acuosa.

Figura 1

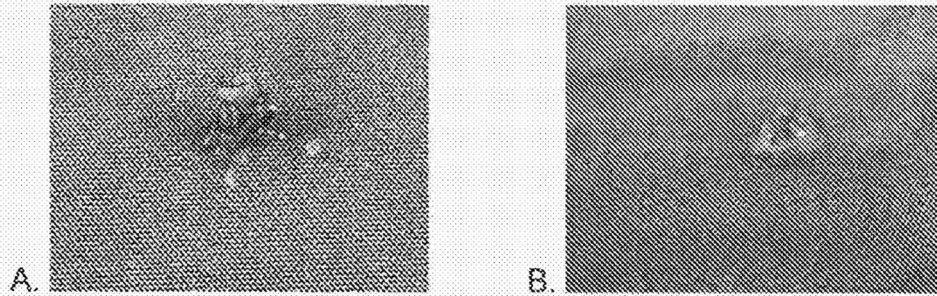


Figura 2

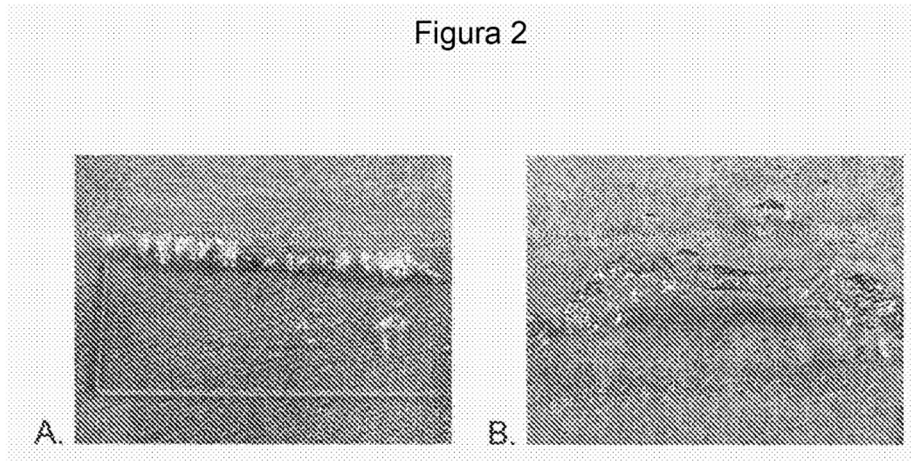


Figura 3

