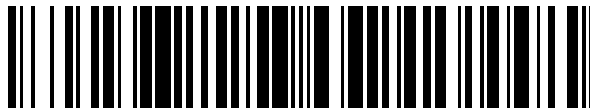


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 760 923**

51 Int. Cl.:

A61K 47/42	(2007.01) A61L 27/54	(2006.01)
A61K 47/36	(2006.01) A61L 27/58	(2006.01)
A61K 9/70	(2006.01)	
A61K 35/644	(2015.01)	
A61P 17/00	(2006.01)	
A61P 19/00	(2006.01)	
A61L 27/18	(2006.01)	
A61L 27/46	(2006.01)	
A61L 27/48	(2006.01)	
A61L 27/24	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2015 PCT/US2015/043789**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16022670**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2015 E 15829615 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 3185905**

54 Título: **Composiciones y métodos para mejorar la curación y la regeneración de huesos y tejidos blandos**

30 Prioridad:
05.08.2014 US 201462033599 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.05.2020

73 Titular/es:
**THE UNIVERSITY OF MEMPHIS (100.0%)
308 Administration Building
Memphis, TN 38152-3370, US**

72 Inventor/es:
**BOWLIN, GARY LEE;
RODRIGUEZ, ISAAC ANTHONY y
BURGER, BRENTON WALTER**

74 Agente/Representante:
SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 760 923 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

Composiciones y métodos para mejorar la curación y la regeneración de huesos y tejidos blandos.

Antecedentes de la invención

5 Clínicamente, la resorción ósea en las mandíbulas maxilar y mandibular se produce después de la pérdida de la dentición. El edentulismo parcial afecta al 40% de la población adulta y se estima que aumentará en los próximos 15 años a más de 200 millones de personas (*Facts and Figures*. 2012, American College of Prosthodontics). En tales casos, la resorción ósea hace que la cresta alveolar disminuya en ancho y altura con una pérdida del 50% en el ancho del hueso durante el primer año después de la pérdida de un diente, dos tercios de los cuales ocurren en los primeros 3 meses (Schropp, L., et al., *Int J Periodontics Restorative Dent*, 2003. 23(4): p. 313-23). El resultado de esto es que antes de restaurar la dentición del paciente con implantes dentales, se requiere un procedimiento separado para reemplazar esta estructura ósea perdida. Existen diversos procedimientos quirúrgicos disponibles para injertar la cresta alveolar deficitaria tanto para la altura como para el ancho. Para hacer esto, se coloca un injerto óseo, comúnmente polvo/partículas de hueso de aloinjerto o bloque en el espacio vacío para proporcionar señales osteoconductoras/osteoinductoras para la regeneración ósea dirigida. Muchos de estos procedimientos usan una membrana de regeneración ósea guiada (GBR) para mantener el injerto óseo en su lugar, así como los tejidos blandos. Hasta la fecha, la membrana GBR "ideal" para defectos grandes, injerto óseo de cresta alveolar aún no se ha desarrollado (Bottino, M.C., et al., *Dent Mater*, 2012. 28(7): p. 703-21; Dimitriou, R., et al., *BMC Med*, 2012. 10: p. 81).

20 Los biomateriales actuales usados como barreras de membrana en las extracciones dentales a menudo son difíciles de manipular, se degradan rápidamente y no ofrecen una regeneración mejorada de la herida, lo cual es primordial para el cierre completo y oportuno del tejido sobre un injerto óseo. Existe una necesidad urgente de un material biodegradable que apoye el crecimiento óseo, promueva la curación de los huesos y tejidos blandos e inhiba la infección. Dicho material sería útil para tratar lesiones, afecciones y trastornos que afectan los huesos y tejidos blandos, XP55271570 describe membranas de colágeno bioabsorbibles para la regeneración ósea guiada para aumentar el volumen óseo en las mandíbulas en caso de defectos congénitos, postraumáticos y posquirúrgicos. Las membranas se prueban con antimicrobiano de tetraciclina y posiblemente se usan junto con agentes de soporte de membrana (relleno), tal como hidroxiapatita homogénea completamente sintetizada (Haim Tal, Ofer Moses, Avital Kozlovsky and Carlos Nemconsky (2012). *Bioresorbable Collagen Membranes for Guided Bone Regeneration*, Bone Regeneration, Prof. Haim Tal (Ed.), ISBN: 978-953-51-0487-2, InTech, Disponible de: <http://www.intechopen.com/books/bone-regeneration/bioresorbable-collagen-membranes-for-guided-bone-regeneration>).

Resumen de la invención

35 Como se describe en este documento, la presente invención presenta materiales de barrera biodegradables y métodos *in vitro* e *in vivo* para usar tales materiales para promover el crecimiento y la curación de huesos y tejidos blandos.

En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende:

- a) 100 partes en peso de un polímero biodegradable;
- b) una miel en una cantidad de 1 a 300 partes en peso con respecto a las 100 partes en peso del polímero; y
- 40 c) un relleno que proporciona refuerzo estructural o rigidez a una fibra, filamento o membrana de polímero; en la que el relleno está en una cantidad de 1 a 300 partes en peso con respecto a las 100 partes en peso del polímero biodegradable, y en la que el relleno comprende hidroxiapatita.

En ciertas realizaciones, el polímero biodegradable comprende una proteína. En ciertas realizaciones, la proteína es gelatina. En ciertas realizaciones, la proteína es colágeno.

45 En ciertas realizaciones, el polímero biodegradable comprende poli (ácido láctico). La miel puede estar presente en una cantidad de 1 parte a 100 partes en peso, de 1 parte a 50 partes en peso, de 1 parte a 15 partes en peso, o en particular de 5 partes a 10 partes en peso con respecto a 100 partes en peso del polímero biodegradable, por ejemplo, gelatina.

50 El relleno está presente en una cantidad de 1-300 partes en peso con respecto a 100 partes en peso del polímero biodegradable. Preferiblemente, el relleno está presente en una cantidad de 1-100 partes en peso, 5-50 partes en peso o en particular 10-20 partes en peso.

En ciertas realizaciones, el relleno comprende un nanorelleno, un microrelleno o mezclas de los mismos. El nanorelleno tiene un diámetro promedio en nanoescala que varía desde aproximadamente 1 nm a aproximadamente 999 nm, o menor que aproximadamente 1 μm . En ciertas realizaciones, el nanorelleno tiene adecuadamente un diámetro promedio menor que aproximadamente 990 nm, menor que aproximadamente 900 nm, menor que

aproximadamente 800 nm, menor que aproximadamente 700 nm, menor que aproximadamente 600 nm, menor que aproximadamente 500 nm, menor que aproximadamente 400 nm, menor que aproximadamente 300 nm, menor que aproximadamente 200 nm, o menor que aproximadamente 100 nm. En ciertas realizaciones, el nanorelleno tiene adecuadamente un diámetro promedio de aproximadamente 1-100 nm, de aproximadamente 10 - 80 nm, de aproximadamente 25 - 75 nm, o en particular de aproximadamente 50 nm. El microrelleno es un relleno que tiene un tamaño en micras que tiene un diámetro promedio en microescala de al menos aproximadamente 1 μm . El microrelleno tiene adecuadamente un diámetro promedio de aproximadamente menor que aproximadamente 10 μm , menor que aproximadamente 9 μm , menor que aproximadamente 8 μm , menor que aproximadamente 7 μm , menor que aproximadamente 6 μm , menor que aproximadamente 5 μm , menor que aproximadamente 4 μm , menor que aproximadamente 3 μm , menor que aproximadamente 2 μm , o en particular de aproximadamente 1-2 μm .

El relleno comprende hidroxiapatita. En ciertas realizaciones, el relleno está presente en una cantidad de aproximadamente 15 partes en peso con respecto a 100 partes en peso del polímero biodegradable.

En ciertas realizaciones, la composición comprende además al menos uno o más rellenos adicionales o al menos uno o más agentes terapéuticos, tales como antibióticos. En cierta realización, el agente terapéutico es una cantidad terapéuticamente eficaz de miel. En realizaciones particulares, la composición comprende además una cantidad de miel antibacterianamente eficaz, que varía desde aproximadamente 50 partes a aproximadamente 300 partes, o desde aproximadamente 100 partes a aproximadamente 200 partes en peso con respecto a 100 partes en peso del polímero biodegradable. En una realización particular, la composición comprende además una cantidad eficaz de miel para estimular o mejorar la regeneración (proliferación y migración celular), que varía desde aproximadamente 10 partes a aproximadamente 100 partes, desde aproximadamente 20 partes a aproximadamente 70 partes en peso, o en particular de aproximadamente 50 partes en peso con respecto a 100 partes en peso del polímero biodegradable. La miel para uso terapéutico es igual o diferente de la miel descrita anteriormente.

En ciertas realizaciones, la composición de la invención es para usar en un método de tratamiento seleccionado del grupo de promover la regeneración ósea, curación de un defecto óseo, prevención de la infección de un defecto óseo, promover la curación de tejidos blandos en un tejido dañado o promover una respuesta de macrófagos en un tejido en el que el método comprende poner en contacto el hueso o tejido con dicha composición.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el significado comúnmente entendido por un experto en el arte a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a los expertos una definición general de muchos de los términos usados en esta invención: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); and Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Como se usa en este documento, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen a continuación, a menos que se especifique lo contrario.

Por "agente" se entiende cualquier compuesto químico de molécula pequeña, anticuerpo, molécula de ácido nucleico o polipéptido, o fragmentos de los mismos.

Por "mejorar" se entiende disminuir, suprimir, atenuar, disminuir, detener o estabilizar el desarrollo o la progresión de una enfermedad.

Por "alteración" se entiende un cambio (aumento o disminución) detectado por métodos conocidos de la técnica estándar tales como los descritos en este documento. Como se usa en este documento, una alteración incluye un cambio del 10%, 25%, 40%, 50% o mayor.

Por "enfermedad o lesión de tejidos blandos" se entiende cualquier enfermedad, trastorno o trauma que interrumpe la función normal o la conectividad de un tejido o tejidos blandos.

En esta divulgación, "comprende", "que comprende", "que contiene" y "que tiene" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la ley de la Patente de los Estados Unidos y pueden significar "incluye", "que incluye" y similares; "que consiste esencialmente en" o "consiste esencialmente" también tiene el significado atribuido en la ley de Patentes de los EE. UU. y el término es abierto, lo que permite la presencia de más de lo que se recita siempre que las características básicas o novedosas de lo que se recita no se cambia por la presencia de más de lo que se recita, pero excluye las realizaciones de la técnica anterior.

Por "enfermedad" se entiende cualquier afección o trastorno que daña o interfiere con la función normal de una célula, tejido u órgano, incluyendo el hueso.

Por "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende la cantidad de una composición de la invención requerida para proporcionar el efecto deseado o liberar los síntomas de una enfermedad con respecto a un sujeto no tratado. La cantidad eficaz de una composición celular usada para practicar la presente invención para

- 5 el tratamiento terapéutico de una enfermedad varía dependiendo de la forma de administración, la edad, el peso corporal y la salud general del sujeto. Finalmente, el médico o veterinario a cargo decidirá la cantidad y el régimen de dosificación apropiados. Tal cantidad se denomina cantidad "terapéuticamente eficaz". "Injerto" se refiere al proceso de contacto e incorporación celular en un tejido de interés existente (por ejemplo, hueso o tejido blando) *in vivo*.
- Por "mejorar la cicatrización ósea" se entiende aumentar la extensión del crecimiento óseo o la cicatrización con respecto a una condición de control. Preferiblemente, el aumento es al menos 2 veces, 2.5 veces, 3 veces o más.
- Por "microescala" se entiende entre 100 nm y 999 μm de tamaño. Una partícula que es de microescala es más grande que un nanotubo.
- 10 Como se usa en este documento, "obtener" como en "obtener un agente" incluye sintetizar, comprar o adquirir de otro modo el agente.
- Por "referencia" se entiende una condición estándar o de control.
- Por "sujeto" se entiende un mamífero, que incluye, pero no se limita a, un mamífero humano o no humano, tal como un bovino, equino, canino, ovino o felino.
- 15 Se entiende que los intervalos proporcionados en este documento son abreviados para todos los valores dentro del intervalo. Por ejemplo, se entiende que un rango de 1 a 50 incluye cualquier número, combinación de números o subintervalo del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50.
- 20 Como se usa en este documento, los términos "tratar", "que trata", "tratamiento" y similares se refieren a reducir o mejorar un trastorno y/o síntomas asociados con el mismo. Se apreciará que, aunque no se excluye, tratar un trastorno o afección no requiere que el desorden, afección o síntomas asociados con él sean eliminados por completo.
- A menos que se indique específicamente o sea obvio por el contexto, como se usa en este documento, se entiende que el término "o" es inclusivo. A menos que se indique específicamente o sea obvio por el contexto, como se usa en este documento, los términos "un", "uno" y "el" se entienden en singular o plural.
- 25 A menos que se indique específicamente o sea obvio por el contexto, como se usa en este documento, el término "aproximadamente" se entiende dentro de un intervalo de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo, dentro de 2 desviaciones estándar de la media. Aproximadamente se puede entender como dentro del 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, o 0.01% del valor establecido. A menos que el contexto aclare lo contrario, todos los valores numéricos proporcionados en este documento se modifican por el término aproximadamente.
- 30 La recitación de una lista de grupos químicos en cualquier definición de una variable en este documento incluye definiciones de esa variable como cualquier grupo único o combinación de grupos enumerados. La recitación de una realización para una variable o aspecto en este documento incluye esa realización como cualquier realización individual o en combinación con cualquier otra realización o partes de la misma.
- 35 Cualquier composición o método proporcionado en este documento se puede combinar con una o más de cualquiera de las otras composiciones y métodos proporcionados en este documento.
- El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a los métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).
- 40 Breve descripción de los dibujos
- La figura 1 muestra imágenes SEM de andamios electrohilados no comprimidos y comprimidos de gelatina + 15% de CW + miel (no reticulados). Barras de escala y aumento a 10 μm y 2kx, respectivamente.
- 45 La figura 2 muestra el análisis de diámetro de fibra automatizado FibraQuant™ usando imágenes SEM de la figura 1. Los histogramas anteriores muestran la distribución del tamaño de la fibra junto con las desviaciones medias y estándar, en micras.
- Las figuras 3A-3B muestran los resultados de la prueba de tracción uniaxial de membranas electrohiladas comprimidas: A. deformación en la rotura, B. módulo elástico.
- 50 La figura 4 muestra membranas comprimidas de miel al 10% hidratadas moldeables de ejemplo.

