

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 780 648**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/58** (2006.01)

**A61F 2/04** (2013.01)

**A61L 31/04** (2006.01)

**C08G 64/18** (2006.01)

**C08G 69/44** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2016 PCT/US2016/027858**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016 WO16168669**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2016 E 16780881 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 3283137**

54 Título: **Implantes biocompatibles para la regeneración nerviosa y procedimientos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

**15.04.2015 US 201562148087 P**

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

**26.08.2020**

73 Titular/es:

**RUTGERS, THE STATE UNIVERSITY OF NEW JERSEY (100.0%)  
Old Queen's Somerset Street  
New Brunswick, NJ 08909, US**

72 Inventor/es:

**KOHN, JOACHIM, B.;  
CLEMENTS, BASAK y  
EZRA, MINDY**

74 Agente/Representante:

**SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio**

ES 2 780 648 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**

Implantes biocompatibles para la regeneración nerviosa y procedimientos de uso de los mismos

5 Campo técnico

Este documento de patente se refiere al campo de los implantes para la regeneración nerviosa, y más particularmente a conductos nerviosos biocompatibles y bio-absorbibles y envolturas nerviosas para el tratamiento o reparación de una lesión de nervios periféricos cuyo funcionamiento biológico se mejora aún más con recubrimientos para controlar la infiltración de tejido fibroso.

Antecedentes

15 La lesión del nervio periférico causada por un trauma o cirugía puede conducir a la pérdida de la sensación y el movimiento. La velocidad y el alcance de la recuperación son lentos, generalmente incompletos y variables. La pérdida de función resultante puede ser muy angustiante para el paciente y puede conducir a una discapacidad permanente debido a la falta de opciones de tratamiento adecuadas.

20 Los conductos nerviosos se utilizan en las lesiones del sistema nervioso periférico para unir los extremos de los nervios cortados y cerrar el espacio entre los dos extremos. Los conductos nerviosos proporcionan un espacio para que crezcan las fibras nerviosas (axones), protegen las fibras nerviosas frágiles recién recuperadas de traumatismos adicionales e, idealmente, también brindan protección contra la penetración de las células de tejido conectivo (fibroblastos), que tienden a obstaculizar el crecimiento de axones. Las envolturas nerviosas son láminas que se envuelven alrededor de un nervio dañado para proporcionar soporte mecánico, minimizar el trauma adicional al nervio dañado y mejorar la recuperación funcional del nervio dañado. Los conductos nerviosos y las envolturas nerviosas se denominan colectivamente en este documento de patente como Dispositivos de Asistencia Nerviosa (NAD) a menos que sea necesario referirse específicamente a los conductos nerviosos o envolturas nerviosas.

30 Los NAD degradables y reabsorbibles se prefieren para la regeneración nerviosa, ya que durante la curación y luego de que las fibras nerviosas se han restaurado, los NAD se descomponen y reabsorben para que la estructura extraña no requiera remoción y no corra el riesgo de dañar o irritar el nervio regenerado después de la fase de curación. Los NAD se desarrollaron a partir de polímeros sintéticos (por ejemplo, poli(ácido láctico)), polímeros derivados de origen biológico (por ejemplo, colágeno, gelatina entrecruzada) y materiales derivados de cadáveres humanos o animales, como injertos de venas e injertos nerviosos. Sin embargo, muchos de estos conductos se asocian a una mala cicatrización como resultado de la hinchazón y la reducción del volumen luminal, extracción de la sutura, colapso, torcedura, compresión y falta de resistencia mecánica para resistir la tracción de las articulaciones en movimiento.

40 Continúa existiendo la necesidad de NAD biocompatibles y biorreabsorbibles en forma de conductos nerviosos y envolturas nerviosas que no solo ofrezcan propiedades físicas y mecánicas deseables, en particular resistencia a las torceduras y suturabilidad, sino que también faciliten el crecimiento de las fibras nerviosas y brinden protección contra la infiltración de tejido no nervioso. Tales NAD también deben tener perfiles de biodegradación y biorreabsorción adecuados para que el momento de su pérdida de fuerza e integridad física coincida con el tiempo requerido para la recuperación funcional del nervio dañado o cortado.

45 El documento EP2228036 describe tubos inductores de la regeneración nerviosa con propiedades anti-torceduras que comprenden un cuerpo tubular poroso tejido con haces de fibras de dos fibras poliméricas biodegradables ultrafinas diferentes.

50 Mindy Ezra y otros, (PARTE DE INGENIERÍA DE TEJIDOS A, 12-11-2013, XP055513864) describen conductos porosos y no porosos, no fibrosos, para la regeneración nerviosa que comprenden, un terpolímero de desaminotirosil tirosina, desaminotirosil tirosina etil éster y polietilenglicol.

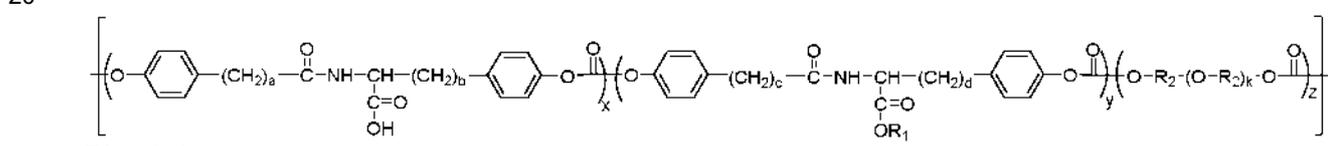
Resumen de la invención

55 El alcance de la invención se define por las siguientes reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a los métodos de tratamiento se refiere a las composiciones y artículos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

60 Diversas modalidades proporcionan NAD adecuados para el tratamiento o la reparación de lesiones del nervio periférico, ofreciendo mejoras significativas sobre los conductos convencionales en varios aspectos. En primer lugar, el polímero utilizado para construir el conducto nervioso no solo es biocompatible y biorreabsorbible, sino que se encontró que ayuda al crecimiento de axones a través de la adsorción de proteínas endógenas. En segundo lugar, se ha identificado una biblioteca de polímeros de modo que la tasa óptima de degradación y biorreabsorción de los NAD puede ajustarse para que coincida con el tiempo que se requiere para que los axones en crecimiento atraviesen la longitud del espacio entre los nervios que se necesitan enlazar. Este ajuste de la velocidad de biodegradación y biorreabsorción puede realizarse con un efecto mínimo sobre las propiedades mecánicas y biológicas del polímero. En tercer lugar, aunque se conoce bien

5 el entrelazado, ahora se reconoce que el entrelazado ofrece ventajas importantes al construir los NAD (mejora de la resistencia a la compresión, mejora de la resistencia a las torceduras y estiramientos). En cuarto lugar, el papel de la porosidad de la pared de los NAD ha sido una controversia muy debatida en la literatura científica. Ahora se reconoce que la pared de los NAD debe ser porosa para permitir el intercambio de nutrientes a lo largo de toda la longitud del dispositivo, pero la porosidad debe estar estrictamente controlada para evitar la infiltración indeseable de tejido fibroso en el lumen interno de los NAD. Por lo tanto, un cuarto aspecto de esta invención es el desarrollo de un recubrimiento similar a un hidrogel que controla la infiltración de tejido fibroso al tiempo que proporciona una mejor difusión de oxígeno y nutrientes a través de las paredes de los NAD. La combinación de estos cuatro aspectos da como resultado un diseño nuevo y mejorado de los NAD, de modo que el funcionamiento general de los NAD conduce a una mejor regeneración nerviosa funcional para el paciente.

15 En un aspecto de la invención, se proporciona un conducto nervioso que incluye un tubo entrelazado poroso para la regeneración nerviosa. El tubo entrelazado poroso está recubierto con un hidrogel biorreabsorbible y fabricado a partir de un polímero biocompatible reabsorbible que ayuda en el crecimiento del axón debido a la adsorción de proteínas endógenas en su superficie. Las fibras se entrelazan formando poros en el rango de 5 a 200 micrómetros mediante el uso de un patrón de entrelazado resistente a las torceduras y el material de recubrimiento de hidrogel y el grosor se seleccionan para controlar la porosidad general de modo que los nutrientes y el oxígeno puedan difundir a través de dicho recubrimiento de hidrogel, pero se evita la infiltración de tejido fibroso a través del recubrimiento. El polímero biocompatible reabsorbible tiene unidades repetidas de la estructura de la Fórmula I:



Fórmula I

25 en donde a y b son independientemente 0 o un número entero entre 1 y 6, incluso; en donde c y d son independientemente 0 o un número entero entre 1 y 6, incluso; en la que cada R<sub>1</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en un grupo alquilo lineal y ramificado que contienen hasta 18 átomos de carbono; en donde cada R<sub>2</sub> es independientemente un grupo alquileo que contiene hasta 6 átomos de carbono; en donde k es entre 20 y 200; y en donde x varía entre 0,002 y 0,20; z oscila entre 0,005 y 0,1; y x + y + z = 1,00

30 En algunas modalidades de la Fórmula I, a y b son dos y uno, respectivamente.

En algunas modalidades de la Fórmula I, c y c son dos y uno, respectivamente, y R<sub>1</sub> es etilo.

35 En algunas modalidades de la Fórmula I, R<sub>2</sub> es etileno y k es entre aproximadamente 25 y aproximadamente 50.

Los NAD se fabrican entrelazando fibras hechas de un polímero que tiene unidades repetidas de la Fórmula I descrita anteriormente.

40 En algunas modalidades, los NAD se fabrican usando un patrón de entrelazado biaxial enrollado helicoidalmente.

En algunas modalidades, los NAD porosos están recubiertos con un hidrogel biorreabsorbible, que es ácido hialurónico entrecruzado (HA).

45 En algunas modalidades, el hidrogel de HA biorreabsorbible se entrecruza con poli(diacrilato de etilenglicol) (PEGDA).

En algunas modalidades, el conducto nervioso biocompatible incluye además un segundo hidrogel biorreabsorbible para llenar el lumen interno del conducto nervioso biocompatible.

50 En algunas modalidades, el segundo hidrogel biorreabsorbible que se utiliza para llenar el lumen interno del conducto nervioso biocompatible es un gel a base de colágeno mejorado con un factor neurotrófico unido covalentemente, como un péptido mimético del glicano humano *natural killer-1* (referido a como m-HNK-1) promotor de neurita.

55 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para el tratamiento o reparación de una lesión de nervio periférico mediante el uso de la implantación de los NAD descritos anteriormente, ya sea en forma de un conducto nervioso o en forma de una envoltura nerviosa. Los muñones proximales y distales del nervio lesionado se seccionan limpia y perpendicularmente para que no quede tejido no viable. Luego, el conducto se coloca *in situ* de modo que se pueda colocar aproximadamente 1 mm de cada muñón en los extremos proximal y distal del conducto, respectivamente, y los muñones nerviosos se aseguran al conducto utilizando técnicas convencionales de microneurocirugía. El conducto puede estabilizarse aún más al tejido blando circundante con suturas, o inundando el sitio de reparación con un adhesivo similar a la fibrina, o ambos. En el caso de una envoltura nerviosa, el nervio dañado se coloca cuidadosamente dentro de la envoltura que luego se cierra alrededor del nervio dañado suturando la envoltura nerviosa hasta cerrarla.

En otro aspecto más de la invención, se proporciona el conducto descrito anteriormente con un nervio o tejido nervioso o componente celular nervioso que se inserta en el lumen interno del conducto nervioso biocompatible. Los componentes celulares pueden inyectarse dentro de un hidrogel para llenar el lumen, o pueden inyectarse en una carga de tipo hidrogel dentro del lumen. Los componentes del tejido pueden colocarse en el lumen después de que el conducto se corta longitudinalmente para proporcionar acceso. Alternativamente, se puede usar una envoltura nerviosa para encerrar el nervio dañado y cualquiera de los rellenos descritos anteriormente, seguido de cerrar el conducto o envoltura mediante sutura. Como parte de este aspecto de la invención, es posible crear conductos y envolturas que tengan una tendencia inherente a retener una forma curvada, facilitando el cierre del dispositivo mediante sutura después de que los nervios y materiales de relleno dañados se hayan colocado con éxito dentro del lumen interno del dispositivo.

En algunas modalidades, el segundo hidrogel biorreabsorbible para llenar el lumen interno de los NAD biocompatible es un hidrogel derivado de colágeno mejorado unido covalentemente con un péptido mimético de poli(ácido siálico) (denominado aquí mPSA) promotor de axones.

En algunas modalidades, el lumen interno del conducto nervioso biocompatible es un hidrogel que contiene una dosis terapéutica y es capaz de liberar, cualquiera de los factores biológicos conocidos que mejoran el crecimiento del axón, tales como m-HNK-1, m-PSA u otros.

En otro aspecto más (que no forma parte de la invención), los mismos polímeros se fabrican en láminas entrelazadas que opcionalmente pueden recubrirse con los mismos hidrogeles, que contienen opcionalmente las mismas sustancias biológicamente activas (m-HNK-1, m-PSA u otras moléculas pequeñas miméticas de factores biológicos conocidos que mejoran el crecimiento de la fibra nerviosa) para que las láminas se puedan usar como envolturas nerviosas en lugar de como conductos nerviosos.

En otra modalidad más de la invención, se encontró la adición de un agonista de 5-HT<sub>4</sub>, que incluye, pero no se limita a, BIMU-8, Cisapride, CJ-033,466, Mosapride, Prucalopride, Renzapride, RS-67333, SL65.0155, Zacopride y Tegaserod, para apoyar aún más el crecimiento de axones dentro del lumen de un NAD.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una unidad de polímero que consiste en desaminotirosil tirosina etil éster (DTE) copolimerizado con 10 % en moles de desaminotirosil tirosina (DT) y 0,50 % en moles de poli(etilenglicol) (PEG) (MW 1000).