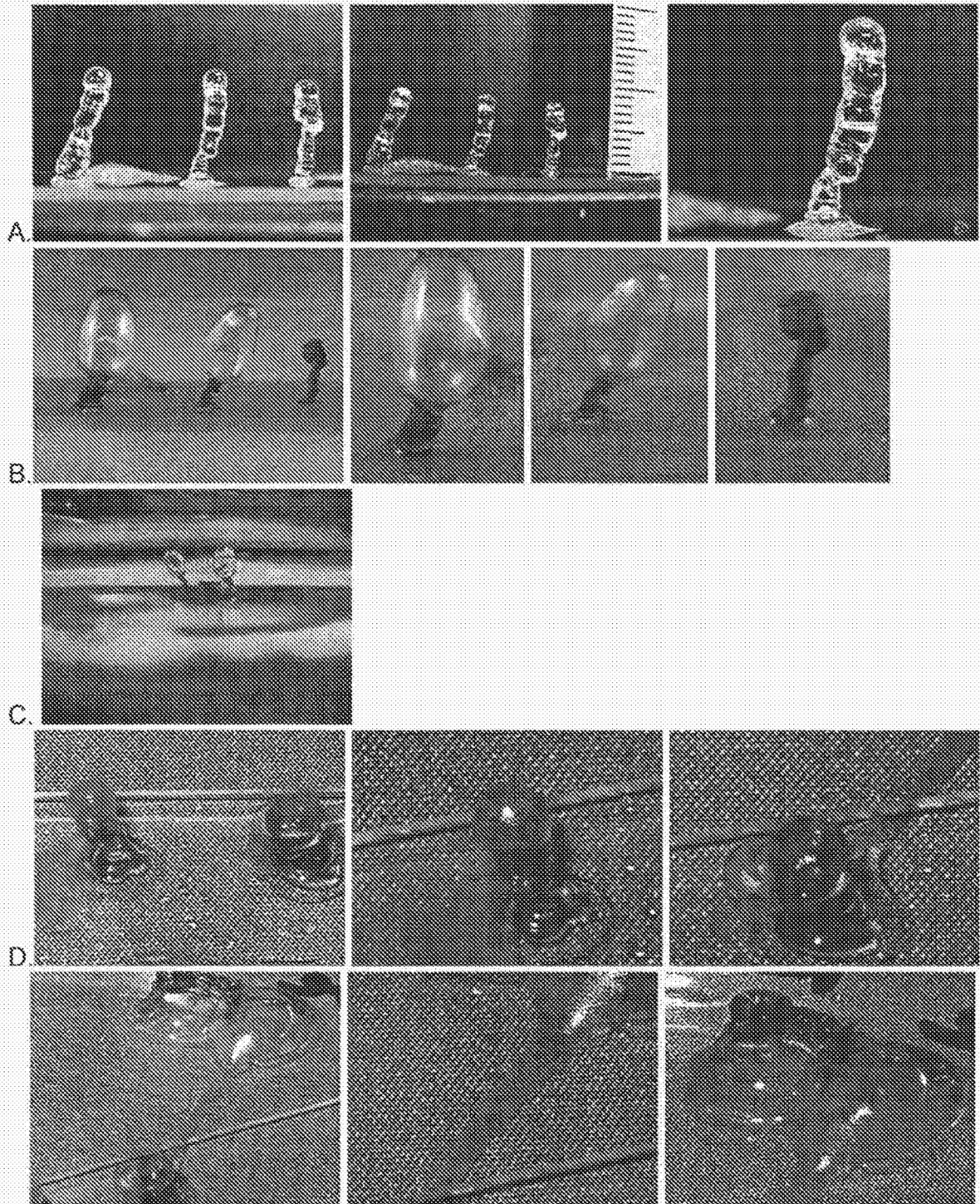


Figura 4

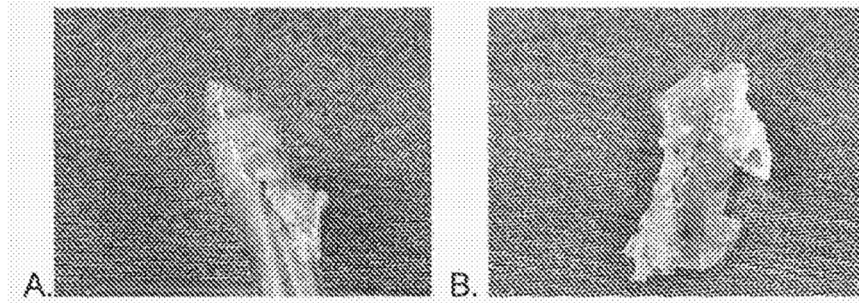


Figura 5

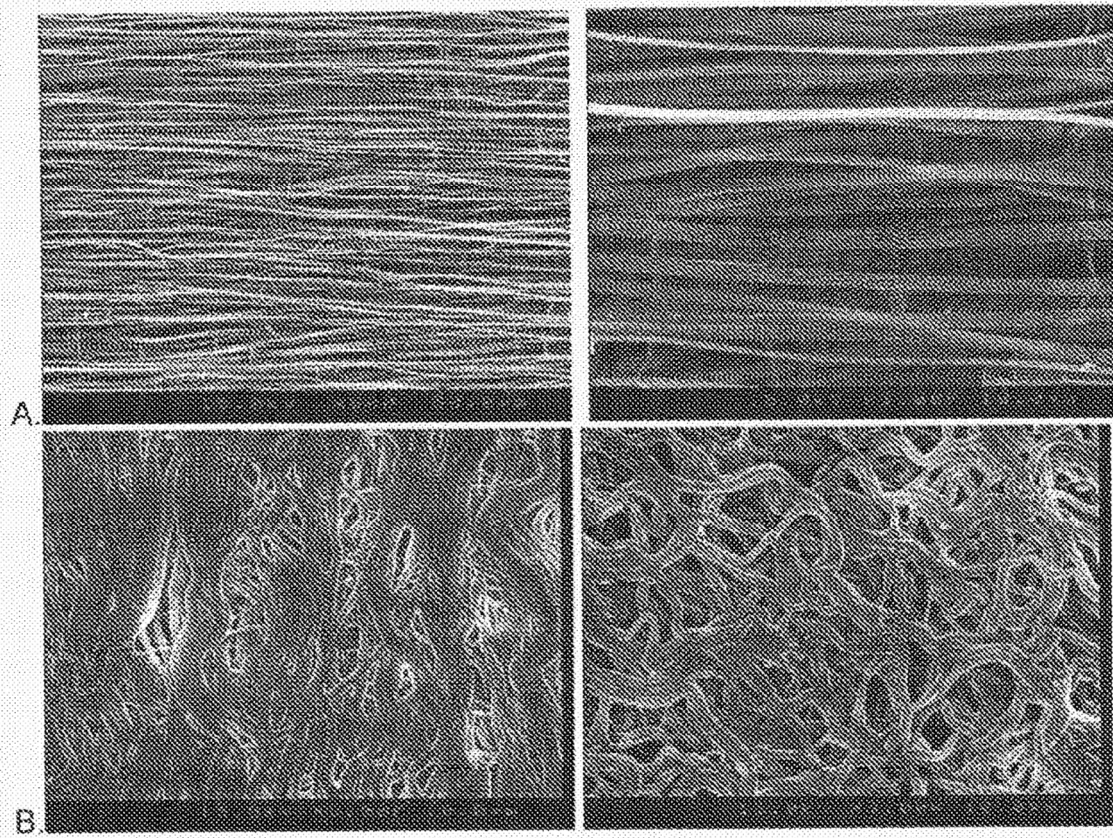