La figura 5 muestra imágenes DAPI de membranas electrohiladas comprimidas celularizadas (HDF). Barras de escala y aumento a 200 μm y 10x, respectivamente.

La figura 6 muestra imágenes de DinoLite del aspecto general de gelatina no comprimido y comprimido + 10% de CW + 30 mg/mL de esponjas de miel.

5 La figura 7A muestra una membrana de ejemplo (esponja) en partículas de diversos tamaños.

La figura 7B muestra una esponja de ejemplo en particular empaquetada en un vacío (receptáculo).

La figura 7C muestra un uso de ejemplo de las partículas que están cubiertas por la membrana liofilizada comprimida, cuando las partículas se empaquetan en un vacío.

La figura 7D muestra una esponja liofilizada seca de ejemplo comprimida a mano.

10 La figura 7E muestra un ejemplo hinchado de nuevo a su tamaño original cuando está hidratado.

La figura 8 muestra una unidad hidráulica Carver usada para la compresión del andamio.

La figura 9 ilustra esquemáticamente un método de prueba mecánica de ejemplo.

La figura 10 muestra imágenes SEM de membranas de gelatina + CW + MH no comprimidas y comprimidas, que incluyen barras de escala y aumento a 200 μm y 100x, respectivamente.

15 La figura 11 muestra un gráfico que incluye resultados de degradación de Gelatina + CW + MH (ensayo BCA) como se muestra con la medición de liberación media acumulativa; y la figura 11B muestra un gráfico que incluye resultados de degradación de Gelatina + CW + MH (ensayo BCA) como se muestra con la medición de porcentaje de liberación acumulativa.

20 La figura 12 muestra imágenes DAPI de membranas de gelatina + CW + MH comprimidas celularizadas (HDF). Barras de escala y aumento a 100 μm y 10x, respectivamente.

La figura 13 muestra membranas hidratadas moldeables de ejemplo.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención presenta materiales o matrices basados en polímeros biodegradables (por ejemplo, fibras o membranas) que comprenden miel; y métodos *in vitro* e *in vivo* para usar tales composiciones para mejorar una lesión o afección (por ejemplo, lesión ósea o trauma asociado con cirugía dental).

La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que las membranas biodegradables que comprenden miel pueden apoyar y promover el crecimiento y la regeneración de huesos y tejidos. Además, las membranas biodegradables incluyen una cantidad de miel antibacterianamente eficaz, proporcionando así una barrera antibacteriana contra la infección y promueve un ambiente estéril para la cicatrización de heridas.

30 Andamios

En general, los materiales de la invención comprenden un polímero biodegradable y una miel (por ejemplo, una cantidad de miel antibacteriana, bactericida y/o cicatrizante de heridas).

Los materiales comprenden adicionalmente un relleno.

35 Se conocen una variedad de polímeros biodegradables en la técnica. Los polímeros biodegradables preferidos incluyen proteínas (tales como gelatina y colágeno), polímeros derivados de monómeros de origen natural (tal como poli(ácido láctico (PLA)) y polímeros derivados de monómeros sintéticos (tales como polidioxanona (PDO)). Deseablemente, los materiales biodegradables se degradarán durante un período de tiempo menor que un año, más preferiblemente menor que seis meses. En general, cualquier polímero biodegradable que sea biocompatible, y se pueda conformar o moldear en fibras y membranas, se puede emplear en los presentes materiales. También se
40 pueden emplear copolímeros o mezclas/combinaciones (multicomponentes) de polímeros biodegradables.

Otros polímeros biocompatibles, algunos de los cuales son biodegradables, incluyen, por ejemplo, tales polímeros incluyen, pero no se limitan a los siguientes: poli(uretanos), poli(siloxanos) o siliconas, poli(etileno), poli(vinilpirrolidona), poli(2-hidroxi etil metacrilato), poli(N-vinil pirrolidona), poli(metil metacrilato), poli(alcohol vinílico), poli(ácido acrílico), poli(acrilamida), poli(etileno-co-vinil acetato), poli(etilenglicol), poli(ácido metacrílico),
45 ácido poliláctico (PLA), ácidos poliglicólicos (PGA), poli(láctida-co-glicólidos) (PLGA), nilones, poliamidas, polianhídridos, poli(alcohol etileno-co-vinílico) (EVOH), policaprolactona, poli(acetato de vinilo) (PVA), hidróxido de polivinilo, poli(óxido de etileno) (PEO) y poliortoésteres o cualquier otro polímero sintético similar que pueda desarrollarse, que sea biológicamente compatible. Algunos materiales de matriz sintética preferidos incluyen PLA,

PGA, copolímeros de PLA y PGA, policaprolactona, poli (etileno-co-acetato de vinilo), (EVOH), PVA y PEO. Véase también la Patente de los Estados Unidos No. 7,374,774 (que se incorpora en este documento como referencia).

El término "relleno", como se usa en este documento, se refiere a un material biocompatible orgánico o inorgánico que proporciona refuerzo estructural o rigidez a una fibra, filamento o membrana de polímero. El relleno puede ser cristalino, una fibra o una partícula. Alternativamente, el relleno tiene adecuadamente una forma de varilla, fibra, esfera, cristal ovalado, poliédrico y similares, sin embargo, la forma del relleno no está en particular limitada a la misma. El relleno tiene un diámetro promedio en nanoescala (nanorelleno) que varía desde aproximadamente 1 nm a aproximadamente 950 nm. El nanorelleno tiene adecuadamente un diámetro promedio de aproximadamente 1-100 nm, de aproximadamente 10 - 80 nm, de aproximadamente 25 - 75 nm, o en particular de aproximadamente 50 nm. Alternativamente, el relleno tiene un diámetro promedio en microescala (microrelleno) que es mayor de al menos aproximadamente 100 nm. El microrelleno tiene adecuadamente un diámetro promedio de aproximadamente menor que aproximadamente 10 μm , menor que aproximadamente 9 μm , menor que aproximadamente 8 μm , menor que aproximadamente 7 μm , menor que aproximadamente 6 μm , menor que aproximadamente 5 μm , menor que aproximadamente 4 μm , menor que aproximadamente 3 μm , menor que aproximadamente 2 μm , o en particular menor que aproximadamente 1 μm . Por ejemplo, el relleno es un material nanocristalino o de fibra y tiene un diámetro o espesor promedio menor que aproximadamente 100 nm, y ventajosamente puede tener una longitud promedio menor que aproximadamente 500 nm. Ventajosamente, un nanorelleno puede poseer una carga electrostática, que puede adherirse o atraer factores de crecimiento cuando se implanta o aplica a un sitio de la herida. Los ejemplos de materiales de nanorelleno apropiados para su uso en los presentes materiales incluyen nanocristales de hidroxiapatita. Las mezclas de rellenos que comprenden nanorellenos y microrellenos también se pueden usar sin limitación.

Los materiales de la invención comprenden además miel. Se puede usar cualquier tipo de miel. Los ejemplos de tipos de miel incluyen la miel de Manuka, la miel de *Leptospermum* o la miel de trigo sarraceno. También se pueden emplear mezclas de diferentes mieles. Por ejemplo, la miel de Manuka es una miel de Manuka activa o terapéutica que tiene una clasificación UMF superior a 10. La miel está presente en las composiciones y materiales de la invención en un efecto de cantidad para inhibir el crecimiento o la propagación de bacterias, tales como bacterias patógenas. Las bacterias de ejemplo incluyen *S. aureus*, (incluyendo *S. aureus* resistente a metacilina (MRSA)), *P. gingivalis*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecium*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, y *Klebsiella oxytoca*. Además, la miel de trigo sarraceno se puede incluir en una cantidad eficaz para la curación.

La cantidad de miel que se va a usar depende en parte de la naturaleza de la herida o lesión que se va a tratar con una composición de la invención; el tipo de bacteria que se va a inhibir; la concentración de la miel; y las propiedades antibacterianas de la miel particular empleada. Las propiedades antibacterianas, antimicrobianas y bactericidas de la miel dependen de diversos factores, incluyendo la concentración de metilglioxal (MGO), el factor único de Manuka (UMF), la presencia de compuestos fenólicos adicionales en la miel, el pH de la herida, el pH de la miel y presión osmótica ejercida por la miel. Un experto habitual en la técnica podrá seleccionar un tipo y una cantidad apropiados de miel para usar en las presentes composiciones usando no más que experimentación de rutina. En ciertas realizaciones, la cantidad de miel es de 1 parte a 15 partes en peso (1-15 por ciento en peso) en base a la cantidad en peso del polímero biodegradable.

En realizaciones preferidas, una composición de la invención incluye 100 partes en peso de un polímero biodegradable y 1 parte a 15 partes en peso de miel. La composición puede comprender adicionalmente 10-20 partes en peso de relleno. Los compuestos o agentes adicionales también pueden estar presentes como se describe en este documento.

En realizaciones preferidas, la composición comprende además una cantidad terapéuticamente eficaz de miel. Por ejemplo, se agrega miel en una cantidad antibacterianamente eficaz a la composición, que varía desde 50 partes a 300 partes, o desde 100 partes a 200 partes en peso con respecto a 100 partes en peso del polímero biodegradable. Además, se agrega una cantidad adicional de miel a la composición para estimular o mejorar la regeneración (proliferación y migración celular), que varía desde 10 partes a 100 partes, desde 20 partes a 70 partes en peso, o en particular de 50 partes en peso con respecto a 100 partes en peso del polímero biodegradable.

Métodos de preparación de composiciones

Las composiciones que comprenden un polímero biodegradable, un relleno y una miel se pueden preparar por cualquier método apropiado, algunos de los cuales son conocidos en la técnica. En general, un relleno se puede suspender o dispersar en un disolvente (que no disolverá sustancialmente el relleno) para formar una dispersión o suspensión; el polímero biodegradable y la miel se mezclan luego con la dispersión o suspensión para formar una composición de la invención. En ciertas realizaciones, se agrega adicionalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de miel a la composición para un efecto antibacteriano o para mejorar la regeneración. En ciertas realizaciones, el disolvente es 2,2,2-trifluoroetanol, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP) o ácido acético:agua 9:1. La cantidad de disolvente usada debe minimizarse para facilitar el electrohilado u otro procesamiento de la composición en fibras y membranas.

Métodos de preparación de fibras y membranas

Una composición que comprende un polímero biodegradable, un relleno y una cantidad de miel antibacterianamente eficaz se puede usar para preparar fibras y membranas mediante cualquier método apropiado, algunos de los cuales son conocidos en la técnica. En una realización, se forma una fibra o membrana mediante electrohilado. El electrohilado es una técnica conocida (véase, por ejemplo, Li et al., Biomaterials. 2005 Oct;26(30):5999-6008.) y el aparato de electrohilado se puede comprar comercialmente. Por ejemplo, una solución cargada que comprende, por ejemplo, un polímero biodegradable se alimenta a través de una pequeña abertura o boquilla (generalmente una aguja o punta de pipeta). Debido a su carga, la solución se dirige hacia una placa colectora conectada a tierra, por ejemplo, una pantalla metálica, placa o mandril giratorio, por lo general a 5 - 30 cm de distancia, como un chorro. Durante el recorrido del chorro, el solvente se evapora gradualmente y se deja acumular una fibra cargada en el objetivo conectado a tierra. La carga en las fibras eventualmente se disipa en el ambiente circundante. Si se permite que el objetivo se mueva con respecto a la posición de la boquilla, se pueden lograr orientaciones de fibra específicas (alineadas o aleatorias).

Las composiciones se pueden preparar como composiciones de fibra electrohilada. Se describe en este documento un método para producir una membrana, el método comprende:

- a) dispersar un relleno en un disolvente para formar una dispersión;
- b) combinar un polímero biodegradable y miel con la dispersión para formar una composición; y
- c) electrohilar la composición para formar fibras, formando así una membrana que comprende un polímero biodegradable, un relleno y una cantidad de miel antibacterianamente eficaz.

El relleno se agrega a la composición, de modo que la etapa a) se puede omitir y el polímero biodegradable y la miel se pueden combinar con el disolvente para formar una composición.

El método puede comprender además agregar al menos un relleno adicional, al menos un agente terapéutico o una cantidad terapéuticamente eficaz de miel a la composición antes de la electrohilado. La membrana electrohilada se puede formar en múltiples capas. Por ejemplo, la composición puede ser electrohilada adicionalmente sobre la parte superior de una capa u otras capas para crear una membrana electrohilada de múltiples capas.

El disolvente se puede eliminar de una dispersión que comprende un polímero biodegradable, un relleno y una cantidad de miel antibacterianamente eficaz para formar una esponja. El disolvente se puede eliminar por evaporación o liofilización (liofilización). Se describe en este documento un método para producir una membrana, el método comprende:

- a) dispersar un relleno en un disolvente para formar una dispersión;
- b) combinar un polímero biodegradable y miel con la dispersión;
- c) eliminar el disolvente de la dispersión para formar una esponja; y
- d) comprimir la esponja para formar una membrana que comprende un polímero biodegradable, un relleno y una cantidad de miel antibacterianamente eficaz.

El relleno se agrega a la composición, de modo que se puede omitir la etapa a) y el polímero biodegradable y la miel se pueden combinar con el disolvente para formar una composición.

El método puede comprender además agregar al menos un relleno adicional, al menos un agente terapéutico o una cantidad terapéuticamente eficaz de miel a la composición.