La Figura 2 muestra vistas en sección transversal de conductos con diferente porosidad.

La Figura 3 muestra la evaluación *in vitro* de la proliferación de neuritas y la proliferación y extensión de células de Schwann en películas bidimensionales (2D) del polímero de la Figura 1 y polietileno (PE) en comparación con sustratos de control, poliestireno de cultivo de tejidos (TCPS) y vaso.

La Figura 4 muestra la absorción relativa de proteínas de la matriz extracelular (ECM) neurodeportivas (laminina, fibronectina y colágeno tipo I) en películas 2D del polímero de la Figura 1 y PE en comparación con un sustrato de control.

La Figura 5 muestra el análisis histomorfométrico de los nervios femorales regenerados en el polímero de la Figura 1 y los conductos de polietileno no poroso (NP-PE).

La Figura 6 muestra cuadros de video de las mediciones funcionales realizadas en ratones después de la implantación del conducto y las métricas de recuperación funcional promovidas por el polímero de la Figura 1 y los conductos de polietileno no poroso *in vivo*.

La Figura 7 muestra secciones representativas de nervios y análisis de diámetro de la fibra.

La Figura 8 muestra las primeras diferencias en la reparación nerviosa entre los materiales del conducto.

Descripción detallada

Diversas modalidades proporcionan conductos nerviosos para la regeneración nerviosa. Los conductos fabricados con polímeros de la presente invención en formas adecuadas ofrecen ventajas potenciales que incluyen intervalos adecuados de tasas de biodegradación y resorción, propiedades mecánicas convenientes y compatibilidad con el tejido circundante. Los recubrimientos en el tubo de fibra porosa de dichos conductos promueven aún más el crecimiento del axón y sirven como barrera contra el tejido no nervioso. Los rellenos lumbinales de hidrogel también facilitan una regeneración axonal más rápida en comparación con la infiltración de tejido fibrótico. Los conductos de la presente invención también pueden incluir un nervio o tejido nervioso preimplantado como semilla, promotor o puente para la regeneración nerviosa. Los dispositivos de la invención, por lo tanto, encuentran utilidad en el tratamiento de un trauma o una lesión a un nervio o nervios en el cuerpo de un humano o un animal.

A lo largo de este documento de patente, se hace referencia a varias publicaciones. Si bien el siguiente texto puede hacer referencia o ejemplificar polímeros, tubos de fibra o conductos nerviosos específicos, no se pretende limitar el alcance de la invención a tales referencias o ejemplos particulares. Los expertos en la materia pueden hacer varias modificaciones, tomando en cuenta consideraciones prácticas y económicas. Con el fin de describir de manera más clara y concisa el tema de las reivindicaciones, las siguientes definiciones se destinan a proporcionar orientación sobre el significado de los términos utilizados en la presente descripción.

#### Definición

Los artículos "un" y "una", como se usan en la presente descripción, se refieren a "uno o más" o "al menos uno", a menos que se indique de cualquier otra manera. Es decir, la referencia a cualquier elemento de la presente invención por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno de los elementos.

"Aproximadamente", como se usa en la presente descripción, se refiere a la indicación numérica referenciada más o menos 10 % de esa indicación numérica referenciada.

Los términos "alquilo", "alquilenos" y términos similares tienen el significado habitual conocido por los expertos en la técnica y, por lo tanto, pueden usarse para referirse a grupos hidrocarbonados de cadena de hidrocarburos lineales o ramificados totalmente saturados (sin enlaces dobles o triples). Grupos alquilo terminal, por ejemplo, de la fórmula  $-C_nH_{2n+1}$  pueden ser referidos en la presente descripción como grupos "alquilo", mientras que la unión de grupos alquilo, por ejemplo, de la fórmula general  $-(CH_2)_n-$ , puede ser referido en la presente descripción como grupos "alquilenos". El grupo alquilo puede tener de 1 a 18 átomos de carbono (siempre que aparezca en la presente descripción, un rango numérico como "1 a 18" se refiere a cada número entero en el rango dado; por ejemplo, "1 a 18 átomos de carbono" significa que el grupo alquilo puede consistir en 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etcétera, hasta 18 átomos de carbono incluso. El grupo alquilo también puede ser un alquilo de tamaño medio que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. El grupo alquilo también podría ser un alquilo inferior que tiene de 1 a 5 átomos de carbono. El grupo alquilo de los compuestos puede designarse como "C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquilo" o designaciones similares. A modo de ejemplo solamente, "C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquilo" indica que hay uno a cuatro átomos de carbono en la cadena alquilo, es decir, la cadena alquilo se selecciona de entre el grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo y t-butilo. Los grupos alquilo típicos incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, butilo terciario, pentilo, hexilo y similares.

El término "degradación" o "biodegradación" como se usa en la presente descripción se refiere al proceso que conduce a la escisión química de la cadena principal del polímero, dando como resultado una reducción en el peso molecular del polímero y la resistencia mecánica. La tasa de degradación del polímero en condiciones fisiológicas está determinada predominantemente por el tipo de enlaces utilizados para unir las unidades individuales de repetición del polímero. Por lo tanto, los polianhídridos, por ejemplo, los polímeros que contienen el enlace anhídrido altamente lábil tenderán a degradarse más rápido que los poliésteres. En contraste, el término "resorción" o "biorreabsorción" se define como el proceso que conduce a una reducción de la masa de un dispositivo implantado. La velocidad de reabsorción se rige predominantemente por la solubilidad del propio polímero o sus productos de degradación. La reabsorción de un implante se completa, una vez que se ha eliminado toda la masa del implante del sitio del implante.

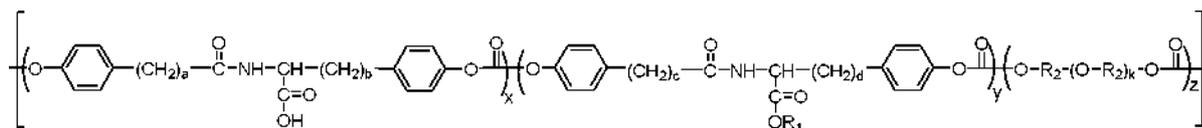
El término "biocompatible" tiene muchos significados diferentes en la literatura científica. En el contexto de este documento de patente, se entiende que un implante biocompatible funciona dentro del cuerpo humano sin causar una respuesta tisular clínicamente inaceptable en el sitio del implante, donde una respuesta tisular inaceptable requeriría, en la práctica clínica razonable y establecida, la extracción del implante del cuerpo humano.

En un aspecto se proporciona un conducto nervioso biocompatible para la regeneración nerviosa que incluye un tubo de fibra porosa recubierto con un hidrogel biorreabsorbible. Los conductos nerviosos de la presente invención están fabricados a partir de fibras que ofrecen ventajas sobre los conductos convencionales en términos de biodegradación y perfil de biorreabsorción, propiedades mecánicas, adsorción de proteínas, formación de matriz de fibrina e infiltración de células de Schwann. Los resultados del estudio *in vitro* e *in vivo* (Figuras 1-8) indican que un conducto nervioso que incorpora las cuatro estrategias de diseño descritas anteriormente funciona significativamente mejor que los conductos convencionales que no incorporan esas estrategias de diseño. Específicamente, el conducto de la presente invención se comparó con un conducto convencional construido con polietileno (PE). Las cuatro estrategias de diseño descritas anteriormente son (1) una composición polimérica que ayuda al crecimiento de axones, (2) el uso de una biblioteca de polímeros para que la tasa de degradación y biorreabsorción de los NAD se pueda ajustar al tiempo requerido por los axones en crecimiento para atravesar la longitud del espacio entre nervios, (3) una estructura entrelazada, (4) un recubrimiento que controla la porosidad para el transporte óptimo de nutrientes sin permitir la infiltración de tejido fibroso. Ahora se ha descubierto que esta combinación de estrategias de diseño imparte una significativa ventaja de funcionamiento que puede conducir a mejores resultados clínicos para el paciente que necesita regeneración de nervios periféricos.

En algunas modalidades, el material de fibra polimérica está compuesto de desaminotirosil-tirosina alquil éster (DTE), ácido carboxílico libre de colgante de desaminotirosil-tirosina (DT) y poli(etilenglicol) (PEG). La fracción molar de unidades de ácido carboxílico libre y unidades de PEG en el polímero descrito en la presente descripción puede ajustarse para modificar las propiedades mecánicas y las tasas de degradación de los NAD preparados a partir de tales polímeros. Por

ejemplo, los polímeros con cantidades más bajas de ácido carboxílico libre tenderán a tener vidas más largas en el cuerpo. Además, ajustando de otro modo la cantidad de ácido carboxílico libre en los polímeros en el intervalo de la fracción molar preferida, los polímeros resultantes pueden adaptarse para su uso en diversas aplicaciones que requieren diferentes tiempos de vida del dispositivo. En general, cuanto mayor es la fracción molar de las unidades de ácido carboxílico libre, menor es la vida útil del dispositivo en el cuerpo y más adecuados son tales dispositivos para aplicaciones en las que se requieren o convienen tiempos de vida más cortos.

El material de fibra está compuesto de un polímero biocompatible que tiene unidades repetidas de la estructura (Fórmula I):



Fórmula I

en donde a y b son independientemente 0 o un número entero entre 1 y 6, incluso; en donde c y d son independientemente 0 o un número entero entre 1 y 6, incluso; en la que cada R<sub>1</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste de grupos alquilo lineal y ramificado que contienen hasta 18 átomos de carbono; en donde cada R<sub>2</sub> es independientemente un grupo alqueno que contiene hasta 6 átomos de carbono; en donde k es entre 20 y 200; y en donde x oscila entre 0,02 y 0,20; z oscila entre 0,005 y 0,10; y x + y + z = 1,00

En algunas modalidades, a y b son dos y uno, respectivamente.

En algunas modalidades, c y d son dos y uno, respectivamente, y R<sub>1</sub> es etilo.

En algunas modalidades, R<sub>2</sub> para dicho polímero es etileno y k está entre aproximadamente 25 y aproximadamente 50.

La síntesis de diversos polímeros de policarbonato se conoce generalmente en la técnica, incluidos, por ejemplo, los métodos descritos en las patentes de Estados Unidos Núm. 6,120,491 y 6,475,477. Los polímeros que tienen grupos de ácido carboxílico libres sobresalientes se preparan preferiblemente a partir de los polímeros de éster de bencilo y terc-butilo correspondientes para evitar la reacción de entrecruzamiento del grupo de ácido carboxílico libre con comonomeros. Los polímeros de éster bencilico pueden convertirse en los correspondientes polímeros de ácido carboxílico libres mediante el método de hidrogenólisis catalizada por paladio descrito en la patente de Estados Unidos Núm. 6,120,491. Los polímeros de terc-butil éster pueden convertirse en los correspondientes polímeros de ácido carboxílico libres a través de la eliminación selectiva de los grupos terc-butilo mediante el método de acidólisis descrito en la publicación de patente de Estados Unidos Núm. 20060034769.

En algunas modalidades, se seleccionan polímeros que se degradan o reabsorben dentro de un tiempo predeterminado. Por esta razón, las modalidades de acuerdo con la presente invención incluyen polímeros con fracciones molares de unidades monoméricas repetitivas con grupos de ácido carboxílico sobresalientes, tales como DT, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 20 % en moles, y preferiblemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 % en moles.

Los segmentos de poli(alquilenglicol), como el PEG, disminuyen la adhesión superficial de los polímeros. Al variar la fracción molar de los segmentos de poli(alquilenglicol) en los copolímeros de bloque proporcionados por la presente invención, las relaciones hidrófilas/hidrófobas de los polímeros se pueden cambiar para ajustar la capacidad de los recubrimientos de polímeros de modificar el comportamiento celular. Los niveles crecientes de poli(alquilenglicol) inhiben la unión celular, la migración y la proliferación. En segundo lugar, el PEG aumenta la absorción de agua y, por lo tanto, aumenta la velocidad de degradación del polímero. Por consiguiente, en una modalidad, se seleccionan polímeros en los que la cantidad de poli(alquilenglicol) se limita a entre 0,5 y aproximadamente 10 % en moles, y preferentemente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 5 % en moles, y con mayor preferencia entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1 % moles. El poli(alquilenglicol) puede tener un peso molecular de 1k a 2k.

En algunas modalidades, los polímeros se seleccionan por poseer propiedades físicas intrínsecas apropiadas para su uso en conductos nerviosos y con propiedades mecánicas adecuadas que incluyen elasticidad, rigidez, resistencia y comportamiento de degradación. Dichos polímeros incluyen, si el polímero es amorfo, polímeros con una temperatura de transición vítrea mayor de 37 °C cuando está completamente hidratado bajo condiciones fisiológicas y, si el polímero es cristalino, una temperatura de fusión cristalina mayor de 37 °C cuando está completamente hidratado bajo condiciones fisiológicas.

Debe entenderse que otros polímeros degradables biocompatibles pueden usarse para formar fibras (que no forman parte de la invención) que proporcionan o refuerzan ciertas propiedades convenientes de los conductos nerviosos resultantes. Los ejemplos de otros polímeros que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico coglicólico), policaprolactona, varios poli(aminoácidos) y polianhídridos. Otros materiales de fibras

naturales o no naturales, por ejemplo, colágeno, celulosa, quitosano, y sus derivados, pueden utilizarse de manera alternativa o adicional para proporcionar o reforzar ciertas propiedades convenientes de los conductos nerviosos resultantes (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Núm. 8,216,602).