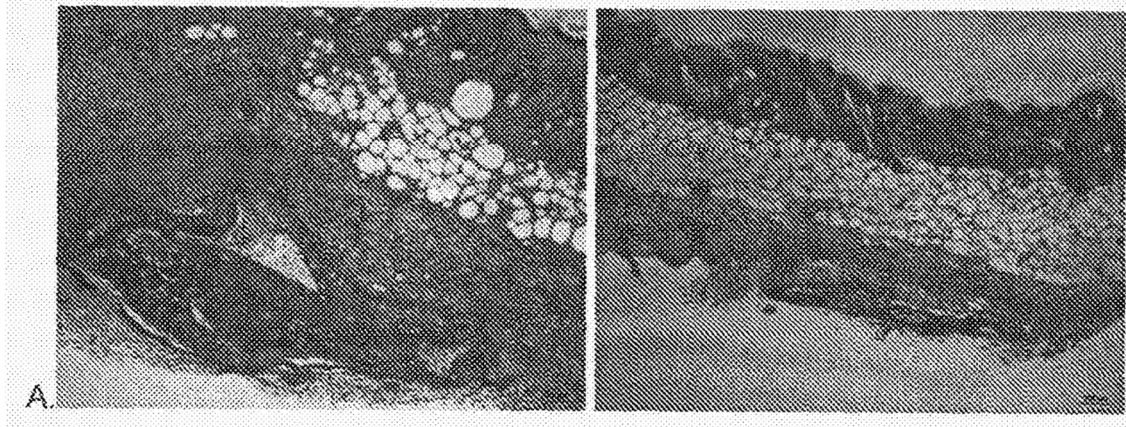


Figura 6



Figura 7



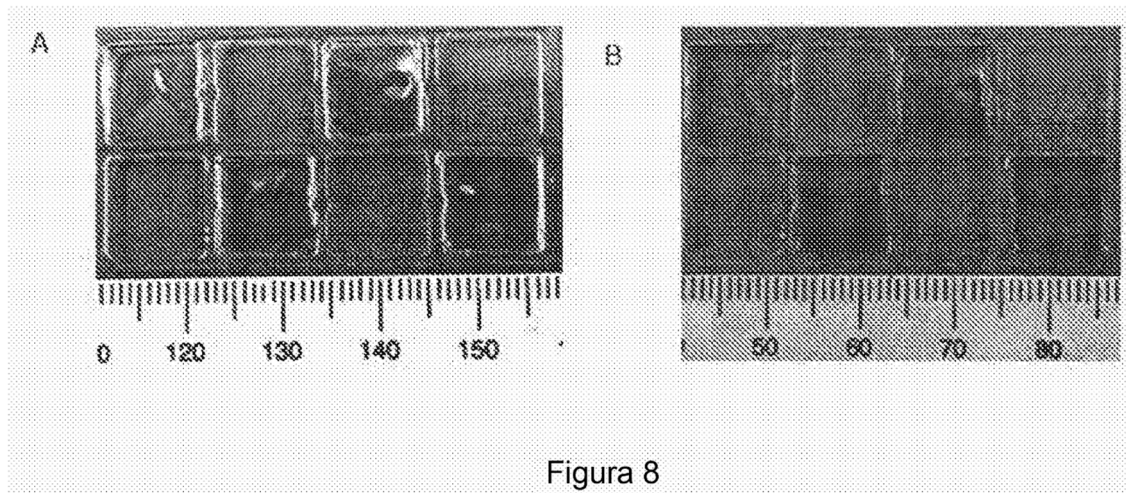


Figura 8