Se apreciará por el contexto que el término "membrana" se usa en este documento para referirse a un producto después de la compresión de esteras/membranas electrohiladas o la compresión de una esponja, como se describe en este documento. De este modo, las "membranas" en este documento incluyen tanto fibras comprimidas como esponjas comprimidas (a menos que el contexto no las aclare).

La esponja se puede liofilizar antes de comprimir.

La esponja (liofilizada o no liofilizada) se puede procesar adecuadamente en un bloque o en forma de partículas o molida antes de comprimir, por ejemplo, en base a sus aplicaciones dependiendo de la aplicación de injerto óseo.

Como alternativa, la esponja, las fibras o la membrana comprimidas pueden procesarse adecuadamente en un bloque o en forma de partículas o molidas después de la compresión, dependiendo de la aplicación de injerto óseo.

Como alternativa, la esponja no se comprime ni se comprime con menos presión o sustancialmente menos presión, por ejemplo, a mano, solo para dar potencial de hinchazón (Figuras 7D-7E).

La membrana de múltiples capas se puede formar uniendo las al menos dos membranas.

La membrana de múltiples capas se puede formar comprimiendo múltiples capas de esponjas. En una realización particular, la membrana de múltiples capas se forma a partir de múltiples esponjas liofilizadas comprimiendo múltiples capas de las mismas. La membrana de múltiples capas se puede comprimir o no comprimir. Por ejemplo, las membranas de múltiples capas se pueden formar comprimiendo múltiples capas de membranas formadas por cualquiera de los métodos descritos en este documento. En general, la compresión de 2-10 membranas (más preferiblemente 2-4 membranas) entre dos superficies (tal como placas o bloques de acero inoxidable, por ejemplo, en una prensa hidráulica) a una presión de 4,000-24,000 libras generalmente dará como resultado una unión por compresión de las membranas para formar una membrana de múltiples capas.

Como alternativa, la membrana de múltiples capas se puede formar usando múltiples disolventes. En ciertas realizaciones, se usan al menos dos o más disolventes que tienen densidades diferentes para disolver las cargas y combinar otros componentes (por ejemplo, polímero biodegradable y miel). Por ejemplo, las soluciones hechas a partir de la composición y los diferentes disolventes se combinan, y las soluciones combinadas pueden formar capas distintas en base a las densidades de los disolventes. Después de eliminar los disolventes, se pueden preparar esponjas de capas múltiples y membrana de capas múltiples. La membrana de capas múltiples puede estar comprimida o no comprimida.

Las membranas se pueden reticular usando reactivos de reticulación. Se describen en este documento membranas de capas múltiples que tienen al menos dos capas, en la que las al menos dos capas están reticuladas, por ejemplo, para estabilizar la estructura de la membrana de capas múltiples. Los reactivos de reticulación de ejemplo incluyen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (u otras carbodiimidias), genipina o glutaraldehído. Las membranas se pueden sumergir en una solución del agente de reticulación (por ejemplo, 20-40 mM) en un disolvente tal como etanol. Cuando se ha producido la cantidad deseada de reticulación, las membranas se pueden retirar de la solución y enjuagarse antes de su uso.

Una membrana para usar en los métodos terapéuticos debe tener suficiente rigidez para soportar el tejido blando circundante, ser maleable a su temperatura de transición vítrea (T_g) pero recuperar la rigidez al enfriarse (esto es, mantener la forma formada *in situ*) y ser biocompatible en que promoverá la osteointegración y no afectará negativamente el tejido blando circundante. La membrana debería reabsorberse dentro de 6-9 meses, ya que el hueso del aloinjerto tarda aproximadamente 6 meses en consolidarse en hueso nuevo en las cirugías de injerto de hueso de la mandíbula y el maxilar. Las membranas son flexibles, moldeables al calentarse, mantienen su forma al enfriarse, son menos ácidas durante la degradación y la arquitectura fibrosa regulará la respuesta de los macrófagos (MAC) y permitirá la regeneración de hueso y tejido (fenotipo M2 MAC) versus el inflamatorio (Fenotipo MAC M1).

El tamaño y el espesor de una membrana se pueden variar según el uso previsto. Las membranas se pueden hilar al tamaño deseado, o una esponja se puede moldear al tamaño deseado, seguido de compresión a la densidad y espesor deseados. Por ejemplo, las membranas de barrera suelen tener un espesor de entre 0.1 y 0.4 mm, por lo que la esponja se puede comprimir adecuadamente hasta un espesor de aproximadamente 0.1 y 0.4 mm.

La membrana puede tener cualquier forma (redonda, cuadrada, rectangular, irregular). En realizaciones de ejemplo, una membrana de la invención tiene un ancho desde 1 a 20 mm y una longitud desde 1 a 20 mm. En ciertas realizaciones, una membrana tiene menos que 1 mm de espesor, menos que 0.5 mm de espesor, menos que 0.3 mm de espesor o menos que 100 micras de espesor.

Una membrana de la invención puede tener una tensión de rotura de al menos 90%, 100%, 110% o 120%. En ciertas realizaciones, una membrana de la invención tiene un módulo de elasticidad de al menos aproximadamente 5 mPa, o 10, 15, 20 o 25 mPa. Una membrana de la invención puede tener una carga de compresión máxima de al menos aproximadamente 0.26N.

Aplicaciones terapéuticas y profilácticas.

La presente invención proporciona un suministro fácil de materiales útiles para mejorar afecciones asociadas con enfermedades o lesiones de huesos o tejidos blandos. Las composiciones y materiales de la invención se administran (por ejemplo, directa o indirectamente) a un tejido u órgano dañado o enfermo donde se injertan y establecen conexiones funcionales con un tejido diana (por ejemplo, hueso, músculo, encías, gingival, membranas mucosas, piel). En una realización, una membrana de la invención mejora la curación ósea. Los métodos para reparar tejidos u órganos dañados se pueden llevar a cabo *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. En una realización particular, la membrana se usa en una aplicación dental, por ejemplo, en cirugía de injerto de hueso mandibular y maxilar.

Las composiciones de la invención son para usar en un método de tratamiento seleccionado del grupo de promoción de la regeneración ósea, curación de un defecto óseo, prevención de infección de un defecto óseo, promoción de la curación de tejidos blandos en un tejido dañado o promoción de una respuesta de macrófagos en un tejido en el que el método comprende poner en contacto el hueso o tejido con dicha composición.

En este documento se describe un método para promover la regeneración ósea, el método comprende poner en contacto una superficie ósea con una composición, fibra, membrana comprimida, partículas, membrana de hinchamiento, membrana no comprimida o membrana de múltiples capas (comprimida o no comprimida).

En este documento se describe un método para promover la regeneración ósea después de un procedimiento quirúrgico en el hueso, que incluye preservación de cavidades, aumento de crestas, injerto sinusal o injerto óseo.

5 En este documento se describe un método para promover la curación de un defecto óseo, el método comprende poner en contacto el defecto óseo con una composición, fibra, membrana comprimida, partículas, membrana hinchada, membrana no comprimida o membrana de múltiples capas (comprimida o no-comprimida).

En este documento se describe un método para prevenir la infección de un defecto óseo, el método comprende poner en contacto el defecto óseo con una composición, fibra, membrana, partículas, membrana de hinchamiento, membrana no comprimida o membrana de múltiples capas (comprimida o no comprimida).

10 En este documento se describe un método para promover la curación de tejidos blandos en un tejido dañado, el método comprende poner en contacto el tejido dañado con una composición, fibra, membrana, partículas, membrana de hinchamiento, membrana no comprimida o membrana de múltiples capas (comprimida o no comprimida).

15 En el presente documento se describe un método para promover la regeneración ósea después de un procedimiento quirúrgico en el hueso, que incluye la preservación del encaje, el aumento de la cresta, el injerto sinusal o el injerto óseo.

En este documento se describe un método para promover una respuesta de macrófagos en un tejido, el método comprende poner en contacto el tejido con una composición, fibra, membrana, partículas, membrana hinchada, membrana no comprimida o membrana de múltiples capas (comprimida o no comprimida).

Administración

20 Las composiciones, la fibra y las membranas se pueden proporcionar directamente a un tejido u órgano de interés (por ejemplo, mediante aplicación directa a un hueso o superficie de tejido, o mediante implantación quirúrgica). Se puede aplicar una membrana para cubrir, rodear, rellenar o contactar de otro modo un defecto óseo o tisular, herida, cicatrización de la piel/herida, recesión gingival o sitio quirúrgico. Si se desea, se pueden proporcionar agentes de expansión y diferenciación antes, durante o después de la administración de la composición, fibra o membrana para
25 aumentar, mantener o mejorar la producción o diferenciación de células *in vivo*, incluidas las células óseas del hueso de un sujeto o de cualquier tipo de material/trasplante de injerto óseo, esto es, hueso alogénico, xenogénico, aloplástico o producido genéticamente. Las composiciones descritas en este documento incluyen composiciones farmacéuticas. Cuando se administra una composición terapéutica o material de la presente invención (por ejemplo, una composición farmacéutica), generalmente se formulará en una forma de dosificación unitaria. Se pueden aplicar
30 agentes terapéuticos adicionales a las fibras o incorporarse dentro de las fibras durante la fabricación.

Formulaciones

35 Las composiciones, fibras, membranas o membranas de capas múltiples se pueden proporcionar convenientemente como preparaciones estériles. En una realización, se proporciona una composición como un líquido, suspensión líquida, gel, composición viscosa o composición sólida. Las composiciones líquidas, de gel y viscosas son algo más convenientes de administrar, especialmente por inyección. Las composiciones viscosas se pueden formular dentro del intervalo de viscosidad apropiado para proporcionar períodos de contacto más largos con tejidos específicos. Las composiciones líquidas o viscosas pueden comprender portadores, que pueden ser un disolvente o medio dispersante que contiene, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina regulada con fosfato, polioli (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares) y mezclas apropiadas de los mismos.

40 Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando las células (por ejemplo, células madre embrionarias, progenitores neuronales, neuronas diferenciadas) según se desee. Tales composiciones pueden estar mezcladas con un portador, diluyente o excipiente apropiado tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, dextrosa o similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes, dispersantes o emulsionantes (por ejemplo, metilcelulosa), agentes reguladores del pH, aditivos
45 gelificantes o mejoradores de la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes, colorantes y similares, dependiendo de la ruta de administración y preparación deseada. Se pueden consultar textos estándar, tales como "REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17th edition, 1985, incorporada en este documento como referencia, para preparar preparaciones apropiadas, sin experimentación excesiva.

50 Se pueden agregar diversos aditivos que mejoran la estabilidad y la esterilidad de las composiciones, incluidos conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y soluciones reguladoras. La prevención de la acción de los microorganismos puede garantizarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. Las composiciones pueden ser isotónicas, esto es, pueden tener la misma presión osmótica que la sangre y el fluido lagrimal. La isotonicidad deseada de las composiciones de esta invención puede lograrse usando cloruro de sodio u otros agentes farmacéuticamente
55 aceptables tales como dextrosa, ácido bórico, tartrato de sodio, propilenglicol u otros solutos inorgánicos u orgánicos. El cloruro de sodio se prefiere en particular para soluciones reguladoras que contienen iones de sodio.

La viscosidad de las composiciones, si se desea, se puede mantener al nivel seleccionado usando un agente espesante farmacéuticamente aceptable. Se prefiere la metilcelulosa porque está disponible de forma fácil y económica y es fácil trabajar con ella. Otros agentes espesantes apropiados incluyen, por ejemplo, goma de xantano, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carbómero y similares. Además, las sales de plata se pueden usar como agentes espesantes. Véanse también la Patente de los Estados Unidos No. 8,367,094; la Patente de los Estados Unidos No. 8,173,151; y la Patente de los Estados Unidos No. 7,998,498 (que se incorporan en este documento en este documento como referencia). Las sales de plata se pueden agregar para mejorar aún más los efectos antibacterianos de la composición. La concentración preferida del espesante dependerá del agente seleccionado. El punto importante es usar una cantidad que logre la viscosidad seleccionada. Obviamente, la elección de portadores apropiados y otros aditivos dependerá de la ruta exacta de administración y la naturaleza de la forma de dosificación particular, por ejemplo, la forma de dosificación líquida (por ejemplo, si la composición se va a formular en una solución, una suspensión, un gel u otra forma líquida, tal como una forma de liberación por tiempo o una forma llena de líquido).

Se puede agregar glicerina o componentes similares a la mezcla para mejorar la flexibilidad de la fibra y la membrana.