5 En algunas modalidades, la composición de polímero biocompatible es biodegradable y biorreabsorbible. Los NAD de la presente invención son preferentemente biodegradables y biorreabsorbibles, y tienen un perfil de degradación específico que puede ajustarse dependiendo de la longitud de la brecha nerviosa que necesita ser restaurada. Las fibras nerviosas crecen aproximadamente 1 mm por día, o aproximadamente 1 pulgada por mes. Por lo tanto, para la regeneración exitosa de una brecha nerviosa de 2 pulgadas, el proceso de curación requerirá al menos 2 meses y los NAD debería retener gran parte de su resistencia mecánica durante al menos 2 meses. Para la regeneración de una brecha nerviosa de 4 pulgadas, los NAD debe retener gran parte de su resistencia mecánica durante al menos 4 meses para garantizar una recuperación completa antes de que los NAD se vuelva demasiado débiles mecánicamente para soportar el crecimiento de las fibras nerviosas lesionadas. En algunas modalidades, el perfil de degradación puede controlarse formando los NAD a partir de múltiples fibras poliméricas, cada una con un perfil de degradación diferente.

15 En algunas modalidades, la composición polimérica es radiopaca, mientras que en otras modalidades no es radiopaca. En algunas modalidades, los polímeros contienen yodo en uno o más anillos aromáticos de las unidades poliméricas (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 6,475,77). Dicha modificación permite detectar y rastrear los NAD con técnicas de imágenes médicas.

20 En algunas modalidades, los NAD puede tener una memoria de la forma.

La Figura 1 ilustra un material de fibra polimérica compuesto por 89,5 % en moles de desaminotirosil tirosina etil éster (DTE), 10 % en moles de desaminotirosil tirosina (DT) y 0,5 % en moles de poli(etilenglicol) (PEG, peso molecular [Mw] = 1 kDa)[designado como E10-0,5 (1K)]. Se observaron axones más largos en este polímero en comparación con PE (Figura 2), como lo indica el desplazamiento máximo a la derecha del PE y los picos de sustrato del control. Una evaluación de la unión de células de Schwann y la extensión de procesos en los diferentes sustratos reveló que este polímero promovió de manera similar estos aspectos en comparación con PE (Figura 2B, C). La adsorción de proteínas esenciales para la regeneración nerviosa a los diferentes materiales también fue significativamente diferente (Figura 3). Las cantidades de tres proteínas ECM que se adsorben a este polímero fueron significativamente mayores en comparación con las películas de PE como se muestra en la Figura 4.

En el estudio de recuperación de la función motora, los animales que recibieron conductos de polímero que consiste en 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de PEG1K, mostraron una mejora notable en el ángulo de la base del pie (FBA) en comparación con los ratones que recibieron conductos NP-PE. Un número significativamente mayor de axones estaba presente dentro de los cables nerviosos en regeneración formados dentro de los conductos de este polímero con un área más pequeña de tejido fibroso bruto, independientemente de la presencia de poros en las paredes externas (Figura 5). El área de la sección transversal de las fibras nerviosas mielinizadas fue significativamente mayor en todos los conductos en comparación con el conducto NP-PE, y un mayor porcentaje de esta área estaba ocupado por fibras nerviosas mielinizadas. Los conductos de la presente invención generaron cables nerviosos con una gran cantidad de axones, estructuras fasciculares, una amplia gama de diámetros de fibra nerviosa y poco tejido fibroso, mientras que los conductos NP-PE contenían pocos axones evidentes, si es que los había (Figura 7). El lumen interno estaba completamente lleno de lo que parecía ser tejido denso y fibroso. Las secciones longitudinales demuestran que la matriz de fibrina se desarrolla dentro de los conductos de la presente invención antes que dentro del NP-PE (Figura 8).

Los NAD porosos de la presente invención se fabrican usando un proceso de entrelazado. Los expertos en la materia conocen numerosas variaciones del proceso de entrelazado. Al realizar cambios en el patrón de entrelazado, las propiedades mecánicas generales de los NAD resultantes se pueden ajustar para abordar diferentes necesidades médicas. Un patrón de entrelazado común que se encontró útil para crear conductos nerviosos resistentes a las torceduras se conoce como trenza biaxial enrollada helicoidalmente. Además, se pueden usar múltiples tipos de fibras diferentes en combinación para crear un dispositivo entrelazado compuesto de diferentes polímeros. Usando solo aquellos polímeros que tienen unidades repetidas de Fórmula I, se puede construir un dispositivo multifilamento en el que las fibras individuales difieren en su velocidad de degradación. Este enfoque puede utilizarse para ajustar el perfil de degradación y reabsorción del dispositivo. En otra modalidad, se pueden incorporar fármacos adecuados en fibras poliméricas individuales. Mediante el uso de combinaciones de fibras, cada una cargada con un medicamento diferente, una amplia gama de NAD mejorados farmacéuticamente puede imaginarse, cada uno liberando una mezcla personalizada de diferentes medicamentos para ayudar en la regeneración nerviosa en un enfoque de "medicina personalizada". El concepto de usar diferentes fibras para entrelazar un NAD es un medio poderoso para optimizar las características de funcionamiento general del dispositivo y proporciona un grado de flexibilidad hasta ahora no reconocido en el diseño del dispositivo. Una aplicación potencial adicional para el uso de múltiples fibras diferentes para crear un NAD entrelazado es combinar fibras derivadas de biopolímeros (colágeno, gelatina, alginato entrecruzado y otros) con fibras de los policarbonatos derivados de tirosina descritos anteriormente. En el proceso de entrelazado, las fibras individuales se colocan unas sobre otras creando así una estructura híbrida única cuyas propiedades pueden ajustarse mediante la elección de fibras individuales, su proporción relativa dentro de la construcción entrelazada y el patrón de entrelazado utilizado. Procedimientos para construir tubos usando entrelazado bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 8,106,014).

Los NAD porosos se construyen por entrelazado. Como se ilustra en las Figuras y ejemplos de este documento de patente, los conductos entrelazados ofrecen ventajas en términos de propiedades físicas y mecánicas, pero solo se obtiene una mejora significativa del funcionamiento general cuando el entrelazado se combina con las otras estrategias de diseño críticas descritas anteriormente (composiciones de polímeros que mejoran el crecimiento de neuritas, uso de bibliotecas de polímeros para ajustar el perfil de degradación y un recubrimiento de control de porosidad). Estas estrategias de diseño tienen efectos sinérgicos que no se habían reconocido previamente y que conducen a la regeneración nerviosa mejorada observada.

Los conductos entrelazados pueden proporcionar propiedades mecánicas deseables que incluyen flexibilidad y resistencia a la torcedura y resistencia a la tracción, que son criterios importantes en el diseño de conductos, especialmente para brechas nerviosas grandes en áreas de alta movilidad. Para evitar perforar o volver a cortar el frágil nervio en regeneración, los conductos deben poder doblarse sin experimentar oclusión luminal. Los conductos entrelazados de la presente invención demuestran tal capacidad en una prueba de torcedura, donde los conductos se doblan sobre un alambre hasta que se produce una torcedura (reducción del diámetro interno del lumen). Los estudios sobre conductos entrelazados (fabricados a partir de poli(carbonato DTE), abreviado E0000) muestran que, en comparación con los conductos NeuraGen® utilizados clínicamente (fabricados a partir de colágeno I, Li y otros, Clin Mater 1992; 9(3-4): 195-200.) y el conducto no poroso recubierto por inmersión (fabricado con poli(carbonato DTE)), los conductos entrelazados (fabricados con poli(carbonato DTE)) resistieron la torcedura y mantuvieron un diámetro luminal constante cuando se doblaron en ángulos superiores a 125°. Los conductos entrelazados también volvieron a su forma original después de liberar la carga, mientras que los conductos recubiertos por inmersión y NeuraGen® ocluyeron parcial o completamente el lumen cuando se doblaron y no volvieron a su forma original. Además, los conductos entrelazados de poli(carbonato DTE) pueden resistir las fuerzas de tracción, compresión y corte creadas por el movimiento de las extremidades y la contracción muscular.

Los estudios también muestran que los NAD de la presente invención son bien tolerados y no provocan una fuerte respuesta inflamatoria del hospedero. La formación de cápsulas fibrosas alrededor de los NAD implantados de la presente invención está dentro de límites aceptables que indican una respuesta inflamatoria mínima en el hospedero.

Los NAD de la presente invención tienen un nivel de porosidad estrictamente controlado. El tamaño de los poros dentro del material entrelazado debe estar en un rango adecuado para promover el intercambio efectivo de nutrientes y oxígeno a lo largo de toda la longitud del dispositivo, al mismo tiempo que actúa como una barrera contra la infiltración de tejido cicatricial. El tamaño de poro de los NAD puede manipularse utilizando diferentes procesos de entrelazado y/o controlando el diámetro de la fibra. Luego, la porosidad general se manipula aún más mediante el proceso de recubrimiento de hidrogel. En modalidades ilustrativas, los conductos entrelazados se fabrican generando primero fibras de diámetro pequeño que se usan individualmente o se retuercen para formar hilos, y se cargan en un aparato de entrelazado. El aparato envuelve las fibras o hilos alrededor de un mandril para generar el conducto. Las fibras o hilos se pueden entrelazar alrededor del mandril en una variedad de patrones de entrelazado. El diámetro del mandril determina el diámetro del lumen y el diámetro de la fibra o el hilo determina el grosor de las paredes del conducto. Una vez que las fibras adecuadas están disponibles, los conductos entrelazados pueden fabricarse de forma rápida y reproducible sin limitaciones dimensionales.

Los recubrimientos de hidrogel se utilizan para ajustar aún más la porosidad general de los NAD. Ejemplos no limitativos de tamaños de poro resultantes del proceso de recubrimiento son aproximadamente 3-40  $\mu\text{m}$ . Sin recubrimiento de hidrogel, estos poros formados por el entrelazado son demasiado grandes y permitirían la infiltración indeseable de tejido fibroso en el lumen de los NAD. La falta de control sobre el tamaño de poro en los conductos nerviosos entrelazados que se conocían previamente es una de las razones por las que no logran una regeneración nerviosa clínicamente útil. El proceso de recubrimiento de hidrogel de la presente invención abordó esta desventaja inherente del proceso de entrelazado. Diversas técnicas conocidas pueden aplicarse, incluyendo el recubrimiento por inmersión, en el recubrimiento de los NAD de la presente invención.

Varios hidrogeles de origen natural o de origen sintético, incluyendo, por ejemplo, hidrogeles basados en polipéptidos, hidrogeles basados en polisacáridos e hidrogeles basados en petroquímicos, pueden usarse individualmente o en combinación entre sí para recubrir los NAD entrelazados. Ejemplos no limitantes de material de recubrimiento incluyen ácido alginico, ácido hialurónico e hidrogel de poli(ácido acrílico).

En algunas modalidades, el hidrogel para recubrir el tubo fibroso se funcionaliza adicionalmente mediante un agente de entrecruzamiento. Esto es importante siempre que el hidrogel no entrecruzado sea soluble en agua o sea demasiado débil para proporcionar un recubrimiento mecánicamente estable. Ejemplos no limitativos de agentes de entrecruzamiento incluyen poli(diacrilato de etilenglicol (PEGDA)), poli(etilenglicol diglicidil éter), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida y divinilsulfona. La cantidad de hidrogel y el grado de entrecruzamiento requerido para crear un recubrimiento efectivo dependen de varios factores, incluyendo el tamaño de poro inicial del NAD entrelazado, el diámetro y la longitud del tubo, el tamaño y el nivel de porosidad, y posiblemente también del nervio específico a ser regenerado. Los métodos de entrecruzamiento de hidrogeles están fácilmente disponibles en la literatura y se pueden practicar sin experimentación excesiva (véase, por ejemplo, Nilimanka, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2013,5 (4), 55-58; Hennink y otros, Adv. Drug Deliv. Rev. 2002 17 de enero; 54 (1): 13-36). En algunas modalidades, el hidrogel

biorreabsorbible para recubrir los NAD es ácido hialurónico entrecruzado (HA). En algunas modalidades, el agente de entrecruzamiento es PEGDA.

El recubrimiento de hidrogel de tubos porosos puede conducir a una regeneración nerviosa significativamente mejorada en comparación con los tubos porosos no recubiertos. Los estudios sobre conductos fabricados con E1001 (1k), un copolímero que consiste en 89 % en moles de desaminotirosil-tirosina etil éster (DTE), 10 % en moles de desaminotirosil-tirosina (DT) y 1 % en moles de poli(etilenglicol) demuestra el efecto del recubrimiento de hidrogel en la regeneración nerviosa. De los cuatro tipos de conductos (recubrimiento de ácido hialurónico (HA) entrecruzado no recubierto, recubrimiento de fibra de polímero electrohilado que consiste en 89 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-1 % en moles de PEG 1K, y una combinación de recubrimiento de polímero electrohilado que consiste en 89 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-1 % en moles de PEG 1K posteriormente recubierto con HA), los conductos recubiertos con HA mostraron resultados significativamente mejores en la regeneración nerviosa. Los conductos entrelazados sin recubrimiento mostraron muchos axones regenerados dentro de los fascículos que estaban organizados libremente y una cantidad considerable de tejido no nervioso. Los conductos entrelazados recubiertos con electrohilado también mostraron un crecimiento inconsistente del axón con tejido no nervioso, lo que sugiere que la estera de electrohilado que rodea el conducto entrelazado puede haber facilitado la infiltración de tejido fibroso.

Por el contrario, todos los conductos recubiertos con HA mostraban cables nerviosos redondeados y densamente empacados con fascículos y axones apretados. Estas características no se replicaron en los nervios regenerados dentro de los conductos entrelazados recubiertos con fibras de electrohilado y HA, donde se observó tejido fibroso extenso que se había intercalado dentro de los axones y fascículos nerviosos en regeneración. Además, la recuperación del peso muscular tibial anterior (TA) para los conductos entrelazados recubiertos con HA fue significativamente mayor que para los conductos no recubiertos. Además, las mediciones electrofisiológicas de la conducción nerviosa a través del defecto y los grupos musculares reinervados se utilizaron para evaluar el potencial de acción muscular compuesto (CMAP). Entre los grupos de conductos, los conductos entrelazados recubiertos con HA tenían las mayores amplitudes de CMAP con aproximadamente el 14 % de la señal de CMAP recuperada en el punto final de 16 semanas.

En algunas modalidades, el conducto nervioso se llena con un hidrogel biorreabsorbible en su lumen interno. El hidrogel biorreabsorbible facilita la formación de una matriz de fibrina que sirve como un puente físico a través de la brecha nerviosa y proporciona una estructura para que las células migren. Los ejemplos no limitantes de hidrogeles como relleno incluyen hidrogeles derivados de laminina, alginato, colágeno, ácido hialurónico y su combinación (ver, por ejemplo, Verdú, y otros, *Restorative Neurology & Neuroscience* 2002, 20: 169; Ceballos y otros, *Experimental Neurology* 1999, 158: 290-300). En el caso de brechas nerviosas largas, a menudo se requieren tubos porosos porque permiten el intercambio de nutrientes, oxígeno y desechos a lo largo del conducto e incluso permiten la infiltración de los vasos sanguíneos. Sin embargo, la porosidad del conducto también permite la infiltración de tejido fibroso no neuronal. Por lo tanto, es conveniente que un relleno de hidrogel pueda distinguir entre tejido neuronal y tejido fibroso no neuronal, facilitando una regeneración axonal más rápida en comparación con la infiltración de tejido fibrótico.

De acuerdo con esto, en algunas modalidades, el hidrogel para llenar el lumen interno del tubo se potencia mediante una porción de señalización celular o promotora de neuritas, que favorece el crecimiento del axón y la orientación apropiada de la neurona motora. Los ejemplos no limitativos para tal porción promotora de neuritas incluyen un péptido mimético del glicano *Human Natural Killer 1* (m-HNK), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento glial (GGF). En algunas modalidades, la porción promotora de neuritas es un péptido mimético del glicano *Human Natural Killer 1* (m-HNK). Los procedimientos para unir una porción promotora de neuritas a un hidrogel se conocen bien en la técnica y se pueden practicar sin experimentos indebidos. Por ejemplo, se puede preparar un colágeno mejorado con m-HNK injertando el péptido mimético del glicano *Human Natural Killer 1* (m-HNK) sobre el colágeno usando la química EDC como se describió anteriormente (ver, por ejemplo, Masand, y otros, *Biomateriales*, 2012, 33:8353-62).

En otro aspecto, se proporciona un método para el tratamiento o reparación de una lesión de nervio periférico que comprende la implantación del conducto nervioso de la presente invención. Los protocolos para implantar conductos nerviosos están fácilmente disponibles y se pueden practicar sin experimentos indebidos (ver, por ejemplo, Rui y otros, *Acta Biomaterialia* 2012; 8 (2): 511-518; de Ruitter y otros, *Exp Neurol* 2008; 211 (2): 339-50). En modalidades ilustrativas, los dos extremos del conducto nervioso están conectados con los dos muñones nerviosos formados en la lesión para cerrar la brecha existente entre ellos. El lumen de la guía nerviosa que queda entre los muñones nerviosos especifica la dirección de los axones en regeneración y evita cualquier crecimiento guiado incorrectamente, promoviendo así una regeneración dirigida (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 8,216,602).

En otro aspecto, se proporciona un conducto nervioso que se llena previamente con axones de tejidos diseñados (por ejemplo, cultivados en laboratorio). Los axones precargados facilitan la regeneración del nervio al servir como una semilla que proporciona un soporte bioactivo para el crecimiento del tejido. El concepto de usar componentes biológicos y/o tejido nervioso vivo diseñado, para rellenar el conducto antes de la implantación en el cuerpo de un paciente, tiene un gran potencial y puede facilitar la curación de brechas nerviosas de una longitud sin precedentes. El uso de injertos nerviosos diseñados por ingeniería (TENG) ha sido pionero en la Universidad de Pennsylvania y Axonia Medical (Kalamazoo, MI). Para que este enfoque revolucionario alcance su máximo potencial clínico, los TENG deben encerrarse dentro de un NAD cuidadosamente optimizado. Mantener el intercambio de nutrientes, las propiedades mecánicas y la resistencia a las

torceduras en brechas grandes mientras se optimiza el período prolongado de biorreabsorción es un desafío difícil que hasta ahora no se ha abordado satisfactoriamente por ninguno de los conductos nerviosos sintéticos disponibles actualmente. Investigadores de la Universidad de Pensilvania y Axonia ahora demostraron que los NAD de la presente invención ayudan al ingreso de células de Schwann y la extensión de los axones del hospedero a lo largo de los TENG, y dan como resultado tasas mejoradas de regeneración nerviosa en comparación con los autoinjertos. El uso de los NAD de la presente invención relleno con tejido nervioso vivo (diseñado) representa una modalidad adicional de la presente invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Fabricación de conductos

E10-0,5 (1K) (Figura 1), compuesto de 89,5 % en moles de desaminotirosil tirosina etil éster [DTE], 10 % en moles de desaminotirosil tirosina [DT] y 0,5 % en moles de poli(etilenglicol) [PEG] con Mw de 1 kDa, se sintetizó utilizando procedimientos publicados previamente (Magno, y otros, J Mater Chem 20, 8885, 2010). Los conductos huecos (que no forman parte de la invención) con un diámetro interno de 580  $\mu$ m se fabricaron utilizando una técnica de recubrimiento por inmersión (recubrimiento por inmersión KSV; KSV Instruments, Inc.) en la que se sumergió un mandril recubierto de teflón a una velocidad constante (40 mm/min) en una solución de polímero. Para conductos no porosos, se usó una solución que contenía 900 mg de polímero en 3 ml de cloruro de metileno. Para los conductos porosos, se usó una solución de 450 mg de cristales de sacarosa, tamizada a 25-45  $\mu$ m, y 450 mg de polímero disuelto en 3 ml de cloruro de metileno. Después del recubrimiento por inmersión, los mandriles se secaron al vacío durante la noche, y los conductos se retiraron y se cortaron a 5 mm de longitud para evaluación *in vivo*. Para los conductos porosos, la sacarosa se lixivió en agua para crear una estructura porosa. Los tubos de PE disponibles comercialmente también se utilizaron como conductos nerviosos (5 mm de longitud, 0,58 mm de diámetro interno; Becton Dickinson).

#### Evaluaciones *in vitro*

Se realizó una evaluación *in vitro* del material del conducto con neuronas de la médula espinal y células de Schwann. El efecto del 89,5% en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de polímero PEG 1K y polietileno (PE) sobre el crecimiento de neuritas y la unión y extensión de células de Schwann se determinó usando cubreobjetos de vidrio recubiertos por rotación con 89,5% en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de polímero PEG 1K (solución al 2,5 % p/v en tetrahidrofurano) o recubierto con una fina película autoadhesiva de PE (VWR). Para facilitar la supervivencia y el crecimiento celular, los cubreobjetos se revistieron con 200  $\mu$ g/ml de poli-L-lisina (PLL; Sigma) seguido de 20  $\mu$ g/ml de laminina (Invitrogen). Las neuronas embrionarias de la médula espinal fueron aisladas y purificadas para una población rica en motores. Las células de Schwann se aislaron y purificaron de los nervios ciáticos de los recién nacidos P2 de acuerdo con los protocolos publicados (Honkanen, y otros, Eur J Neurosci 26, 953, 2007), produciendo cultivos con > 95 % de células que se tiñeron positivamente para S100 $\beta$ . Las células se sembraron en cubreobjetos (1,5 x 10<sup>4</sup> células/cubreobjetos) y se mantuvieron durante 48 h a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Las neuritas y el crecimiento del proceso de neuronas y células de Schwann se evaluaron usando el anticuerpo  $\beta$ -tubulina (Covance; 1:500) y S100 $\beta$  (Abcam; 1:500), respectivamente, con ambos tipos de células visualizados usando el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (Invitrogen). La tinción nuclear se realizó con tinción Hoechst 33258 (AnaSpec, Inc.). La longitud de neuritas/procesos totales por célula se midió usando ImageJ (NIH). Para cada cubreobjetos, se analizaron 10 imágenes representativas elegidas al azar en forma doble ciego y las neuritas se agruparon según su longitud.

#### Ensayo de adsorción de proteínas.

Las cantidades relativas de adsorción de proteínas para tres moléculas de matriz extracelular (ECM) (laminina[Invitrogen], fibronectina[Invitrogen] y colágeno tipo I[Biomatrix avanzada]) se evaluaron en 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de PEG 1K polímero y películas PE. Películas de polímero 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de PEG 1K (que no forman parte de la invención) preparadas por moldeo por compresión y las películas de PE (VWR) se colocaron en una placa de 96 pocillos. Se añadió una solución de 70  $\mu$ l de cada proteína (20 mg/ml en ddH<sub>2</sub>O) a cada pocillo y se permitió que se adhiriera a las películas a 37 °C durante 48 h. Después de retirar el sobrenadante, cada pocillo se enjuagó a fondo y se bloqueó con medios que contenían suero de ternera fetal. Después del enjuague, los anticuerpos primarios contra cada proteína se agregaron durante 1 hora a temperatura ambiente (Millipore; 1:100). Se repitió todo el proceso de enjuague y se añadió un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Millipore; dilución 1:200) durante 1 hora a temperatura ambiente. El proceso de enjuague se repitió una vez más y se agregó Luminol (Invitrogen) a cada pocillo. Después de 5 min, se leyó la luminiscencia de cada pocillo utilizando un lector de placas Tecan con un tiempo de integración de 1000 ms y un tiempo de sedimentación de 500 ms. Las cantidades de proteínas se normalizaron a la superficie de control, cultivo de tejidos de poliestireno.

#### Evaluación *in vivo*.

Métodos quirúrgicos y grupos de animales. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC). Se anestesiaron ratones hembra C57BL/6J (edad 3 meses) mediante inyección

intraperitoneal de una mezcla de ketamina (80 mg/kg) y xilazina (12 mg/mg). El nervio femoral izquierdo se expuso quirúrgicamente y se realizó una transección nerviosa a una distancia de ~3 mm proximal a la bifurcación del nervio. Los extremos cortados del nervio se insertaron en el conducto nervioso lleno de solución salina y se fijaron en cada extremo con una sutura de nylon 10-0 (Ethicon), de modo que había un espacio de 5 mm entre el muñón proximal y distal. La piel incisa se cerró con clips para heridas, que se retiraron 2 semanas después de la cirugía. Se compararon tres grupos de animales (ocho animales cada uno) que recibieron los tres tipos de conducto durante un período de 15 semanas, incluidos P-E10-0,5 (1K), NP-E10-0,5(1K) y NP-PE.

Recuperación de la función motora.

La recuperación funcional se evaluó utilizando un enfoque de análisis de movimiento de un solo cuadro (SFMA). 40 animales fueron entrenados para realizar una prueba de caminar con haz antes de la implantación del conducto. Después de la cirugía, esta prueba se realizó semanalmente hasta el punto final del experimento. Los videos de visión trasera de los ratones caminando se obtuvieron usando una cámara de alta velocidad (A602fc; Basler). Los movimientos de las patas traseras durante el ciclo de marcha normal se analizaron a partir de cuadros de video individuales utilizando Simi-Motion (SIMI Reality Motion Systems). El ángulo de la base del pie (FBA) 40 se midió para evaluar la función del músculo cuádriceps. Además, se midió la relación de la extremidad de protracción (PLR) 40, mientras que el ratón realizó un movimiento voluntario durante una prueba de agarre con lápiz.

Se calculó un índice de recuperación (RI) para cada animal tanto para el FBA como para el PLR para proporcionar una medida relativa de recuperación funcional. El IR se calculó como un porcentaje utilizando la siguiente fórmula:

$$RI = \left[ \frac{(X_{semana\ y} - X_{semana\ 1})}{X_{semana\ 0} - X_{semana\ 1}} \right] \times 100$$

donde  $X_{semana\ 0}$ ,  $X_{semana\ 1}$  y  $X_{semana\ y}$  son valores intactos en la semana 0 (FBA o PLR), valores medidos en la semana 1 después de la lesión y en la semana  $y$  (donde  $y$  es el punto final del estudio, semana 15), respectivamente (Irintchev, y otros, Eur J Neurosci 22, 802, 2005). Un valor RI de 100 indica la recuperación completa del nervio femoral.

Análisis histomorfométrico del nervio explantado.

Después de la perfusión con paraformaldehído al 4 % a las 16 semanas, se diseccionaron los nervios femorales de los animales y se realizó un análisis morfométrico de acuerdo con el protocolo estándar.