Los agentes de ejemplo que se pueden administrar junto con una composición, fibra, membrana o membrana de múltiples capas de la invención incluyen, pero no se limitan a, antibióticos (que incluyen, por ejemplo, sales de plata antibacterianas), analgésicos, anticoagulantes, inmunosupresores, la sustancia terapéutica se selecciona del grupo que consiste en anestésicos, hipnóticos, sedantes, inductores del sueño, antipsicóticos, antidepresivos, antialérgicos, antianginosos, antiartríticos, antiasmáticos, antidiabéticos, fármacos antiartríticos, anticonvulsivos, fármacos antigota, antihistamínicos, antipruríticos, eméticos, antieméticos, antiespasmódicos, supresores del apetito, sustancias neuroactivas, agonistas de neurotransmisores, antagonistas, bloqueadores de receptores, moduladores de la recaptación, bloqueadores beta-adrenérgicos, bloqueadores de los canales de calcio, disulfarim, relajantes musculares, analgésicos, antipiréticos, estimulantes, agentes anticolinesterasa, agentes parasimpaticomiméticos, hormonas, antitrombóticos, trombolíticos, inmunoglobulinas, agonistas hormonales, antagonistas hormonales, vitaminas, antineoplásicos, antiácidos, digestivos, laxantes, catárticos, antisépticos, diuréticos, desinfectantes, fungicidas, ectoparasiticidas, antiparasitarios, metales pesados, antagonistas de metales pesados, agentes quelantes, alcaloides, sales, iones, autacoides, digitalis, glucósidos cardíacos antiarrítmicos, antihipertensivos, vasodilatadores, vasoconstrictores, antimuscarínicos, agentes estimulantes ganglionares, agentes bloqueantes ganglionares, agentes bloqueantes neuromusculares, inhibidores de nervios adrenérgicos, antioxidantes, antiinflamatorios, productos para el cuidado de heridas, agentes antitumorales, agentes antiangiogénicos, agentes antigénicos, agentes cicatrizantes de heridas, extractos de plantas, factores de crecimiento, hormonas de crecimiento, citocinas, inmunoglobulinas, emolientes, humectantes, fármacos contra el rechazo, espermicidas, acondicionadores, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes antivirales, tranquilizantes, fármacos para reducir el colesterol, antitusivos, fármacos bloqueadores de histamina e inhibidores de la monoaminoxidasa. Otros agentes incluyen proteínas tales como una o más de activina A, adrenomedulina, FGF ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, angiogenina, angiopoyetina-1, angiopoyetina-2, angiopoyetina-3, angiopoyetina-4, angiotatina, angiotropina, angiotensina-2, proteína morfogénica ósea 1, 2 o 3, cadherina, colágeno, factor estimulante de colonias (CSF), factor de crecimiento derivado de células endoteliales, endoglina, endotelina, endostatina, inhibidor del crecimiento de células endoteliales, factor de mantenimiento de viabilidad celular endotelial, efrinas, eritropoyetina, factor de crecimiento de hepatocitos, hormona de crecimiento humano, TNF-alfa, TGF-beta, factor de crecimiento de células endoteliales derivadas de plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento similar a la insulina-1 o -2 (IGF), interleucina (IL)-1 u 8, FGF-5, fibronectina, factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), inhibidor de la proliferación celular vascular derivado del corazón, IFN-gamma, IFN-gamma, receptor de integrina, LIF, factor de crecimiento derivado de leiomioma, MCP-1, factor de crecimiento derivado de macrófagos, factor de crecimiento derivado de monocitos, MMP2, MMP3, MMP9, neuropilina, neuropilina, donantes de óxido nítrico, óxido nítrico sintasa (NOS), factor de células madre (SCF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF, y VEGF164. Otros agentes que se pueden administrar junto con una célula de la invención incluyen uno o más de LIF, proteína morfogénica ósea (BMP), ácido retinoico, ácido transretinoico, dexametasona, insulina, indometacina, fibronectina y/o suero bovino fetal al 10% o un derivado del mismo. Otros agentes incluyen oligonucleótidos pequeños, tales como siDNA o siRNA, que incluyen al menos una porción de secuencias para un objetivo terapéutico.

Los expertos en el arte reconocerán que los componentes poliméricos de las composiciones se deben seleccionar para ser químicamente inertes y no afectarán la viabilidad o eficacia de la célula como se describe en la presente invención. Esto no presentará ningún problema para los expertos en principios químicos y farmacéuticos, o los problemas se pueden evitar fácilmente haciendo referencia a textos estándar o mediante experimentos simples (que no impliquen una experimentación indebida), a partir de esta divulgación y los documentos citados en este documento.

Dosis

Una composición, fibra o membrana descrita en este documento se puede aplicar o implantar en una cantidad eficaz para proporcionar cicatrización de heridas u otras propiedades. Una membrana descrita en este documento

proporciona una barrera eficaz para prevenir la infiltración de bacterias patógenas en el sitio de la herida. El experto en la materia puede determinar fácilmente la cantidad de composición, fibra o membrana que se va a administrar en los métodos descritos en este documento.

5 Por supuesto, para cualquier composición que se administre a un animal o humano, y para cualquier método particular de administración, se prefiere determinar por lo tanto: toxicidad, tal como determinando la dosis letal (LD) y LD₅₀ en un modelo animal apropiado, por ejemplo, roedores tales como el ratón; y, la dosificación de la(s) composición(es), la concentración de componentes en el mismo y el momento de la administración de la (s) composición (es), que provocan una respuesta apropiada. Tales determinaciones no requieren una experimentación indebida a partir del conocimiento del experto en la materia, esta divulgación y los documentos en este documento citados. Y, el tiempo para las administraciones secuenciales se puede determinar sin experimentación excesiva.

Métodos de entrega

15 Las composiciones descritas en este documento (por ejemplo, andamios que comprenden células) se pueden proporcionar directamente a un tejido u órgano de interés, tal como un tejido dañado por lesión o enfermedad (por ejemplo, por administración en el sistema nervioso central o periférico). Las composiciones se pueden administrar a sujetos que lo necesitan por una variedad de rutas de administración. Los métodos de administración, en general, se pueden practicar usando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, esto es, cualquier modo que produzca niveles efectivos de los compuestos activos sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables. Tales modos de administración incluyen injerto quirúrgico o inyección (por ejemplo, intramuscular, intracardíaco, intraocular, intracerebroventricular).

20 Kits

Las composiciones, fibras, membranas o membranas de múltiples capas descritas en este documento se pueden suministrar junto con reactivos adicionales en un kit. Los kits pueden incluir instrucciones para la preparación de un material (tal como una membrana), un régimen de tratamiento, reactivos y equipos (tubos de ensayo, recipientes de reacción, agujas, jeringas, etc.). Las instrucciones proporcionadas en un kit de acuerdo con la invención pueden estar dirigidas a parámetros operativos apropiados en forma de una etiqueta o un inserto separado.

30 En una realización, las composiciones de la invención son útiles para el tratamiento o prevención de lesiones o enfermedades de huesos o tejidos blandos. La presente invención proporciona composiciones y métodos para tratar tales lesiones o enfermedades y/o síntomas de las mismas caracterizadas por la pérdida de células, o pérdida de la estructura, función o actividad del tejido. Los métodos descritos en este documento comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición, fibra, membrana o membrana de múltiples capas descrita en este documento a un sujeto (por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano). De este modo, en este documento se describe un método para tratar a un sujeto que padece o es susceptible a una enfermedad, afección o trastorno caracterizado por la pérdida de células o la pérdida de estructura, función o actividad del tejido. El método incluye la etapa de administrar al mamífero una cantidad terapéutica caracterizada por la pérdida de células, o pérdida de la estructura, función o actividad del tejido en este documento suficiente para tratar la enfermedad, afección o trastorno, o síntoma de la misma, en condiciones tales que se trata la enfermedad, afección o trastorno o síntoma de la misma.

40 Los métodos en este documento incluyen administrar al sujeto (incluido un sujeto identificado como que necesita dicho tratamiento) una cantidad eficaz de una composición, fibra, membrana o membrana de múltiples capas descrita en este documento, para producir dicho efecto. La identificación de un sujeto que necesita dicho tratamiento puede ser a juicio de un sujeto o un profesional de la salud y puede ser subjetiva (por ejemplo, opinión) u objetiva (por ejemplo, medible mediante un método de prueba o diagnóstico).

45 Los métodos terapéuticos descritos en este documento (que incluyen tratamiento profiláctico) en general comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones en este documento, tal como una composición, fibra, membrana o membrana de múltiples capas descrita en este documento a un sujeto (por ejemplo, animal, humano) que lo necesita, incluido un mamífero, en particular un humano. Tal tratamiento se administrará adecuadamente a sujetos, en particular humanos, que padecen, tienen, son susceptibles o están en riesgo de una enfermedad, trastorno o síntoma del mismo. La determinación de aquellos sujetos "en riesgo" se puede hacer mediante cualquier determinación objetiva o subjetiva mediante una prueba de diagnóstico u opinión de un sujeto o proveedor de atención médica (por ejemplo, prueba genética, marcador de enzima o proteína, marcador (como se define en este documento), antecedentes familiares, y similares).

50 Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en el arte una divulgación completa y una descripción de cómo hacer y usar el ensayo, la criba y los métodos terapéuticos de la invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención.

55 Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación de fibras y membranas (no según la invención)

El propósito de este estudio fue diseñar una membrana con propiedades antibacterianas y regenerativas que se degrade dentro de 6-12 semanas permitiendo la retención del injerto mientras se promueve un cierre más rápido del tejido suprayacente. Para lograr esto, se fabricaron gelatina electrohilada + bigotes de quitina (CW) + membranas de miel y posteriormente se comprimieron. Las membranas comprimidas tienen mayor manejabilidad, son menos porosas y mantienen un diámetro de fibra no comprimida. Se desean andamios menos porosos para esta aplicación para proporcionar regeneración guiada para el cierre del tejido. Adicionalmente, está documentado que las fibras más grandes y la adición de miel (antimicrobiana por naturaleza) pueden mejorar de forma independiente la respuesta pro regeneración. Los bigotes de quitina (CW) son un relleno nuevo y emergente, y se ha demostrado que refuerzan las estructuras poliméricas tanto sintéticas como naturales. La buena biocompatibilidad y biodegradabilidad también lo convierten en uno de los rellenos más prometedores.

En algunos experimentos, la gelatina se disolvió en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP) o ácido acético: agua desionizada 9:1 (DI) y electrohilada con MEDIHONEY® o MANUKAGARD® (0-50% en peso). El electrohilado con HFP o ácido acético: el agua DI como un disolvente dio como resultado andamios con fibras de tamaño micro y nano, respectivamente. Se comprimieron las membranas (reticuladas y no reticuladas con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida 25 mM (una o múltiples capas) usando una prensa hidráulica. Las membranas comprimidas tienen mayor manejabilidad, son menos porosas y mantienen un diámetro de fibra no comprimida. Se desean andamios menos porosos para esta aplicación para proporcionar regeneración guiada para el cierre del tejido. Adicionalmente, está documentado que las fibras más grandes y la adición de miel (antimicrobiana por naturaleza) pueden mejorar de forma independiente la respuesta pro regeneración. Este estudio analizará más a fondo la respuesta regenerativa de los fibroblastos dérmicos humanos sembrados en membranas compuestas.

Materiales y métodos

Los CW se prepararon según el método de Dufresne con modificaciones menores (Ji, Y-L, et al. Carbohydrate Polymers, 87, 2313-2319, 2012). La cantidad deseada de CW (15% en peso de gelatina) se volvió a dispersar en 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) por ultrasonidos. Se agregó gelatina (Tipo B) a la solución CW a 140 mg/mL. A continuación, se agregó MEDIHONEY® (100% de miel de *Leptospermum* activa) a la solución de gelatina + CW al 0, 5, 10% en peso de gelatina. Las soluciones se mezclaron e incubaron a 37 °C, durante la noche para garantizar la completa disolución/mezcla de todos los componentes. Las soluciones se cargaron en una jeringa de 5 mL y se electrohicaron usando los siguientes parámetros: 5 mL/h, +22 kV y una distancia de espacio de aire de 5 pulgadas. Las fibras se recogieron en un mandril giratorio de acero inoxidable con conexión a tierra de 1 pulgada (diámetro).

Los andamios se comprimieron para crear membranas multicapa con integridad mecánica mejorada mientras se mantenía la nanoestructura fibrosa. Se comprimieron 4 capas del mismo andamio usando planchas de metal en una prensa hidráulica durante 30 segundos a 4500 libras. Se tomaron imágenes de muestras no comprimidas y comprimidas de cada andamio (0, 5, 10% en peso de miel) usando un microscopio electrónico de barrido (SEM) a +20 kV para observar el diámetro de la fibra y la porosidad general. El diámetro de la fibra de todos los tipos de andamios no reticulados, tanto comprimidos como no comprimidos, se analizó adicionalmente mediante el cálculo de diámetros promedio de fibra y desviaciones estándar usando el software FibraQuant™ 1.3 (nanoScaffold Technologies, LLC).

La reticulación de todas las membranas de 4 capas se logró colocando cada membrana en una placa de Petri media que contenía 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) 40 mM en etanol durante 21 horas a temperatura ambiente. Al finalizar, las membranas se sumergieron en etanol y se perforaron discos de 6 mm y se usaron en estudios celulares.

Se usaron punzones de hueso de perro (2.71 mm de ancho en el punto más estrecho con una longitud de 18.63 mm) para pruebas mecánicas. La prueba de tracción uniaxial se realizó en las muestras de hueso de perro (n = 3) con una celda de carga de 100 N, una tasa de extensión de 1 mm/s, y una distancia de inicio de 7.7 mm entre los agarres. El módulo de elasticidad y la deformación en la rotura se calcularon a partir de la producción de tensión-deformación.

La adaptabilidad clínica/formabilidad de las membranas fue evaluada por un cirujano oral en condiciones tanto secas como hidratadas (0.9% de NaCl durante 30 minutos). La membrana de colágeno COLLAPLUG® (Zimmer Dental) se usó como control, ya que actualmente es uno de los estándares de barrera de membrana para la cirugía de preservación del encaje.

Viabilidad Celular (DAPI)

Se desinfectaron punzones de 6 mm de las membranas comprimidas directamente después de la reticulación a través de un remojo de etanol de 30 minutos seguido de tres lavados de PBS de 10 minutos. Se sembraron fibroblastos dérmicos humanos (HDF) en los punzones del andamio (n = 3) a 5,000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Los estudios se completaron durante 7 días con puntos de tiempo a 1, 3 y 7 días. Se produjeron cambios en los medios en cada momento. Después de cada punto de tiempo, los andamios celularizados se fijaron en formalina regulada al 10%. Luego se realizó la tinción de los núcleos celulares 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Se tomaron imágenes de los andamios usando un microscopio fluorescente Olympus para visualizar células viables.

Resultados, discusión y conclusión.

Las imágenes SEM de gelatina electrohilada no comprimida y comprimida + 15% de CW + andamios de miel (no reticulados) se muestran en la figura 1. Las distribuciones de tamaño de fibra se muestran en la figura 2. La figura 3 muestra la tensión en la rotura (3A) y el módulo de medidas de elasticidad (3B).