El número total de axones mielinizados por sección transversal del nervio, área de tejido sin procesar, área de sección transversal del cable de regeneración y el % de regeneración nerviosa se midieron con ImageJ. Los diámetros axonales (dentro de la vaina de mielina) y de la fibra nerviosa (incluida la vaina de mielina) se midieron en una muestra aleatoria de cada sección.

Análisis de *Western blot* de exudados nerviosos a 1 semana *in vivo*.

Para evaluar la presencia de células de Schwann dentro de los conductos nerviosos, se realizó un análisis de *Western blot* de marcadores de células de Schwann en exudados nerviosos (Kaewkhaw, y otros, Glia 59, 734, 2011). Se implantaron conductos ( $n = 3$ ) en el nervio femoral del ratón durante 1 semana, después de lo cual se sacrificaron los animales y se extrajeron los exudados nerviosos dentro de los conductos y se colocaron en un gel SDS-PAGE (Invitrogen) y se transfirieron a membranas PVDF (Biorad). Las membranas se bloquearon y sondearon con anticuerpos contra S100 $\beta$  (1:1000), proteína ácida fibrilar glial (GFAP, 1:50 000), GAPDH (1:1000) y  $\beta$ -actina (1:5000) (Abcam) y se detectaron a través de HPR luminiscencia de anticuerpos secundarios. El análisis densitométrico se realizó para cuantificar la densidad de banda de GFAP, S100 $\beta$  y actina del *Western blot* usando ImageJ (NIH). Las cantidades se normalizaron en base al control de carga de actina.

Análisis morfológico de la formación de matriz de fibrina.

Los animales ( $n = 3$  por condición) se sacrificaron a las 2 semanas después de la implantación para visualizar la presencia de cadenas de fibrina. Los explantes nerviosos se colocaron en tetróxido de osmio y se embebieron en resina de acuerdo con el protocolo estándar. Se cortaron secciones longitudinales del nervio de 1 mm de grosor y se tiñeron con azul de toluidina al 1 %/bórax al 1 % en agua destilada. Se usó microscopía óptica convencional para visualizar la presencia y orientación de la matriz de fibrina.

Análisis estadístico.

El estudio fue diseñado para permitir la comparación de los efectos de los polímeros de 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de polímero PEG 1K y PE, tanto en 2D como en forma de conducto en la regeneración

nerviosa. Se utilizó el análisis de varianza utilizando un análisis de varianza de una vía seguido de comparaciones planificadas *post hoc* con la prueba de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas a  $p < 0,05$ .

## Resultados

### Caracterización *in vitro*

Los conductos no porosos de polímero de PE y 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de PEG 1K tenían un aspecto similar basado en las micrografías SEM (Figura 2A, D, C, F). Los conductos de polímero poroso 89,5 % en moles DTE-10 % en moles DT-0,5 % en moles de PEG 1K tenían una estructura de poro interconectada, y el grado de porosidad y el tamaño medio de poro de los conductos fueron 55,2 % - 1,2 % y 35,7 - 9,0  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Figura 2B, E). Los conductos fabricados con E10-0,5 (1K) son opacos, no flexibles (con longitudes de 5 mm), tienen un diámetro interno de 580  $\mu\text{m}$  y un diámetro externo de 680  $\mu\text{m}$ . Todos los conductos permanecieron intactos durante todo el estudio. Los estudios de material y células revelaron propiedades dispares entre los tipos de conducto. La respuesta de las neuronas motoras a los diferentes materiales se evaluó en 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de polímero PEG 1K y películas de PE 2D recubiertas con PLL y laminina. Se observaron axones más largos en 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de polímero PEG 1K en comparación con PE (Figura 3), como lo indica el cambio máximo de 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 mol % de polímero PEG 1K a la derecha de los picos saturados de PE y el control. Una evaluación de la unión de células de Schwann y la extensión de los procesos en los diferentes sustratos reveló que el 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de polímero PEG 1K promovió de manera similar estos aspectos en comparación con PE (Figura 3B, C). La adsorción de proteínas esenciales para la regeneración nerviosa a los diferentes materiales también fue significativamente diferente (Figura 4). Las cantidades de tres proteínas ECM que se adsorben al 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de polímero PEG 1K fueron significativamente mayores en comparación con las películas de PE.

### Evaluación *in vivo*

Recuperación de la función motora. La recuperación funcional se cuantificó por SFMA del FBA y PLR (Figura 5A-D), utilizando métodos bien establecidos (Irintchev, y otros, Eur J Neurosci 22, 802, 2005. En la semana 8, los animales que recibieron 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de conductos de polímero PEG 1K mostraron una mejora notable en la FBA en comparación con los ratones que recibieron conductos NP-PE (Figura 5E). El PLR también demostró una mejora de la función motora en animales tratados con polímero de 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de PEG 1K, independientemente de si se utilizaron conductos porosos o no porosos, tan pronto como desde las 2 semanas (Figura 5G). Los resultados recopilados hasta 15 semanas demuestran que el valor de PLR para animales con los conductos de polímero 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de PEG 1K, alcanzaron valores prequirúrgicos a una tasa más rápida que los animales tratados con NP-PE.

El cálculo de la RI apoyó además que la recuperación promovida por el polímero 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de PEG 1K, se mejoró sobre la promovida con conductos de PE. Los animales que recibieron conductos de polímero 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de PEG 1K alcanzaron valores de RI cercanos al 50 % para el FBA (Figura 5F) y al 100 % para el PLR (Figura 5H). Los animales que recibieron conductos de NP-PE demostraron un valor RI promedio para el FBA de - 26 % y un valor RI promedio de 23 % para el PLR. La estrecha agrupación de los animales dentro de cada grupo de polímero 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de PEG 1K indica un funcionamiento consistente en contraste con la variación en los valores de IR calculados a partir de animales que reciben conductos de NP-PE. En general, los resultados funcionales indican que el uso de un conducto de polímero 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de PEG 1K resulta en una recuperación significativa del movimiento funcional, independientemente de la porosidad del polímero 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de PEG 1K.

### Análisis histomorfométrico.

Al final del estudio, se analizaron los nervios para detectar características histomorfométricas (Figura 6). Un número significativamente mayor de axones estaba presente dentro de los cables nerviosos en regeneración formados dentro de los conductos de polímero 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de PEG 1K con un área más pequeña de tejido fibroso bruto, independientemente de la presencia de poros en las paredes externas. El área de la sección transversal de las fibras nerviosas mielinizadas fue significativamente mayor en todos los conductos de polímero 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de PEG 1K en comparación con el conducto NP-PE, y un mayor porcentaje de esta área estaba ocupada por fibras nerviosas mielinizadas. En la Figura 7 se muestran imágenes representativas 100 x de secciones transversales de 1 mm de grosor fijadas en tetróxido de osmio, así como la distribución del diámetro de la fibra de cada condición. Los conductos de polímero 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de PEG 1K generaron cables nerviosos con una gran cantidad de axones, estructuras fasciculares, una gran variedad de diámetros de fibra nerviosa y poco tejido fibroso, mientras que los conductos NP-PE contenían pocos, si alguno, axones evidentes. El lumen interno estaba completamente lleno de lo que parecía ser tejido denso y fibroso.

Primeras diferencias en la reparación nerviosa entre los materiales del conducto.

La formación inicial de un cable de fibrina ayuda a soportar el crecimiento axonal y la infiltración de células de Schwann y es crucial para determinar en un momento temprano el resultado final del cable nervioso en regeneración. Descubrimos que las hebras longitudinales de fibrina podían observarse 2 semanas después de la implantación de conductos de polímero 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de PEG 1K (como indica la flecha negra en la Figura 8A), pero no en los conductos de NP-PE (Figura 8A, B), que sugieren el inicio de la formación de un cable de fibrina a través de la brecha nerviosa (Zhao, y otros, Restor Neurol Neurosci 5, 197, 1993). Además, el análisis de *Western blot* de marcadores de células de Schwann dentro de los exudados nerviosos 1 semana después de la implantación reveló una mayor abundancia de inmunorreactividades S100 $\beta$  y GFAP en exudados retirados de los conductos de polímero 89,5 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-0,5 % en moles de PEG 1K en comparación con los exudados eliminados dentro de los conductos de NPPE (Figura 8C, D).

## Ejemplo 2

### Materiales y métodos

#### Síntesis y caracterización de polímeros

Los estudios se realizaron utilizando un policarbonato derivado de tirosina para generar las fibras mediante extrusión en estado fundido. Se seleccionó para el estudio una composición de polímero único, poli(carbonato de éster etílico de desaminotirosil-tirosina), denominado poli(carbonato de DTE) y abreviado como "E0000". El poli(carbonato de DTE) se degrada muy lentamente *in vivo*, lo que requiere más de un año antes de que aparezcan cambios significativos en el peso molecular. Por lo tanto, los conductos compuestos de poli(carbonato DTE) experimentarán solo una degradación insignificante dentro del período de tiempo de nuestros estudios y eliminarán efectivamente la degradación como una variable en el funcionamiento del conducto.

El poli(carbonato de DTE) se sintetizó y purificó utilizando procedimientos publicados previamente (Ertel y otros, J Biomed Mater Res 1994; 28(8): 919-30). Los pesos moleculares (promedio numérico,  $M_n$ , promedio en peso,  $M_w$ ) y el índice de polidispersidad (PDI) se determinaron usando cromatografía de permeabilidad en gel (GPC, Waters Corporation, Milford, MA) con relación a patrones de poliestireno en dimetilformamida que contenía ácido trifluoroacético al 0,1 % como La fase móvil. Las temperaturas de transición vítrea ( $T_g$ ) de los polímeros se determinaron como se describió anteriormente (Engelberg y otros, Biomaterials 1991; 12(3): 292-304). El poli(DTE carbonato) se utiliza para fabricar conductos entrelazados y conductos con recubrimiento por inmersión que tenía un  $M_n$  de 167 700 Da con un PDI de 1,47 y  $T_g$  de 96,5 °C. Los recubrimientos electrohilados se fabricaron usando E1001 (1k), un copolímero que consiste en 89 % en moles de éster etílico de desaminotirosil-tirosina (DTE), 10 % en moles de desaminotirosil-tirosina (DT) y 1 % en moles de poli(etilenglicol) de 1kDa (PEG). E1001 (1k) se sintetizó utilizando procedimientos publicados previamente (Magno y otros, Journal of Materials Chemistry 2010; 20(40): 8885-8893) y tenía un  $M_n$  de 239.000 Da con un PDI de 1,6 y  $T_g$  de 97,0 °C.

#### Fabricación de conductos entrelazados

Inicialmente, se implementaron diferentes diseños de entrelazado utilizando hilo prototipo de polipropileno industrial (PP) de 60  $\mu$ m de grosor (ATEX Technologies Inc, Pinebluff, NC) para determinar el efecto del patrón de entrelazado y la densidad de fibra en el tamaño de poro del conducto y sus propiedades mecánicas. Se utilizaron las siguientes metodologías para fabricar conductos: A) Entrelazado de fibra única: 24 portadores, 1 fibra/portador de PP, entrelazado 2/2; B) Entrelazado triaxial: 24 portadores, 3 fibras PP retorcidas/portador + 4 fibras triaxiales longitudinales; C) Entrelazado de tres fibras: 24 soportes, 3 fibras de PP entrelazado/soporte, trenza 2/2; D) Entrelazado de tres fibras: 24 soportes, 3 fibras entrelazadas E0000/soporte, entrelazado 2/2.

Los conductos entrelazados utilizados para las pruebas *in vitro* e *in vivo* se fabricaron mediante entrelazado tubular de fibras de poli(carbonato DTE). El poli(carbonato DTE) se extruyó por fusión para producir fibras de un diámetro objetivo de aproximadamente 60 micras usando una extrusora de un solo tornillo de 3/8 de pulgada (microextrusora de Randcastle, Cedar Grove, NJ) y se monitoreó usando un micrómetro láser (Z-Mike 1200 serie, Groß-Umstadt, Alemania). El diámetro final de la fibra extruida osciló entre 80 y 110  $\mu$ m y la posproducción  $M_n$  fue de 138,550 Da con un PDI de 2,05. Luego se retorcieron tres fibras de polímero para formar un hilo multifilamento y se enrollaron en husos de entrelazado. Se usó una máquina de entrelazado tubular Herzog NG 1/24-120 (Herzog Maschinen-fabrik, Oldenburg, Alemania) equipada con 24 soportes para entrelazar los conductos sobre un mandril de teflón con un diámetro exterior de 1,5 mm (Applied Plastics Co., Inc., Norwood, MA). Después del entrelazado, los conductos se cortaron a las longitudes deseadas y los extremos se recortaron y sellaron usando un termocortador (ZTS 20, AZ Zangl, Alemania). Los conductos se limpiaron mediante lavados secuenciales en ciclohexano (1x), 0,5 por ciento en volumen de Tween20 en agua desionizada (1x) y agua DI (5x) mientras se sonicaban.

#### Fabricación de conductos por inmersión

Los conductos (que no forman parte de la invención) se fabricaron mediante recubrimiento por inmersión a partir de una solución de poli(carbonato DTE) al 20 % (p/v) en cloruro de metileno utilizando procedimientos publicados previamente (Ezra y otros, Tissue Eng Part A 2013), depositado en un mandril de 1,5 mm de diámetro externo recubierto de teflón.