5 Adaptabilidad/formabilidad

La tabla 1 muestra la evaluación de la adaptabilidad clínica de membranas secas e hidratadas que tienen cantidades variables de miel. La mejor membrana (húmeda): 0% y 10% de miel. Peor membrana (húmeda): control CollaPlug (no mantiene la forma, es difícil de adaptar). Importancia clínica: la membrana comprimida debe hidratarse antes de su uso. La formabilidad se puede adaptar comprimiendo menos o más capas (Figura 4).

10 Tabla 1. Adaptabilidad clínica de membranas comprimidas secas (D) e hidratadas (húmedas, W) y controles CollaPlug evaluadas por un cirujano oral (parte superior).

	0	1	2	3	4
0% de miel		D			W
5% de miel		W	D		
10% de miel	D				W
CollaPlug	W				D
<p>Escala</p> <p>0 = no se puede formar, ya sea quebradizo o desgarrado</p> <p>4 = se puede formar fácilmente, mantiene la estructura cuando se manipula</p>					

Electrohilado y compresión

15 La figura 5 muestra imágenes de membranas electrohiladas comprimidas. Se logró la compresión manteniendo la arquitectura y las dimensiones fibrosas. Se notó algo de fusión de fibra después de la compresión, que probablemente dependa del estado de cristalización de la miel. Un andamio más deshidratado (en desecador) dará como resultado una estructura de miel más cristalina y, en última instancia, menos fibras no soldadas tras la compresión.

Prueba mecánica

20 Todos los andamios fallaron entre 90-120% de deformación (sin diferencia significativa). Los andamios que contenían 10% de miel tenían valores de módulo significativamente más altos en comparación con 0% de miel. Esto fue inesperado al principio ya que intuitivamente, más miel haría que los andamios fueran menos rígidos. Se planteó la hipótesis, ya que las pruebas mecánicas se realizaron directamente a partir de etanol de que la miel estaba en un estado deshidratado (más cristalino), lo que provocó el aumento del módulo. El trabajo futuro incorporará glicerina y análisis de muestras hidratadas con PBS, lo que probablemente inducirá una arquitectura de miel menos cristalina y dará como resultado andamios menos rígidos.

Viabilidad celular

30 Las células viables (HDF) eran visibles en la superficie de cada andamio para cada punto de tiempo. Visualmente, es difícil determinar las diferencias. Sin embargo, los estudios futuros analizarán la proliferación celular y los marcadores regenerativos secretados por células y la matriz extracelular.

Ejemplo 2. Preparación de esponja (no según la invención)

35 Las esponjas se fabricaron usando una solución de gelatina de 30 mg/mL en agua desionizada y se calentaron a 37 °C para garantizar que toda la gelatina estuviera en solución. Se agregó CW al 10% (bigote de quitina) a la solución de gelatina y se sometió a ultrasonido. Luego se añadieron 0 - 30 mg/mL de miel a la solución de gelatina + CW. Después de que la miel se disolvió, se agregó 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) 25 mM a la solución de gelatina + CW + Miel, se transfirió inmediatamente a un molde cilíndrico, se congeló a -80 °C, y se liofilizó. Las esponjas secas se comprimieron a 4,500 libras durante 30 segundos usando una prensa hidráulica.

La figura 6 muestra imágenes de DinoLite de apariencia general de gelatina no comprimida y comprimida + 10% de CW + 30 mg/mL de esponjas de miel. No comprimido: 5.5 mm de espesor; comprimido: 0.3 mm de espesor.

Las esponjas se pueden fabricar en cualquier tamaño (dependiendo del molde) y posteriormente comprimirse.

5 Las partículas se forman de manera similar a la membrana liofilizada con una etapa adicional (Figuras 7A-7B). Las partículas se pueden usar en combinación con la membrana liofilizada, como se muestra en la figura 7C. Después de congelar la solución compuesta, el material congelado se puede moler (por ejemplo, usando una licuadora) para formar algo similar al "hielo picado". Este hielo picado se liofiliza durante la noche para formar el material en partículas. Dado que las partículas están destinadas a la regeneración ósea, la concentración de relleno (por ejemplo, hidroxiapatita) aumentará (por ejemplo, al 50% o más) para mejorar la osteoconductividad. El desarrollo y el refinamiento de partículas pueden consistir en optimizar el proceso de fabricación para obtener un tamaño de partícula bastante consistente. Esto se puede lograr controlando la mezcla del material compuesto congelado para lograr el hielo picado o criopulverizando (en nitrógeno líquido) piezas liofilizadas más grandes en pequeñas. Los tamaños de partículas se pueden filtrar por tamaño usando tamices o tecnología equivalente para obtener tamaños de partículas uniformes/definidos. Se pueden realizar múltiples métodos para lograr (liofilizar el "hielo triturado" versus criopulverizar partículas de mayor tamaño (mm)) para optimizar el tamaño de las partículas. Preferiblemente, el material en partículas tiene un tamaño o un diámetro promedio que varía desde aproximadamente 100 μm a aproximadamente 10 mm, o en particular desde aproximadamente 1 mm a aproximadamente 5 mm.

20 Las membranas comprimidas secas e hidratadas de esta composición deben hidratarse antes de su uso (Figura 7E) y se pueden cortar/dimensionar fácilmente con tijeras y tener una gran manejabilidad. Tras la hidratación, las membranas se vuelven más flexibles y se pueden maniobrar fácilmente dentro del sitio de la cirugía tras la implantación. Una vez inicialmente hidratada, la manejabilidad por sí sola es una mejora significativa de las membranas existentes tales como COLLAPLUG®. Incluso después de unos días de hidratarse, las membranas biodegradables naturales actuales tales como BIO-GIDE® comienzan a perder su integridad mecánica.

Ejemplo 3. Membrana comprimida para aplicaciones de injerto óseo (no según la invención)

25 Además, la excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad también lo convierten en uno de los rellenos más prometedores. Estas membranas comprimidas combinan las ventajas de un material similar a una película con una superficie bioactiva para mejorar aún más la respuesta celular y la regeneración tisular guiada (GTR). Las membranas de gelatina + CW + MH exhiben biocompatibilidad y biodegradabilidad mejoradas, lo que sugiere su uso como una alternativa a los productos clínicos actuales.

30 Métodos y materiales

Fabricación de andamios

35 Los andamios se fabricaron usando una solución de gelatina de 30 mg/mL. 10% de CW (% en peso de gelatina) se dispersaron en agua DI y se sometieron a ultrasonido usando una micropunta durante 30 segundos a una amplitud del 2%. La gelatina y 0, 5, o 25% de MH (% en peso de gelatina) se solubilizaron dentro de la solución CW por incubación a 37 °C, durante 1 hora. Después de lograr una solución uniforme, se agregó un reticulador EDC 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) 40 mM, se mezcló brevemente, se transfirió inmediatamente a una pequeña placa de Petri, se congeló durante la noche a -80 °C y se liofilizó. Las esponjas liofilizadas se cortaron luego en secciones de 4 mm de espesor y se comprimieron usando una prensa hidráulica (Figura 8) a 4500 libras durante 30 segundos para crear las membranas finales (espesor entre 300 - 400 μm).

40 Degradación

45 La degradación del andamio mediante la cinética de liberación se estudió cuantificando la liberación de proteínas de cada andamio de 6 μm durante 14 días. Los andamios se incubaron a 37 °C en 1x PBS con PBS reemplazado en cada punto de tiempo. Después de 1, 4, 7, 11 y 14 días, el liberado se analizó para determinar la proteína general usando el ensayo de proteínas Pierce BCA. La gelatina y la MH no pudieron distinguirse y ambas contribuyeron a los resultados cuantitativos de la concentración media acumulativa. Para tener en cuenta esto, se calculó el porcentaje de liberación acumulativa usando andamios no reticulados totalmente degradados como contenido de proteína inicial total: % de liberación = (liberación)/(contenido inicial total) * 100.

Adhesión celular

50 Se cargaron discos de 6 mm de cada tipo de andamio en placas de 96 pocillos. Las membranas clínicas actuales, GEISTLICH BIOGIDE® (colágeno) y KLS MARTIN RESORB-X® (ácido poliláctico, película PLA), fueron perforadas y se usaron como controles clínicos. Todas las membranas fueron desinfectadas (30 minutos de etanol y tres lavados de PBS de 10 minutos) antes de la siembra celular. Se sembraron 20,000 fibroblastos dérmicos humanos (HDF) en membranas y se cultivaron durante 14 días. Después de 1, 7 y 14 días, se retiraron los medios y se congelaron mientras las membranas celularizadas se fijaron en formalina al 10%. Los andamios fijos se tiñeron con

4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y se tomaron imágenes fluorescentes de sus superficies sembradas de células para visualizar la unión celular.

Prueba mecánica

5 Los andamios acelulares hidratados se analizaron usando un sistema de compresión de platina uniaxial para determinar la carga máxima. Los rectángulos (2.5 x 0.5 cm) se cortaron y fijaron en una posición de arco al anclar los extremos a 1 cm de distancia (Figura 9). La platina superior se bajó a la superficie del andamio y se usaron los siguientes parámetros: velocidad de prueba de 10 mm/min y velocidad de adquisición de datos de 250 muestras/segundo. La compresión fue continua hasta que la platina superior alcanzó los anclajes. El análisis se terminó justo antes de que ocurriera este contacto y la fuerza máxima ejercida por los andamios se registró en 10 Newtons (N).

Adaptabilidad clínica/Formabilidad

Después de la hidratación, un cirujano oral calificó todas las membranas de gelatina + CW + MH en condiciones tanto secas como hidratadas (NaCl al 0.9% durante 30 minutos). KLS MARTIN, BIO-GIDE y COLLAPLUG® (membrana de colágeno, Zimmer Dental) se usaron como membranas de control clínico.

15 Discusión y conclusión

Espojas y compresión

20 Todos los andamios de gelatina + CW + MH exhibieron la misma arquitectura de superficie no comprimida (porosa) y comprimida (menos porosa) sin diferencias visuales discernibles entre los tipos de andamio (Figura 10). La superficie comprimida proporciona una plantilla para GTR en comparación con una membrana porosa donde las células inicialmente migran por todo el andamio.

Degradación

25 La adición de 5% de MH dio como resultado un perfil de liberación de concentración similar en comparación con 0% de MH, y ambos comenzaron a estabilizarse después de 14 días (Figuras 11A-11B). Las membranas de + 25% de MH exhibieron un perfil de liberación más lineal durante 14 días, lo que sugiere degradación a una velocidad constante. Después de 1 día, 0%, + 5% y +25% de MH liberaron 17%, 17% y 22% del contenido inicial total, respectivamente. Después de 14 días, 0%, +5% y más 25% de MH liberaron 44%, 34% y 49% del contenido inicial total, respectivamente. Los gráficos de porcentaje de liberación acumulativa revelaron perfiles interesantes, lo que sugiere que la adición de 5% de MH disminuye la velocidad de degradación del andamio. Esto no era de esperar ya que se pensaba que la adición de cualquier cantidad de MH aumentaba la velocidad de degradación (evidente en el 30 gráfico de + 25% de MH). Los datos proporcionan información sobre las tasas de degradación personalizables basadas únicamente en la incorporación de diversas concentraciones de MH.

Adaptabilidad/Formabilidad

35 La adaptabilidad clínica de membranas comprimidas secas (D) e hidratadas (húmedas, W) y controles Bio-Gide, KLS Martin y CollaPlug evaluadas por un cirujano oral. Cuando se hidrata, todas las membranas de gelatina + CW + MH se manipulan de manera similar a los controles Bio-Gide con porcentajes más altos de MH incorporada, lo que resulta en un aumento de la rotura de la membrana (Tabla 2). Sin embargo, las membranas de gelatina seca + CW + MH tenían una mayor adaptabilidad en comparación con los controles. En manos del cirujano, las membranas comprimidas se manipulan de manera similar a las membranas clínicas de colágeno (Figura 13).

Tabla 2. Adaptabilidad/Formabilidad

	1	2	3	4	5
0% de MH			W		D
+5% de MH		W			D
+25% de MH		W			D
Bio-Gide		W	D		
KLS Martin		D		W	
CollaPlug	W				D
Escala					
1 = no se puede formar, quebradizo o desgarrado					
5 = se puede formar fácilmente, mantiene la estructura cuando se manipula					

Prueba de compresión

5 Todas las membranas de gelatina + CW + MH ejercieron una fuerza máxima dentro del intervalo de 0.02 - 0.03 N mientras que los controles Bio-Gide y KLS Martin ejercieron 0 N y 0.75 N, respectivamente. Las membranas de gelatina + CW + MH muestran propiedades mecánicas mejoradas en comparación con el control Bio-Gide que no mantendría un arco para la prueba (Tabla 3). Se esperan los valores más altos de KLS Martin ya que es una película de PLA no porosa.

Tabla 3. Prueba de compresión

0% de MH	+5% de MH	+25% de MH	Bio-Gide	KLS Martin
0.03 N	0.03 N	0.02 N	0 N	0.75 N

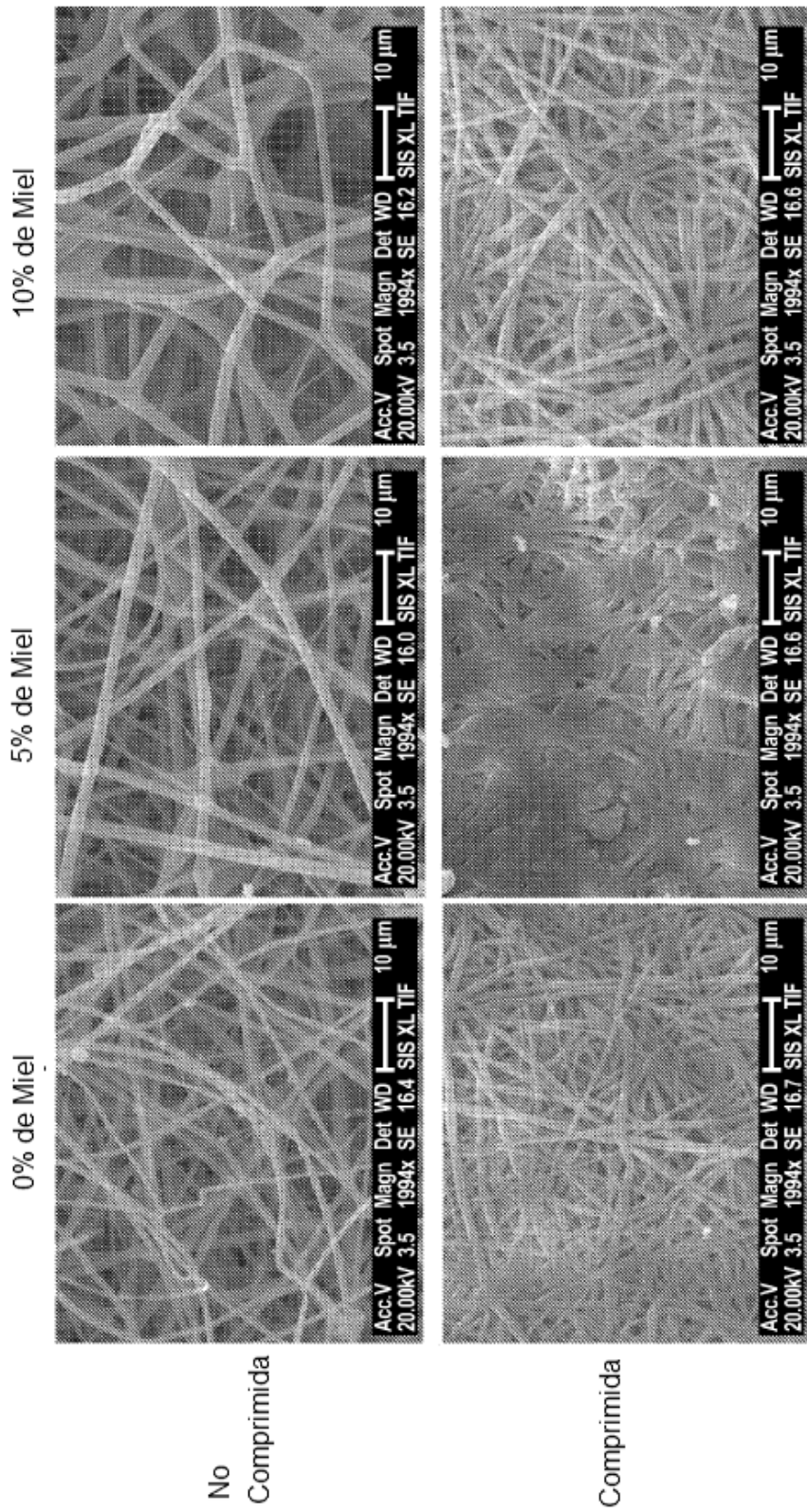
Adhesión celular

10 La adición de MH aumentó significativamente la unión celular en el día 1 en comparación con el 0% de MH y las membranas Bio-Gide (Figura 12). Las membranas KLS Martin también unieron una gran cantidad de células debido a su superficie de película 2D similar al plástico de cultivo de tejidos. El inconveniente de KLS Martin (PLA) es su degradación que conduce a un microambiente ácido. Después de 7 y 14 días, todas las membranas de gelatina + CW + MH se cubrieron en células donde los controles Bio-Gide todavía no tenían células visibles unidas.

15 imágenes fluorescentes se volvieron más difíciles a los 7 y 14 días probablemente debido a alguna migración de las células a medida que remodelaban la membrana. Los estudios futuros analizarán la proliferación celular, la viabilidad, los marcadores regenerativos secretados y la producción de matriz extracelular.

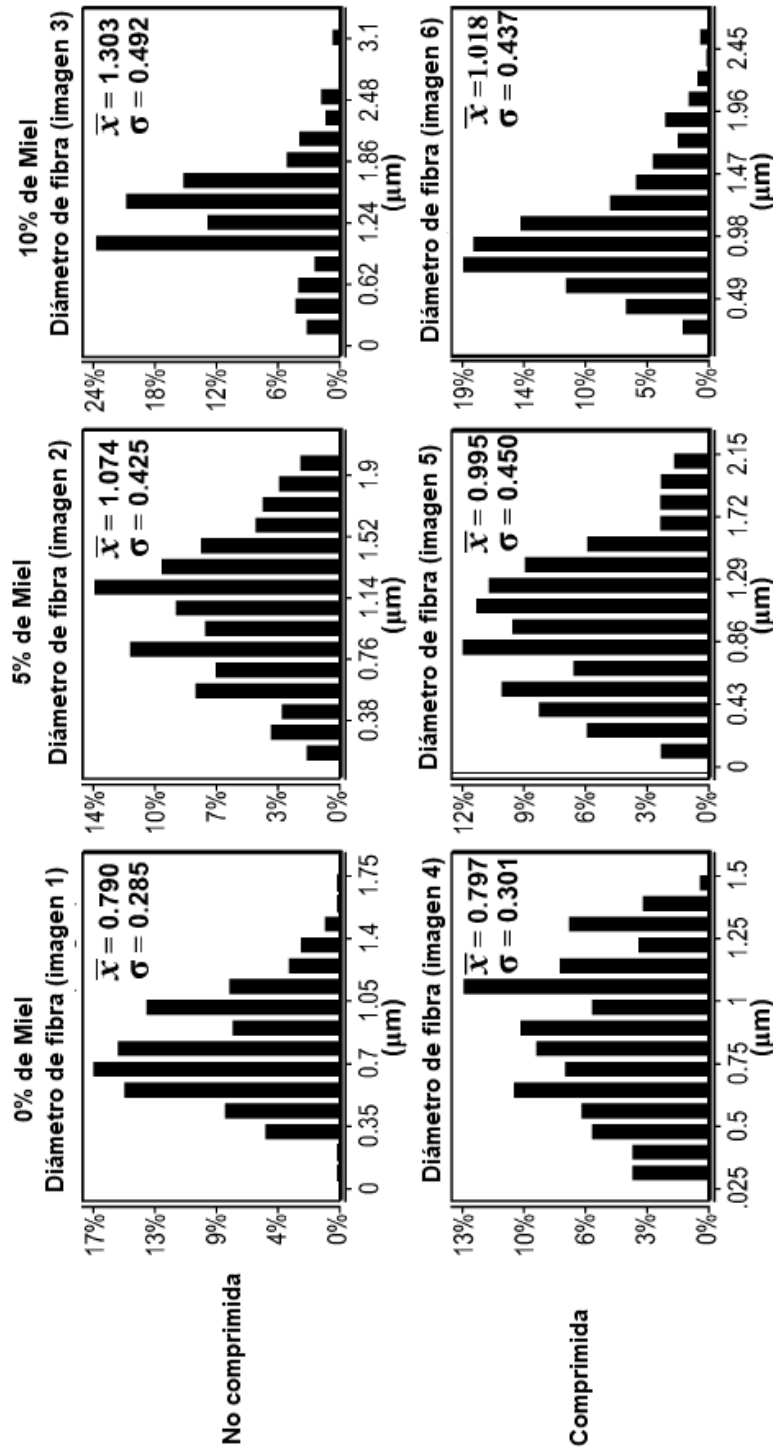
REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:
 - a) 100 partes en peso de un polímero biodegradable;
 - b) una miel en una cantidad desde 1 a 300 partes en peso con respecto a las 100 partes en peso del polímero; y
 - 5 c) un relleno que proporciona refuerzo estructural o rigidez a una fibra, filamento o membrana de polímero; en la que el relleno está en una cantidad desde 1 a 300 partes en peso con respecto a las 100 partes en peso del polímero biodegradable, y en la que el relleno comprende hidroxiapatita.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición comprende además al menos un relleno adicional o al menos un antibiótico adicional.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1, en la que el polímero biodegradable comprende una proteína, opcionalmente en la que la proteína es gelatina o colágeno.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que el polímero biodegradable comprende poli(ácido láctico), polidioxanona (PDO) o una mezcla de los mismos con gelatina o colágeno.
- 15 5. La composición de la reivindicación 1, en la que la miel está presente en una cantidad de 1 parte a 15 partes en peso, preferiblemente en la que la miel está presente en una cantidad de 5 partes a 10 partes en peso con respecto a 100 partes en peso del polímero biodegradable
6. La composición de la reivindicación 1, que comprende además una cantidad antibacterianamente eficaz de miel que varía desde 100 partes a 200 partes en peso con respecto a 100 partes en peso del polímero biodegradable.
- 20 7. La composición de la reivindicación 1, que comprende además una cantidad eficaz de miel para estimular la regeneración que varía desde 20 partes a 70 partes en peso con respecto a 100 partes en peso del polímero biodegradable.
8. La composición de la reivindicación 1 para usar en un método de tratamiento seleccionado del grupo de promoción de la regeneración ósea, curación de un defecto óseo, prevención de infección de un defecto óseo, promoción de la cicatrización de tejidos blandos en un tejido dañado o promoción de una respuesta de macrófagos en un tejido en la que el método comprende poner en contacto el hueso o tejido con dicha composición.
- 25



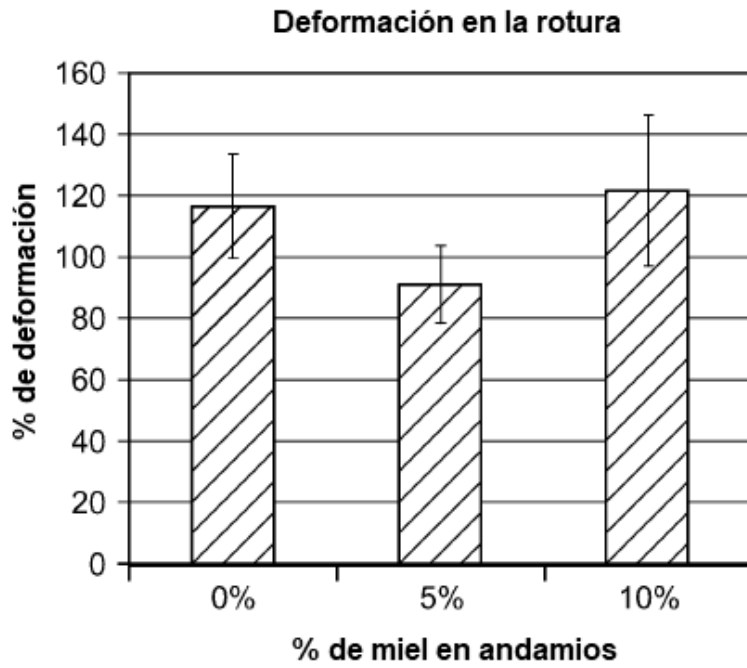
Imágenes SEM de andamios electrohilados no comprimidos y comprimidos de gelatina + 15% de CW + miel (no reticulados). Barras de escala y aumento a 10 µm y 2kx, respectivamente

FIG. 1



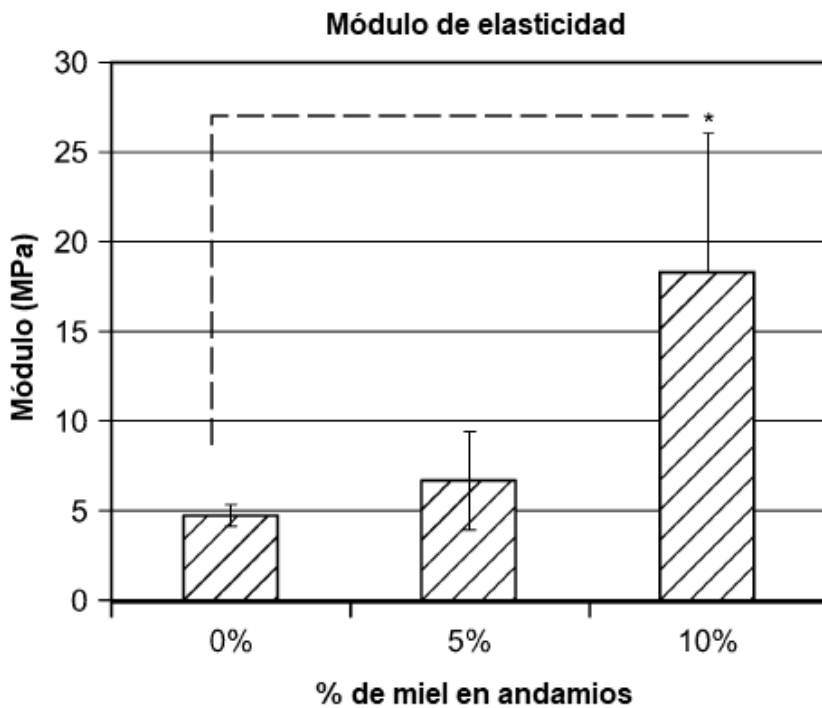
Análisis de diámetro de fibra automatizado FibraQuant™ usando imágenes SEM de la figura 1. Los histogramas anteriores muestran la distribución del tamaño de la fibra junto con las desviaciones medias y estándar T en micras.