Electrohilado

5 Se formaron capas secundarias de electrohilado en los conductos entrelazados en mandriles giratorios en una configuración de electrohilado utilizando una fuente de alimentación de alto voltaje (Gamma High Voltage Research Inc., Omaha Beach, FL) y una bomba de jeringa (KD Scientific, Holliston, MA) conectada a unas agujas de acero inoxidable 23G con punta roma a través de tubos de teflón de calibre 20 x 3' (ambos de Hamilton Company, Reno, NV). Se preparó una solución al 10 % (p/v) de polímero 89 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-1,0 % en moles de PEG 1K en ácido acético glacial (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) usando una relación 1:25 de trans-4 -hidroxi-L-prolina (tHyp): 89 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-1,0 % en moles de polímero PEG 1K para eliminar el reborde de las fibras de electrohilado. El electrohilado continuó hasta que se formó un recubrimiento de 300 µm de espesor alrededor de los conductos entrelazados. Los conductos se secaron completamente en la campana extractora para eliminar el disolvente residual.

15 Recubrimiento de hidrogel de ácido hialurónico (HA)

Los conductos entrelazados estériles se recubrieron por inmersión en una solución estéril de hialuronano modificado con tiol al 1 % (p/v) (HyStem) seguido de entrecruzamiento inmediato por inmersión en una solución estéril de poli(diacrilato de etilenglicol) al 1 % (p/v) (PEGDA) (ambas de Glycosan Biosystems-BioTime, Inc. Alameda, CA) en un baño de agua sonicada. Los conductos se secaron durante 5 minutos después de cada etapa de recubrimiento por inmersión y el proceso se repitió un total de cinco veces. Los conductos con doble recubrimiento de electrohilado y HA también se fabricaron depositando primero la capa de electrohilado sobre los conductos entrelazados como se describió anteriormente, seguido de recubrimiento por inmersión en soluciones de hialuronano y PEGDA. Los conductos recubiertos con HA se secaron durante la noche en la campana de flujo laminar y se implantaron en estado seco para experimentos *in vivo*.

25 Esterilización

Para reducir la carga biológica, todos los conductos se expusieron a irradiación UV durante 40 minutos antes del uso *in vivo*.

30 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El tamaño de los poros y la topografía de las muestras recubiertas por pulverización catódica (recubrimiento por pulverización catódica SCD 004, 30 miliamperios durante 120 segundos con Au/Pd) se evaluó utilizando SEM (Amray 18301, 20 kV). El tamaño de poro, el ángulo de entrelazado y el grosor de la pared de los conductos, y el diámetro de la fibra de las esteras de electrohilado se midieron en imágenes SEM utilizando ImageJ (software de dominio público de los Institutos Nacionales de Salud). El ángulo de entrelazado se midió entre una línea perpendicular al eje longitudinal del entrelazado y una línea paralela a los grupos de fibras alineados cerca del eje del tubo.

40 Prueba mecánica

Las propiedades mecánicas de los conductos entrelazados se caracterizaron por pruebas de compresión y flexión de tres puntos con un probador mecánico Syntec 5/D, y pruebas de tracción con un sistema de prueba de microforzos MTS Tytron™ 250 (ambos de MTS, Eden Prairie, MN). Las muestras se prepararon por incubación en PBS a 37 °C durante la noche y se analizaron inmediatamente después de retirarlas de la incubadora. Las pruebas de compresión se realizaron en conductos de 1 cm de largo, con una velocidad transversal de la cruceta de 6 mm/min hasta el desplazamiento del punto final equivalente al 60 % del diámetro inicial del conducto. La rigidez a la compresión se calculó a partir de la pendiente de la región lineal en las curvas de fuerza frente a desplazamiento.

50 Se realizaron pruebas de flexión de tres puntos en conductos de 1,5 cm de largo colocados en las vigas de soporte inferiores del aparato de flexión, que se separaron a 1 cm. El tercer punto se bajó desde arriba del punto medio del conducto a una velocidad de cruceta de 10 mm/min. Para la prueba de tracción, se aseguraron conductos de 3 cm de largo en los agarres, con una separación de agarre de 2 cm y se estiraron a una velocidad de 20 mm/min hasta que fallaran. Las pruebas de torcedura se realizaron doblando conductos de 3 cm de largo en un cable flexible de 0,6 mm de diámetro (Applied Plastics Co., Inc., Norwood, MA) hasta que se produjo un pliegue, que se definió como una reducción visualmente detectable en el diámetro externo del conducto en el punto de flexión. Los conductos de poli(carbonato de DTE) fabricados por entrelazado y recubrimiento por inmersión, así como los conductos NeuraGen® disponibles en el mercado (Integra LifeSciences Corporation, Plainsboro, NJ) se doblaron y se observó la formación de torceduras en el punto de flexión. El ángulo entre el brazo doblado de los conductos y el eje horizontal se midió y se informó como el ángulo de flexión. Para los conductos entrelazados, la prueba de torcedura se llevó a cabo doblando el conducto en un bucle hasta que se produjo una torcedura. Para esta prueba, los conductos entrelazados se torcieron gradualmente en bucles más pequeños y se fotografiaron en cada incremento. El perímetro del bucle interno formado por el conducto se midió luego utilizando el software ImageJ y el diámetro del bucle interno correspondiente se calculó a partir del perímetro, suponiendo un bucle circular.

65 Evaluación *in vivo*

Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo un protocolo aprobado por el Comité de Instalaciones y Cuidado de Animales de Rutgers y el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC).

5 Implantación subcutánea de conductos entrelazados

Se anestesiaron ratas machos Sprague-Dawley con un peso de 250-300 g (Charles River Labs, Wilmington, MA) mediante inyección intraperitoneal de ketamina/xilazina (75/10 mg/kg, respectivamente) y se implantaron los conductos entrelazados en cuatro bolsas subcutáneas en la espalda de los animales. Los animales fueron sacrificados 3 semanas después de la implantación, y los conductos fueron retirados con el tejido conectivo circundante. Inmediatamente después de su retiro, los conductos se fijaron en 10 % formalina tamponada, seguido del procesamiento de tejidos e inclusión en parafina para la tinción histológica. Se prepararon secciones de seis  $\mu\text{m}$  y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) usando métodos estándar.

15 Implantación *in situ* de conductos en el modelo de 1 cm de nervio ciático de rata:

Se anestesiaron ratas Lewis hembra que pesaban 200-250 g (Charles River Labs, Wilmington, MA) mediante inyección intraperitoneal de ketamina/xilazina (75/10 mg/kg, respectivamente) y se implantaron los conductos, utilizando protocolos publicados. Para los grupos de conductos, se retiró una sección de 5 mm del nervio ciático y se permitió que los muñones nerviosos se retrajeran para formar un espacio de 10 mm. Los conductos estériles (1,2 cm de largo y 1,5 mm de diámetro) se suturaron a los muñones nerviosos usando dos suturas perineurales 9-0 en cada extremo, manteniendo el espacio de 10 mm entre los muñones. En el caso de los autoinjertos, se extrajo un segmento de nervio de 1 cm, se invirtió y se suturó nuevamente en el espacio usando tres a cuatro suturas 9-0 en cada extremo.

25 Electrofisiología:

La recuperación de la función electrofisiológica después de la lesión nerviosa se evaluó bajo anestesia general midiendo los potenciales de acción muscular compuesta (CMAP) en los músculos dorsal y plantar del pie, que son los objetivos más distales de las ramas peroneales y tibiales del nervio ciático. Los CMAP se registraron inmediatamente antes de la cirugía (animales intactos) y cada 4 semanas después de la cirugía utilizando el sistema VikingQuest EMG (Natus Medical Inc., San Carlos, CA). Se utilizaron agujas de EEG subcutáneas como electrodos de registro, referencia y tierra. Los electrodos de referencia y de tierra se colocaron en el lado lateral del 5to metatarsiano y en el calcáneo, respectivamente, en el lado operado de la rata. El electrodo de registro se insertó por vía subcutánea en el músculo dorsal del pie sobre el 3er metatarsiano para el CMAP peroneal, y en el músculo plantar para el CMAP tibial. El nervio ciático se estimuló percutáneamente utilizando un electrodo estimulante bipolar a nivel del tobillo directamente posterior a la tibia. Los electrodos se ajustaron localmente para producir la máxima amplitud de CMAP y el estímulo se incrementó gradualmente para producir una respuesta supramaximal. El promedio de tres amplitudes CMAP consecutivas, medido desde el inicio de la señal CMAP hasta la parte superior del pico, y tres latencias consecutivas se calcularon para cada animal y se promediaron para los animales en el mismo grupo de tratamiento para la representación gráfica.

40 Análisis histomorfométrico de nervios explantados

Dieciséis semanas después de la cirugía, las ratas se anestesiaron profundamente mediante el uso de anestesia ketamina/xilazina, se expuso el nervio ciático del lado operado y se realizó una fijación *in situ* del nervio sumergiéndolo en el fijador Trump durante 30 minutos. El nervio fue luego colectado y procesado como se describió anteriormente. Se contaron los números totales de axones mielinizados por sección transversal del nervio utilizando el software ImageJ 1,43u, se contaron un mínimo de 500 axones mielinizados en imágenes aleatorias de 100x para cada sección nerviosa de 1  $\mu\text{m}$  de grosor y se promediaron más de tres réplicas de secciones nerviosas. El área de tejido sin procesar, el área de sección transversal del cable nervioso mielinizado y el % de regeneración nerviosa se midieron en las imágenes 10x y se analizaron con el software ImageJ 1,43u. El diámetro axonal (dentro de la vaina de mielina) y la fibra nerviosa (incluida la vaina de mielina) se midieron en tres muestras aleatorias de 100x de cada sección para calcular la relación G.

Colecta de músculo

Tras la extracción del nervio, los animales fueron sacrificados por asfixia con  $\text{CO}_2$ . Los músculos tibial anterior y gastrocnemio de ambas extremidades posteriores se recogieron inmediatamente exponiendo la musculatura a través de una incisión longitudinal en la piel de la rodilla al tobillo. Los músculos se colectaron desde el origen hasta la inserción y se pesaron con una balanza electrónica.

60 Métodos de estadística

Los datos en este estudio se representan como media  $\pm$  SE a menos que se indique lo contrario. Las pruebas de análisis de varianza de una vía (ANOVA) con las pruebas post hoc de Dunnett se utilizaron en este estudio para evaluar diferencias significativas. La significación estadística se definió como  $p < 0,05$ .

65 Resultados

## Fabricación de conductos y caracterización física

Se construyeron tres prototipos de conducto variando el número de filamentos y torsiones en un hilo usando fibras de prototipos de polipropileno no degradables disponibles comercialmente. Los conductos resultantes mostraron diferencias sustanciales en las características físicas, como el tamaño de los poros y el ángulo de entrelazado. Un entrelazado 2/2 construido con hilo de tres fibras tenía las características mecánicas más favorables, demostrando una resistencia superior a la torcedura y a la deformación elástica. Los entrelazados triaxiales tenían el tamaño de poro más bajo, eran más rígidos e inconvenientemente poseían memoria de forma tras la deformación. Debido a una combinación de tamaño de poro y propiedades mecánicas, se seleccionó el método tradicional de entrelazado 2/2 para explorar con más detalle utilizando fibras de poli(carbonato DTE). Los conductos entrelazados de poli(carbonato DTE) se fabricaron con fibras de 80 a 110  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los conductos resultantes tenían un tamaño de poro promedio de  $65 \pm 19 \mu\text{m}$  y un diámetro interno de 1,5 mm.

## Comparación mecánica de conductos entrelazados

Para la reparación de grandes brechas nerviosas en áreas de alta movilidad, la flexibilidad y la prevención de torceduras son criterios importantes de diseño del conducto. Comparamos las propiedades mecánicas de los conductos entrelazados de poli(carbonato DTE), los conductos no porosos de poli(carbonato DTE) recubiertos por inmersión, con paredes de  $183 \pm 15 \mu\text{m}$  de grosor, y los conductos NeuraGen® de uso clínico que consisten en colágeno I (Integra Lifesciences, South Plainfield, NJ). Debido a la incapacidad de asegurar una cantidad suficiente de los conductos NeuraGen®, no todos los experimentos pudieron ser replicados y los hallazgos previos de Yao y otros, que usaron estos conductos se cita a veces para completar la comparación.

Para evaluar la capacidad de resistir la flexión mientras se mantiene un lumen abierto, se realizaron pruebas de torceduras para evaluar el ángulo al que se pueden doblar los conductos de poli(carbonato DTE) antes de que ocurra una oclusión luminal. Los conductos se doblaron sobre un alambre hasta que se produjo una torcedura, que es una reducción del diámetro interno del lumen. Para los conductos recubiertos por inmersión y NeuraGen®, se produjo un colapso visible en el diámetro del lumen cuando los conductos se doblaron  $29,3^\circ$  y  $55,0^\circ$ , respectivamente, desde el eje horizontal. Los conductos entrelazados resistieron a las torceduras, mantuvieron un diámetro de lumen constante cuando se doblaron en ángulos superiores a  $125^\circ$ . Los conductos entrelazados también retomaron su forma original después de liberar la carga, mientras que los conductos recubiertos por inmersión y NeuraGen® presentaron oclusión parcial o completa del lumen cuando se doblaron y no volvieron a su forma original.

Estos resultados indican que nuestros conductos entrelazados son altamente resistentes a la oclusión luminal y es mucho más probable que mantengan un lumen abierto cuando se aplican en áreas de alta flexión. Los grandes ángulos de flexión permitidos por los conductos entrelazados son fisiológicamente relevantes; los codos y las articulaciones de los dedos se doblan rutinariamente en ángulos grandes muy por encima de  $90^\circ$ . Se ha informado que se produce un fallo debido a la rotura cerca de la articulación de la rodilla para tubos de colágeno de 22 mm de largo que se usaron en el modelo de lesión del nervio ciático de rata debido a la flexibilidad insuficiente de las construcciones tubulares.

Los nervios periféricos también experimentan fuerzas de tracción, compresión y corte creadas por el movimiento de las extremidades y la contracción muscular. Los nervios periféricos están bajo cargas de tensión *in situ* y experimentan ~11 % de tensión en posición de reposo. Mientras tolera 11,7 MPa de tensión de tracción máxima. Por lo tanto, cualquier conducto nervioso que actúe para cerrar una brecha nerviosa periférica debería poder alargarse reversiblemente bajo cargas de hasta 11,7 MPa. Descubrimos que esta carga está dentro de la porción lineal de la curva de tensión-deformación de los conductos entrelazados de poli(carbonato DTE), que muestran una deformación reversible del 17-22 % bajo esta carga, suficiente para resistir la tensión de los movimientos de las extremidades.

En la compresión transversal, los conductos recubiertos por inmersión mostraron la mayor resistencia a la carga aplicada, pero se deformaron plásticamente cuando se comprimieron al 60 % del diámetro interno, mientras que los conductos entrelazados recuperaron su forma original inmediatamente después de eliminar la carga de compresión. Los datos informados de los conductos NeuraGen® indican que bajo compresión estos conductos se deforman 10 veces más que los conductos entrelazados. Se observaron tendencias similares para los experimentos de flexión de tres puntos para los conductos con y sin revestimiento, y los conductos con revestimiento muestran una mayor resistencia a la flexión. No se informaron datos de flexión en los conductos NeuraGen®. Esta observación de que los conductos entrelazados se pueden doblar libremente, sin que se produzca la oclusión de su lumen, es una ventaja crítica sobre los otros conductos que son demasiado rígidos para doblarse y, por lo tanto, pueden causar daños en los tejidos o provocar una torcedura en el punto de flexión, aplastando el cable nervioso formado. En términos de rigidez a la tracción, los conductos entrelazados y NeuraGen® cedieron más fácilmente a la tensión que los conductos recubiertos por inmersión, con los conductos entrelazados que se deforman elásticamente bajo condiciones de carga fisiológica, lo que es beneficioso para los nervios que experimentan movimiento y tensión de tensión. Por otro lado, la resistencia a la tracción final de los conductos entrelazados fue 5 veces mayor que NeuraGen®, lo que demuestra la resistencia de la estructura entrelazada con respecto al recomendado clínico.

## Respuesta del hospedero

Se realizó un pequeño estudio de control para asegurar que el material del conducto no provoque una fuerte respuesta inflamatoria que pueda afectar los resultados obtenidos en los estudios de regeneración nerviosa posteriores. Para evaluar la respuesta general del tejido, se implantaron conductos entrelazados de poli(carbonato DTE) en bolsas subcutáneas en la espalda de ratas adultas. Después de 3 semanas, se retiraron los conductos y se realizó la histología H&E. Las secciones revelaron la formación esperada de una cápsula fibrosa alrededor de los conductos. El tejido de la cápsula se organizó difusamente y carecía de una alta concentración de células inflamatorias, lo que indica que la respuesta del huésped al conducto entrelazado de poli(carbonato DTE) fue mínima y de acuerdo con los hallazgos anteriores sobre la respuesta del huésped a los polímeros dentro de la familia de policarbonato derivado de tirosina.

10 Recubrimientos secundarios

La tinción H&E también reveló que el tejido circundante se adhirió al material del conducto, penetró a través de los poros y entró en el lumen del conducto de poli(carbonato DTE). Se han investigado los efectos del tamaño de poro del conducto en el resultado de la regeneración nerviosa y, aunque los resultados e interpretaciones de este aspecto crítico varían ampliamente, se informó que el tamaño de poro óptimo para los conductos está en el rango de 5-30  $\mu\text{m}$  para permitir la difusión de nutrientes y desechos, y minimizar la infiltración de células fibróticas e inflamatorias. Los conductos entrelazados de poli(carbonato DTE) tienen poros de 20 a 140  $\mu\text{m}$ . Debido a las secciones teñidas con H&E que muestran infiltración de células en los conductos entrelazados, desarrollamos recubrimientos de barrera temporales micro o nanoporosos que permitirían el intercambio de nutrientes, pero reducirían la capacidad de las células no nerviosas para infiltrarse en el conducto e interrumpir la regeneración.

Se exploraron tres recubrimientos de conducto: un recubrimiento de hidrogel que consiste en ácido hialurónico entrecruzado (HA) que se deshidrató después de la aplicación, una capa de polímero electrohilado que consiste en 89 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-1,0 % en moles de PEG 1K que se aplicó sobre la superficie del conducto y una combinación de la capa de electrohilado posteriormente recubierta con HA. Utilizamos una versión de HA de alto peso molecular y entrecruzada con PEGDA que descubrimos que evita la unión de los fibroblastos. Se informa que los hidrogeles de HA entrecruzada con PEGDA son estables durante 4-8 semanas *in vivo*, pero que sepamos, no se han utilizado de esta manera como recubrimiento de conductos nerviosos.

El tamaño promedio de los macroporos en los conductos entrelazados sin recubrimiento fue de  $65 \pm 19 \mu\text{m}$  y los métodos de recubrimiento secundario proporcionaron diversos grados de cobertura en estos poros. El delgado recubrimiento de HA no es poroso en su estado deshidratado y recubre las fibras del entrelazado y los poros. La capa de electrohilado tenía un grosor promedio de  $292 \pm 39 \mu\text{m}$  con un diámetro de fibra de  $0,26 \pm 0,06 \mu\text{m}$  y un tamaño de poro de 2,02  $\mu\text{m}$ , calculado con la ecuación para el radio de poro medio en redes isotrópicas casi planas, planteada por Sampson y otros, suponiendo una fracción de poro de 0,85. Para los conductos recubiertos con electrohilado y HA, la sonicación de los conductos durante el recubrimiento por inmersión permitió que el hidrogel se difundiera a través de la estera de la fibra de electrohilado y cubriera completamente las fibras de la estera y el conducto subyacente para crear una barrera aparentemente no porosa. La capa de electrohilado se encogió después del recubrimiento con el hidrogel HA hasta un grosor final de  $54 \pm 9 \mu\text{m}$ . Las pruebas de compresión, flexión y tracción indicaron que estos recubrimientos no afectaron las ventajas mecánicas de los conductos entrelazados.

Valoración de la regeneración del nervio ciático en ratas

Para evaluar la capacidad básica para ayudar en la regeneración nerviosa, se probaron conductos entrelazados de poli(carbonato DTE) en el modelo bien conocido de lesión del nervio ciático de rata con una brecha de 1 cm. Los grupos de tratamiento incluyeron el conducto entrelazado sin recubrimiento (n=7 animales/grupo), los conductos entrelazados recubiertos con HA (n=7), los conductos entrelazados recubiertos con polímero electrohilado que consiste en 89 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-1,0 % en moles de PEG 1K (n=4), conductos entrelazados recubiertos secuencialmente con polímero electrohilado que consiste en 89 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-1,0 % en moles de PEG 1K seguido de HA (n=4). Se usó un grupo de control de un autoinjerto (n=7) invertido dentro del sitio de la lesión y se colectaron los nervios regenerados de todos los grupos después de 16 semanas.

Análisis histomorfométrico del nervio explantado

Las secciones de los segmentos nerviosos regenerados del centro de los conductos mostraron que todas las condiciones ayudaron a la regeneración de los axones, pero se observó una variación significativa. El tejido regenerado dentro de los conductos entrelazados no recubiertos mostró muchos axones regenerados dentro de los fascículos que estaban poco organizados. Se observó una cantidad considerable de tejido no nervioso con una apariencia fibrosa dentro del conducto tanto exterior al nervio regenerado como intercalado entre los fascículos ubicados en la periferia del nervio regenerado. Se observaron características similares en los nervios que se regeneraron dentro de los conductos entrelazados con un recubrimiento de fibra de electrohilado. Los cables nerviosos en los conductos entrelazados recubiertos con electrohilado eran más pequeños y variables en presencia de un límite entre el área axonal y el tejido circundante; algunas muestras tenían fascículos nerviosos sueltos, mientras que en otras, los fascículos estaban más apretados y el cable nervioso estaba rodeado por capas poco organizadas de tejido no nervioso. Este resultado fue sorprendente y sugiere que la estera de electrohilado que rodea el conducto entrelazado puede haber facilitado la infiltración de tejido fibroso.

Por el contrario, todos los conductos recubiertos con HA mostraban cables nerviosos redondeados y densamente empacados con fascículos y axones apretados. Los nervios regenerados dentro de los conductos recubiertos con HA parecen haber formado una capa perineurial que forma un límite distinto entre el nervio regenerado y el tejido fibroso dentro del conducto. Estas características no se replicaron en los nervios regenerados dentro de los conductos entrelazados recubiertos con fibras de electrohilado y HA, donde se observó tejido fibroso extenso que se había intercalado dentro de los axones y fascículos nerviosos en regeneración. Los nervios regenerados dentro de los injertos autólogos estaban, como se esperaba, altamente organizados con un perineuro maduro.

La caracterización histomorfométrica mostró que el área mielinizada o el área ocupada por los axones nerviosos era más grande en los conductos entrelazados sin recubrimiento, que fue comparable a los injertos autólogos. Los conductos recubiertos con HA mostraron la otra área mielinizada mayor, seguida por los conductos recubiertos con fibra de electrohilado y HA, y finalmente los conductos recubiertos con solo fibras de electrohilado. En contraste, la densidad axonal fue la más alta en los conductos recubiertos con HA y la más baja en los conductos entrelazados sin recubrimiento, lo que confirma que los conductos recubiertos con HA contenían cables nerviosos densamente regenerados, mientras que los conductos entrelazados sin recubrimiento tienen cables nerviosos grandes, pero poco empaquetados. La evaluación de la mielinización axonal midiendo la relación G mostró que las menores relaciones G fueron en el grupo autólogo, con todos los otros grupos significativamente mayores que los autólogos pero equivalentes entre sí. En comparación con los injertos autólogos, los conductos recubiertos con HA tenían un mayor número de axones empaquetados por unidad de área a pesar de que estos axones eran menos maduros (relación G mayor, vainas de mielina más delgadas) como se esperaba. En el transcurso de la regeneración, los axones en el grupo de conductos recubiertos con HA probablemente madurarán aún más para lograr una conducción nerviosa más rápida y mejores resultados de regeneración.

#### Peso muscular

Después de la bisección del nervio ciático, la atrofia de los músculos tibial anterior (AT) y gastrocnemio y la recuperación del peso muscular son indicativos de recuperación. Estos músculos se cosecharon de ambas extremidades posteriores y se pesaron al final del período de recuperación de 16 semanas. La recuperación del peso muscular fue la mayor en el grupo de injerto autólogo, seguido de los conductos entrelazados recubiertos con HA. La recuperación del peso muscular TA para los conductos entrelazados recubiertos con HA fue significativamente mayor que para los conductos no recubiertos. La recuperación del peso muscular TA y gastrocnemio fue equivalente en el resto de los grupos de conductos. La recuperación mejorada del peso muscular del TA con los conductos entrelazados recubiertos con HA respalda los hallazgos de la histología nerviosa en que la regeneración mejorada corresponde a limitar el grado de infiltración de tejido fibroso y la capacidad de formar una capa perineurial con estos conductos.

#### Electrofisiología

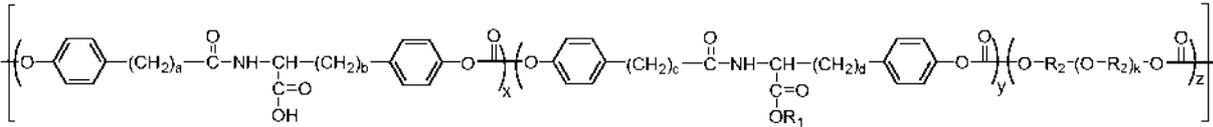
Para evaluar la regeneración nerviosa funcional, se evaluó la medición electrofisiológica de la conducción nerviosa a través del defecto y los grupos musculares reinervados mediante el registro de la amplitud supramáxima del potencial de acción muscular (CMAP) y la latencia de los nervios peroneal y tibial. Tanto para la CMAP tibial como para la peroneal, las primeras señales postoperatorias de CMAP se detectaron a las 8 semanas para los autoinjertos y a las 12 semanas para los grupos de conductos. El 37 % de la señal CMAP se recuperó en el grupo de autoinjerto en el punto final de 16 semanas, que mostró la mayor amplitud entre los tratamientos. Entre los grupos de conductos, los conductos entrelazados recubiertos con HA tenían las mayores amplitudes de CMAP con aproximadamente el 14 % de la señal de CMAP recuperada en el punto final de 16 semanas.

La mejora en la regeneración funcional es evidente en la correlación inversa entre la latencia CMAP y las amplitudes. En consecuencia, el grupo de autoinjerto tuvo los valores de latencia peroneal y tibial más bajos a las 16 semanas, lo que indica una conducción de señal más rápida. Los valores de latencia observados fueron equivalentes para los grupos de conductos entrelazados con la excepción de los conductos recubiertos con ES, que mostraron latencias más largas, en correspondencia con menos axones y una mayor relación G observada en la histología de este grupo.