FIG. 2



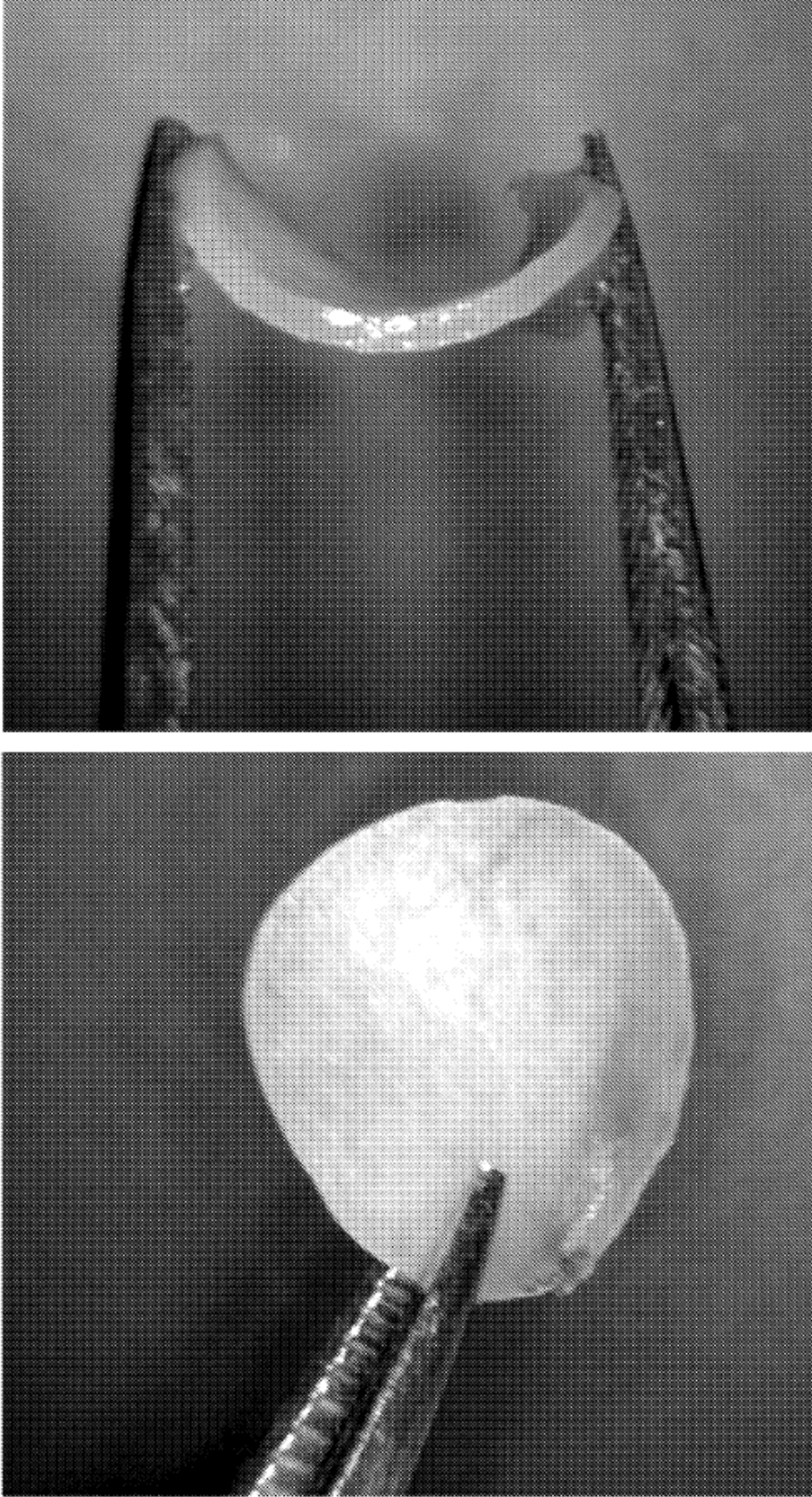
Prueba de tracción uniaxial de membranas electrohiladas comprimidas (deformación en la rotura).

FIG. 3A



Prueba de tracción uniaxial de membranas electrohiladas comprimidas (módulo elástico).

FIG. 3B



Membranas comprimidas de miel al 10% hidratadas moldeables.

FIG. 4

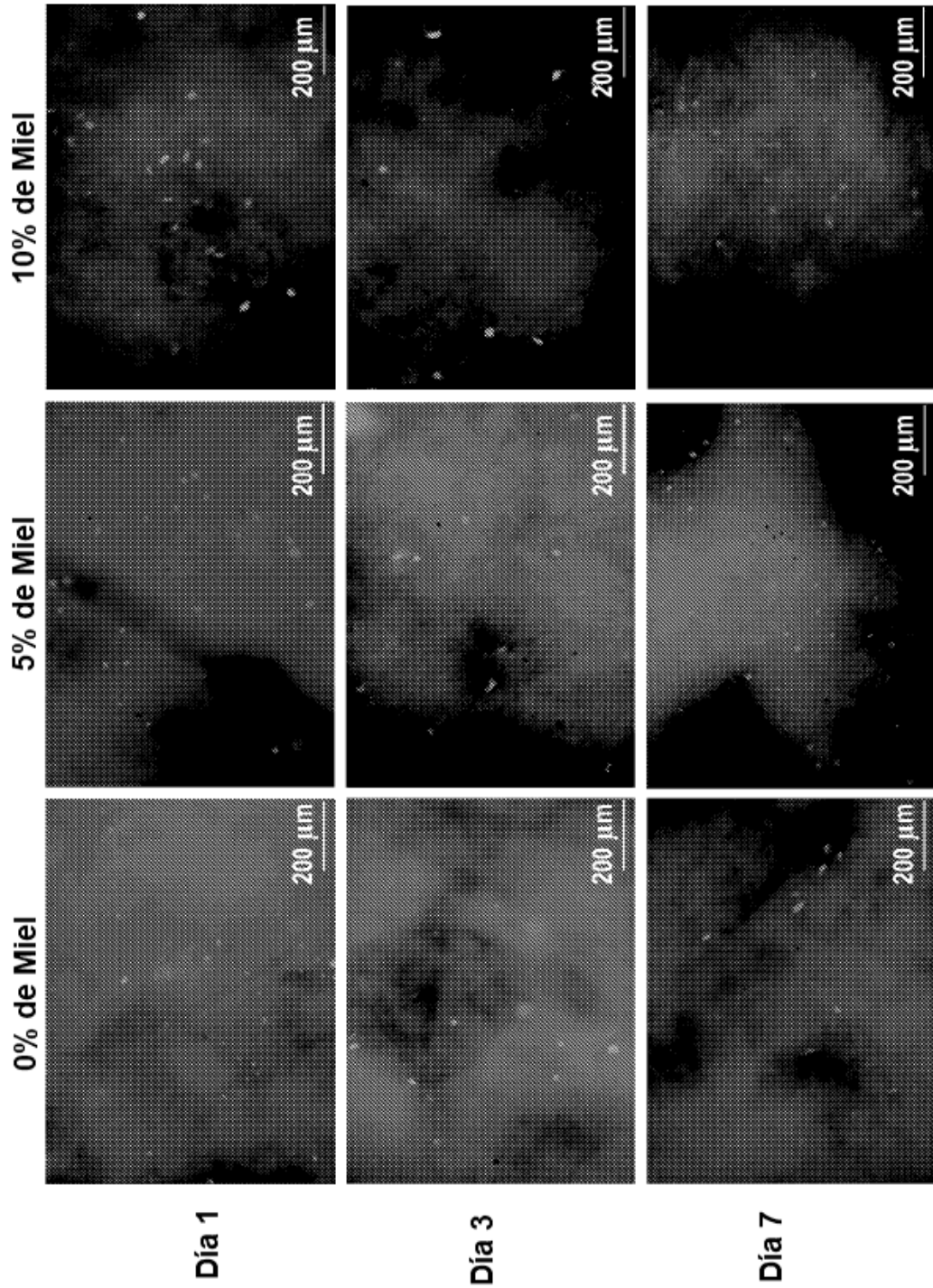
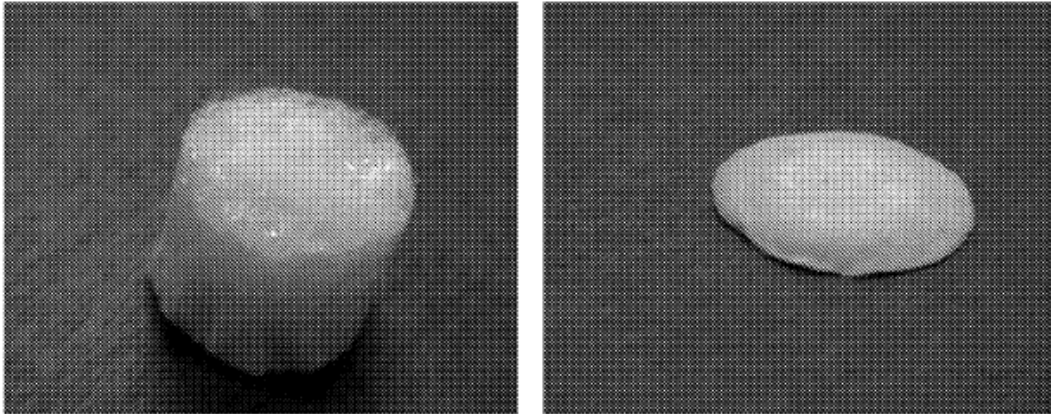


FIG. 5

Imágenes DAPI de membranas electrohiladas comprimidas celularizadas (HDF).
Barras de escala y aumento a 200 µm y 10x, respectivamente.

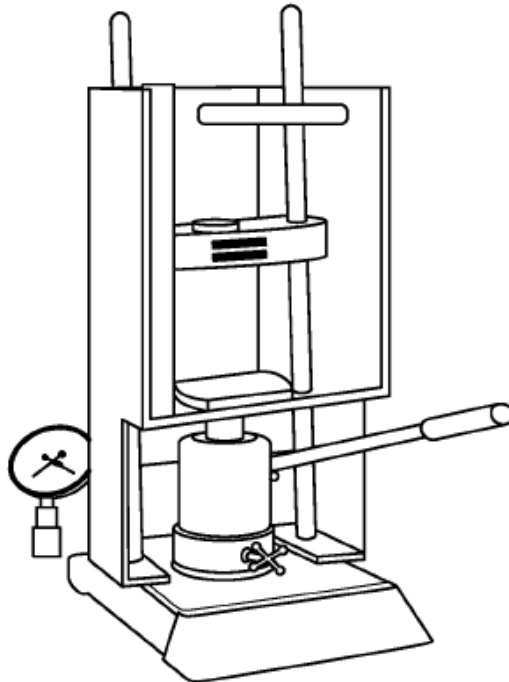


No comprimida
(5.5 mm de espesor)

Comprimida
(0.3 mm de espesor)

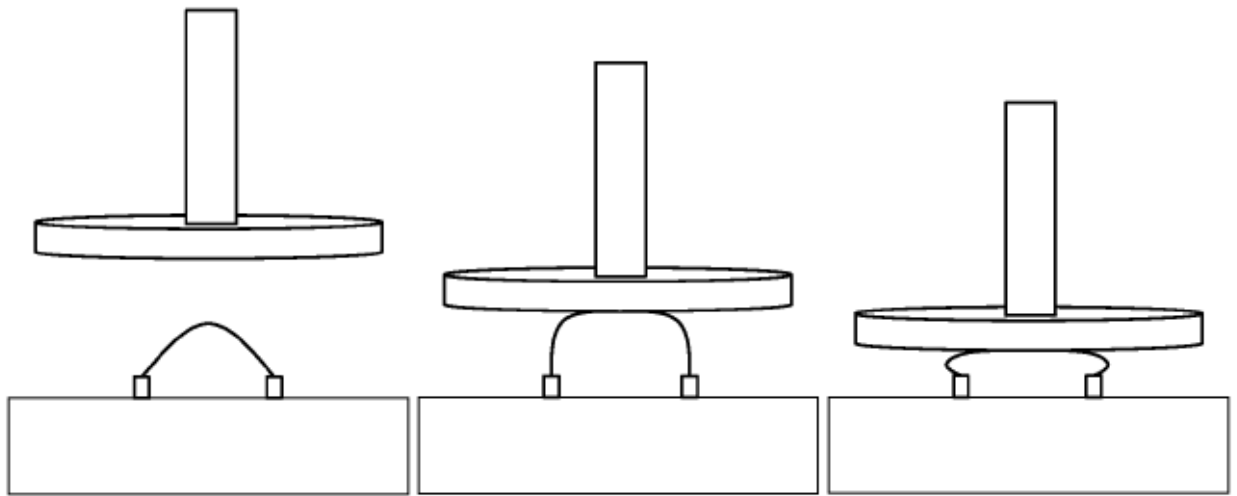
Imágenes de DinoLite del aspecto general de gelatina+ 10% de CW + 30 mg/mL no comprimida y comprimida de esponjas de miel. Las esponjas se pueden fabricar a cualquier tamaño (dependiendo del molde) y posteriormente se pueden comprimir.

FIG. 6



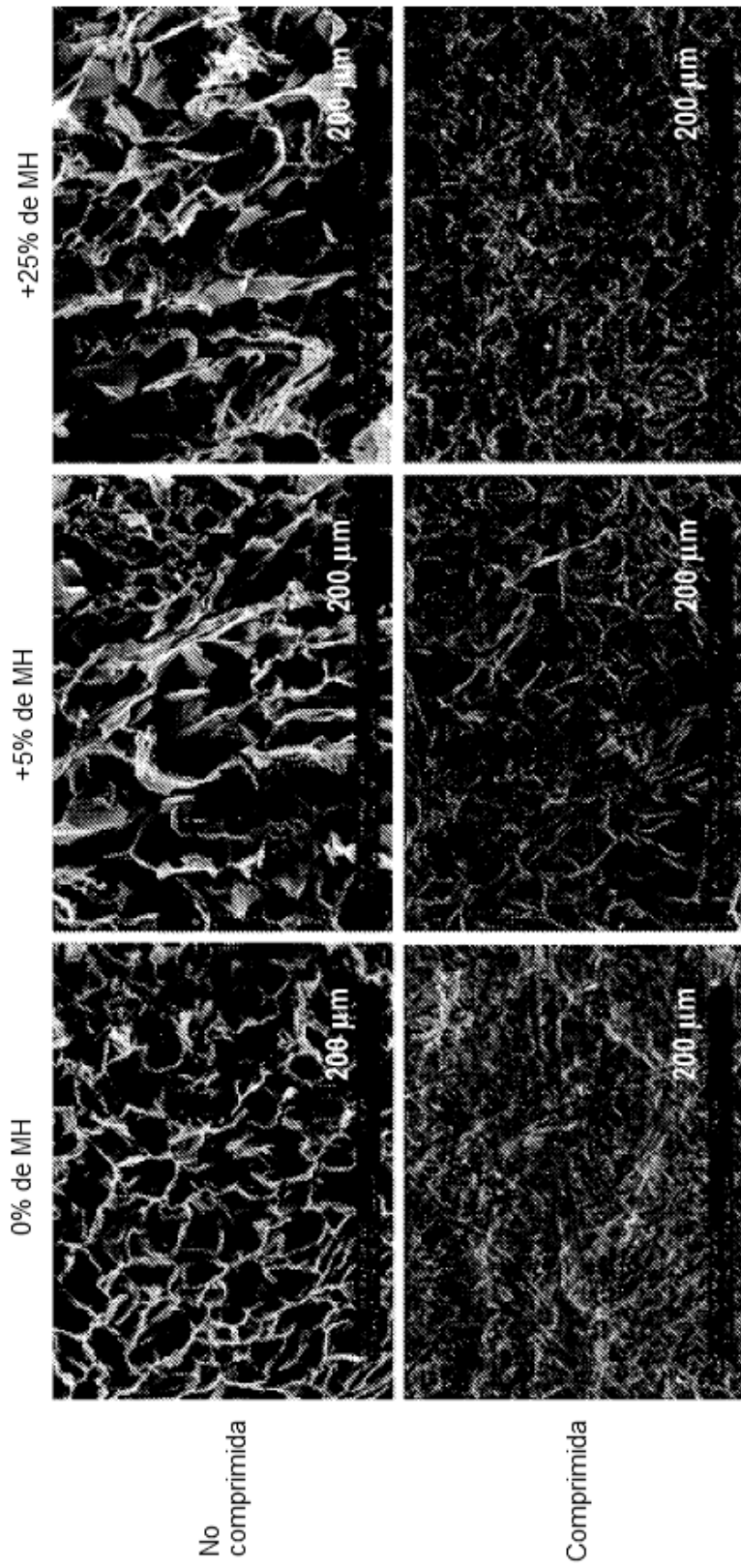
Unidad hidráulica Carver usada para compresión de andamio

FIG. 7



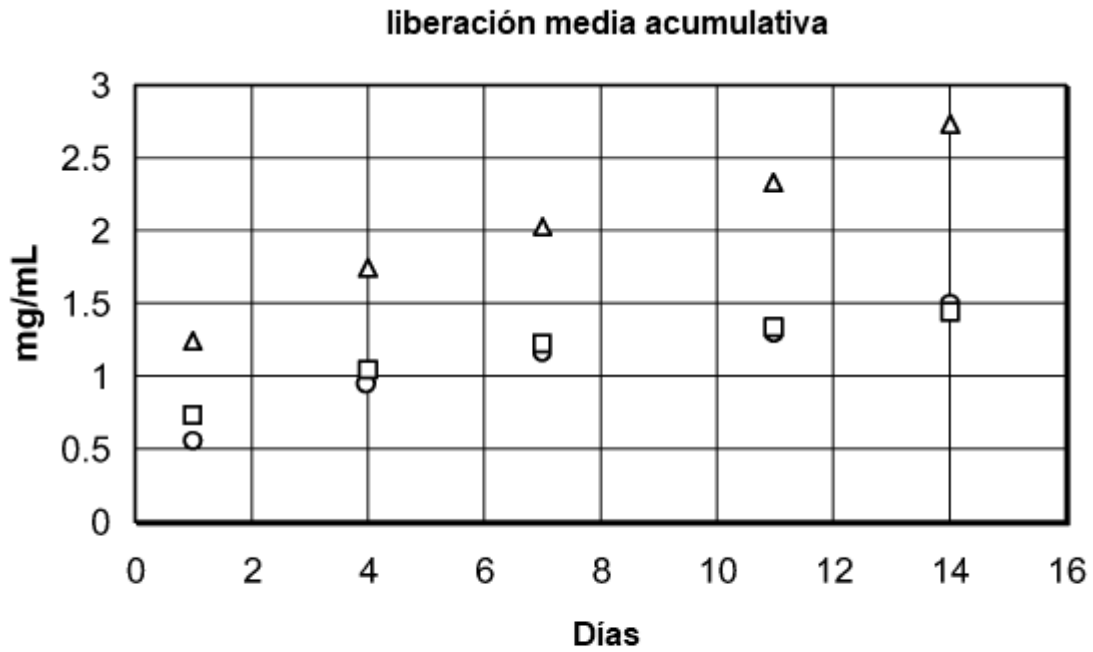
Esquema de prueba mecánica.

FIG. 8



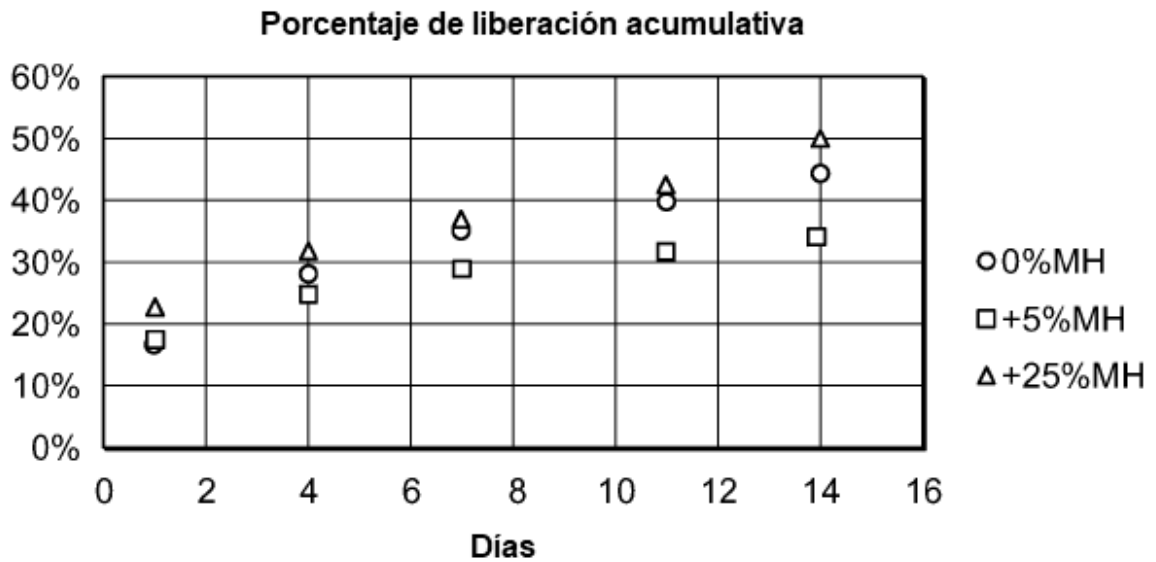
Imágenes SEM de membranas de gelatina + CW + MH no comprimidas y comprimidas
Barras de escala y aumento a 200 μm y 100x, respectivamente.

FIG. 9



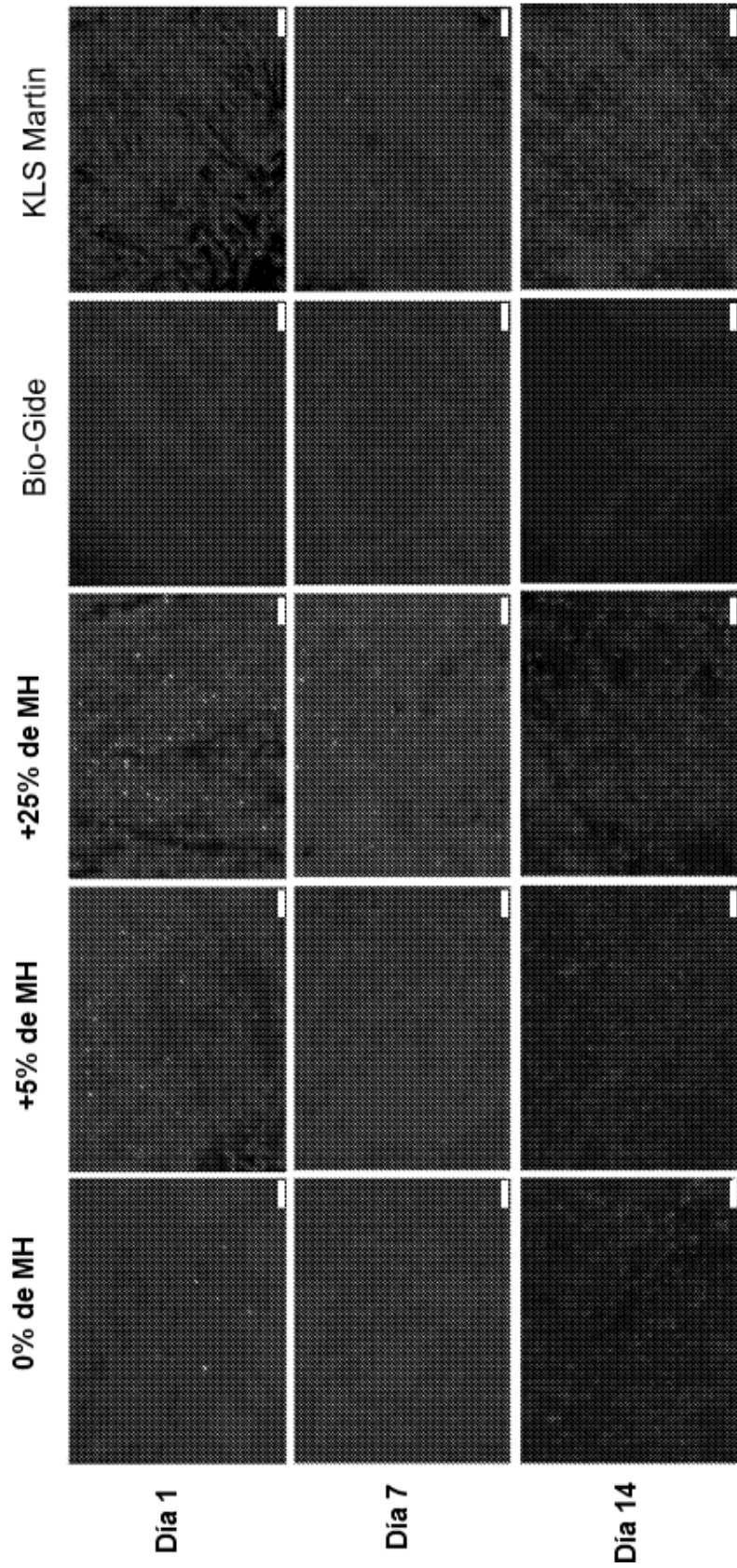
Resultados de degradación de Gelatina + CW + MH (ensayo BCA) como se muestra con la medición de liberación media acumulativa

FIG. 10A



Resultados de degradación de Gelatina + CW + MH (ensayo BCA) como se muestra con la medición de porcentaje de liberación acumulativa.

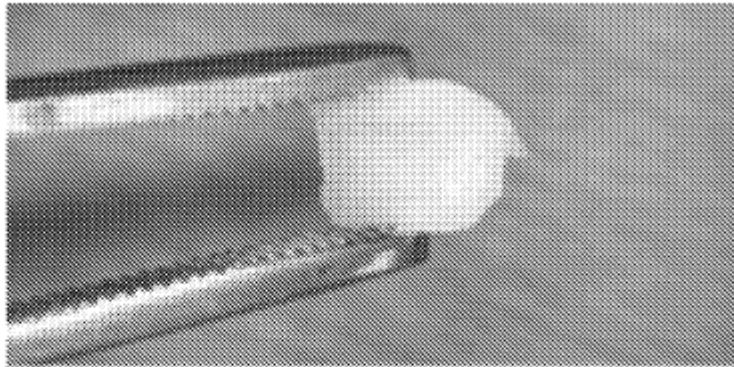
FIG. 10B



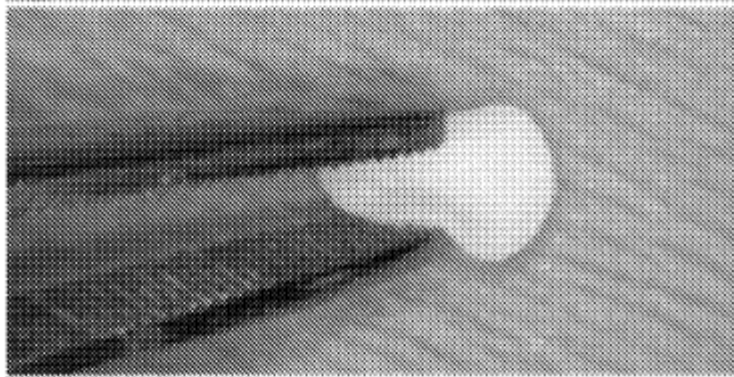
Imágenes DAPI de membranas de gelatina + CW + MH comprimidas celularizadas (HDF). Barras de escala y aumento a 100 μm y 10x, respectivamente.

FIG. 11

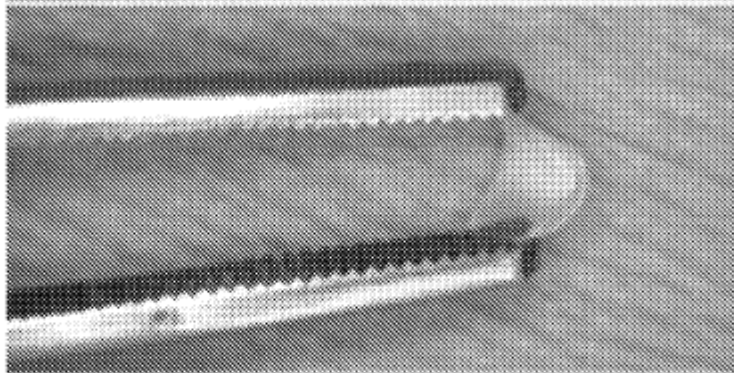
+5% de MH



Bio-Gide



KLS Martin



Membranas hidratadas moldeables.

FIG. 12