La electrofisiología es compatible con la histología, lo que indica un papel importante de la porosidad y la infiltración celular para dificultar la recuperación del nervio después de una lesión. Quizás lo más sorprendente fue el efecto negativo que las capas ES con y sin HA tuvieron en la infiltración de tejido no nervioso. El presente estudio encontró que estos conductos se enriquecieron con tejido fibroso a través de las esteras cuando se aplicaron como recubrimiento a los conductos. Es probable que la extensa área de superficie amigable con las células ofrecida por las esteras afectara las propiedades del HA para repeler las células. Además, el aflojamiento de las esteras debido a la exposición continua al ambiente *in vivo* también puede haber facilitado la infiltración de tejidos. También se demostró que los materiales de conducto, el poli(carbonato de DTE) y el polímero 89 % en moles de DTE-10 % en moles de DT-1,0 % en moles de PEG 1K, fueron amigables para la unión celular y la adsorción de proteínas.

REIVINDICACIONES

1. Un conducto nervioso biocompatible para la regeneración nerviosa que comprende un tubo de fibra porosa recubierto con un hidrogel biorreabsorbible, dichas fibras comprenden un polímero que ayuda en la regeneración nerviosa por adsorción preferencial de proteínas endógenas, en el que dichas fibras están entrelazadas con poros en el rango de aproximadamente 5 a 200 micrómetros que usan un patrón de entrelazado resistente a torceduras y dicho material y grosor del recubrimiento de hidrogel se seleccionan para controlar la porosidad general de modo que los nutrientes y el oxígeno puedan difundirse a través de dicho recubrimiento de hidrogel, pero se evita la infiltración de tejido fibroso a través del recubrimiento, en el que dicho polímero biocompatible tiene unidades repetitivas de la estructura:



en el que a y b son independientemente 0 o un número entero entre 1 y 6, incluso;

c y d son independientemente 0 o un número entero entre 1 y 6, incluso;

cada R<sub>1</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en grupos de alquilo lineal y ramificado que contienen hasta 18 átomos de carbono;

cada R<sub>2</sub> es independientemente un grupo alquileno que contiene hasta 6 átomos de carbono;

k está entre 20 y 200; y

x oscila entre 0,002 y 0,20; z oscila entre 0,005 y 0,10; y x + y + z = 1,00

2. El conducto nervioso biocompatible de la reivindicación 1, en el que a y b son dos y uno, respectivamente.
3. El conducto nervioso biocompatible de la reivindicación 1, en donde c y d son dos y uno, respectivamente, y R<sub>1</sub> es etilo.
4. El conducto nervioso biocompatible de la reivindicación 1, en el que R<sub>2</sub> para dicho polímero es etileno y k está entre aproximadamente 20 y aproximadamente 100.
5. El conducto nervioso biocompatible de la reivindicación 1, en el que dicho tubo de fibra porosa comprende un entrelazado biaxial enrollado helicoidalmente.
6. El conducto nervioso biocompatible de la reivindicación 1, en el que dicho hidrogel biorreabsorbible comprende al ácido hialurónico entrecruzado (HA).
7. El conducto nervioso biocompatible de la reivindicación 6, en el que dicho ácido hialurónico (HA) está entrecruzado con PEGDA.
8. El conducto nervioso biocompatible de la reivindicación 1, en el que el conducto nervioso biocompatible comprende además un segundo hidrogel biorreabsorbible para llenar el lumen interno del conducto nervioso biocompatible.
9. El conducto nervioso biocompatible de la reivindicación 8, en el que el segundo hidrogel comprende al colágeno unido covalentemente con un péptido promotor de neurita que imita al glicano *Human Natural Killer-1* (m-HNK-1).
10. El conducto nervioso biocompatible de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento o reparación de una lesión del nervio periférico cuyo uso comprende las etapas de:
  - seccionar los muñones proximales y distales del nervio lesionado de forma limpia y perpendicular para que no quede ningún daño ni tejido cicatrizado,
  - colocar el conducto *in situ* de modo que se pueda colocar aproximadamente 1 mm de cada muñón en los extremos proximal y distal del conducto, respectivamente, y
  - asegurar dichos muñones nerviosos a dicho conducto usando técnicas micro-neuroquirúrgicas convencionales.
11. El conducto nervioso biocompatible de la reivindicación 10, que comprende estabilizar adicionalmente dicho conducto en el tejido blando circundante con suturas, o inundando el sitio de reparación con un adhesivo similar a fibrina, o ambos.

## ES 2 780 648 T3

12. El conducto nervioso biocompatible de la reivindicación 1, que comprende además un nervio o tejido nervioso o componente celular nervioso que se inserta en el lumen interno del conducto nervioso biocompatible.
- 5 13. El conducto nervioso biocompatible de la reivindicación 12, donde dichos componentes celulares se inyectan dentro de un hidrogel para llenar dicho lumen, o se inyectan en un relleno de tipo hidrogel dentro del lumen.
14. El conducto nervioso biocompatible de la reivindicación 12, en el que dichos componentes de tejido se colocan en el lumen después de que el conducto se corta longitudinalmente para proporcionar acceso.
- 10 15. El conducto nervioso biocompatible de la reivindicación 1, en el que el patrón de entrelazado resistente a las torceduras mantiene un diámetro de lumen constante cuando se dobla en ángulos superiores a  $125^\circ$  sobre un cable flexible de 0,6 mm de diámetro y retoma su forma original después de liberar la carga de flexión.
- 15 16. El conducto nervioso biocompatible de la reivindicación 1, en donde x oscila entre aproximadamente 0,05 y 0,20.

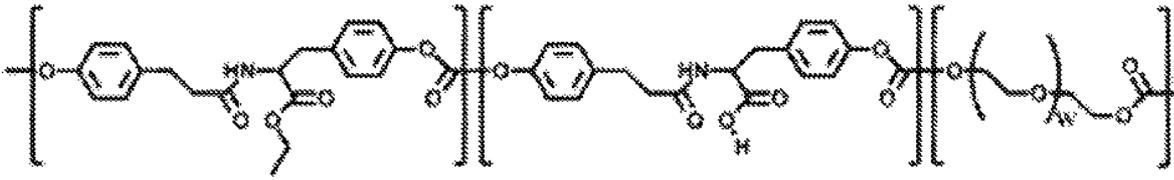


Figura 1 Estructura química de E10-0,5(1k) que consiste en desaminotirosil tirosina etil éster (DTE), desaminotirosil tirosina (DT) y poli(etilenglicol) (PEG).

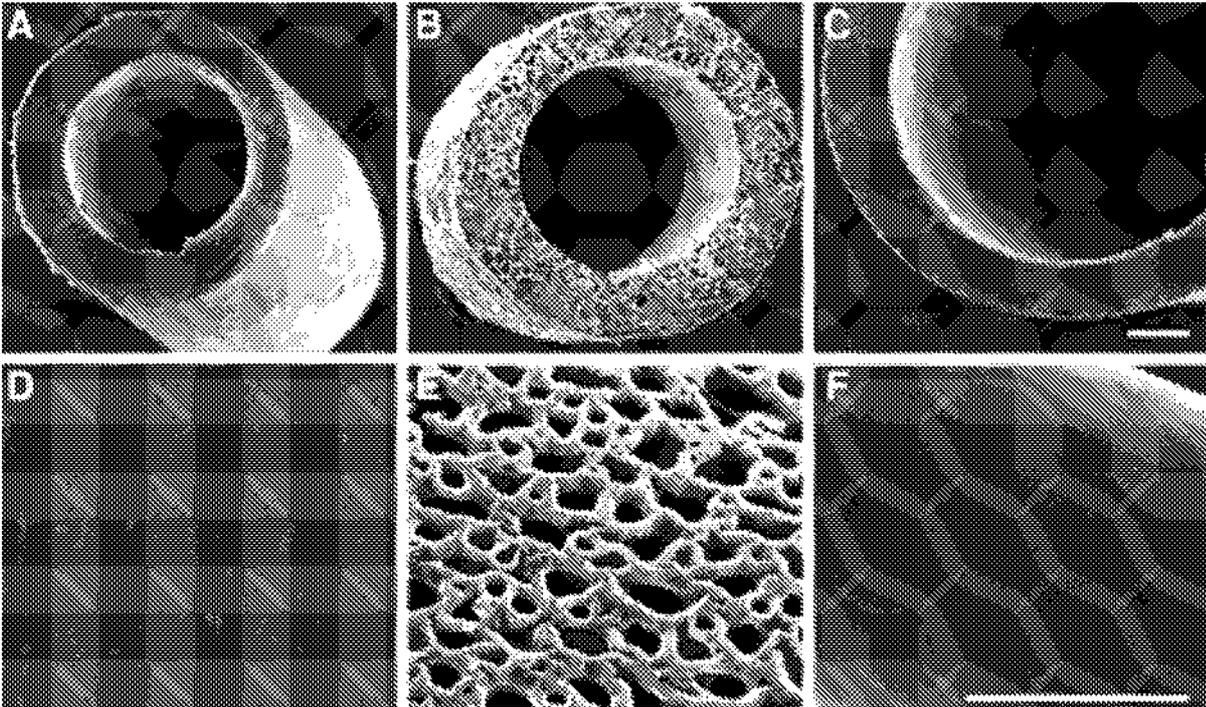


Figura 2 Imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM) de los conductos. Secciones transversales del conducto no poroso (A, D) de polietileno (NP-PE), (B, E) conducto poroso E10-0,5(1K) [P-E10-0,5(1k)] y (C, F) conducto no poroso E10-0,5(1k) [NPE10-0,5(1k)], respectivamente. Barra de escala en cada fila: 100  $\mu$ m.

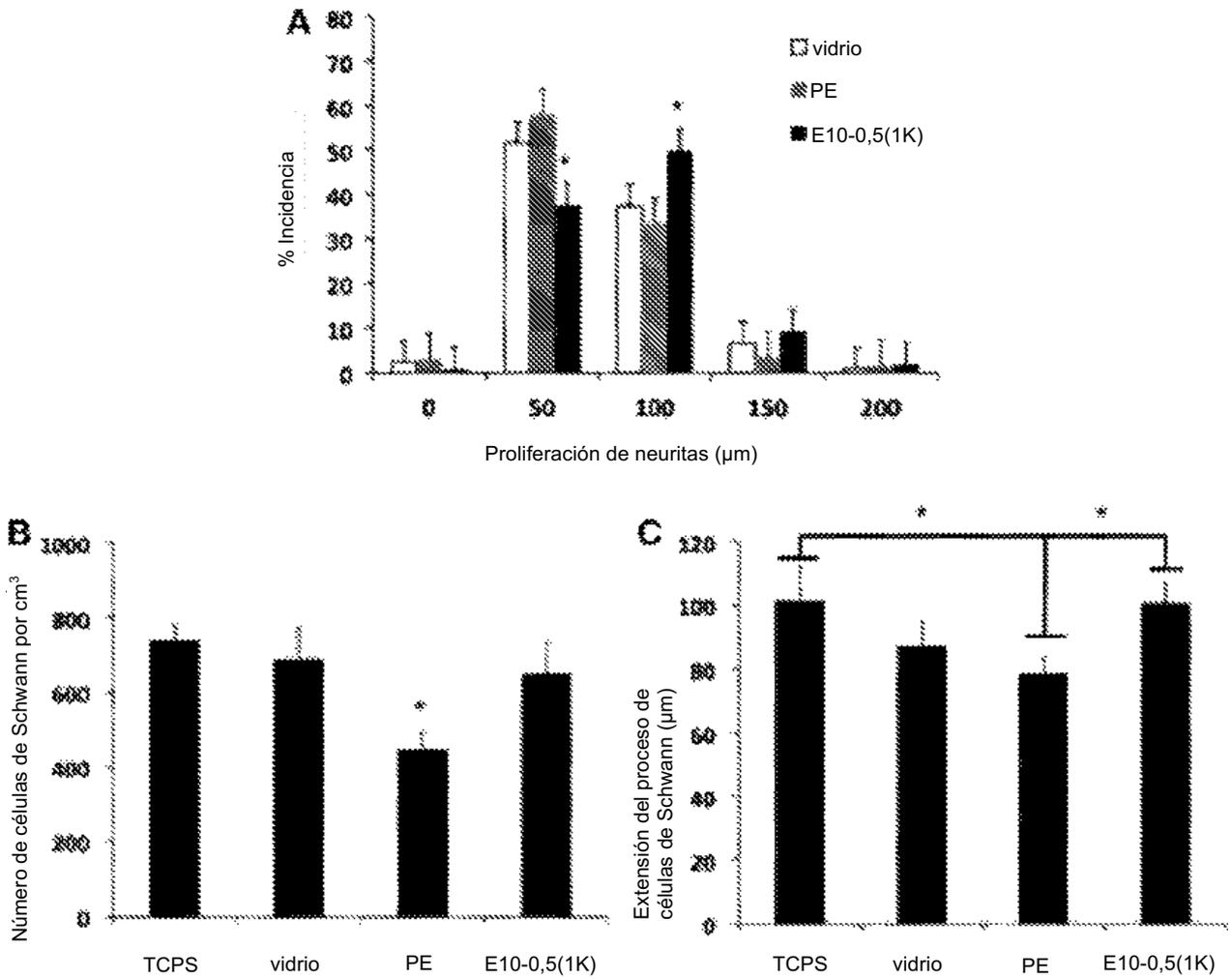


Figura 3 Evaluación *in vitro* de la proliferación de neuritas y la proliferación y extensión de células de Schwann en películas bidimensionales (2D) de E10-0,5(1k) y polietileno (PE) en comparación con sustratos control, poliestireno de cultivo de tejidos (TCPS) y vidrio.

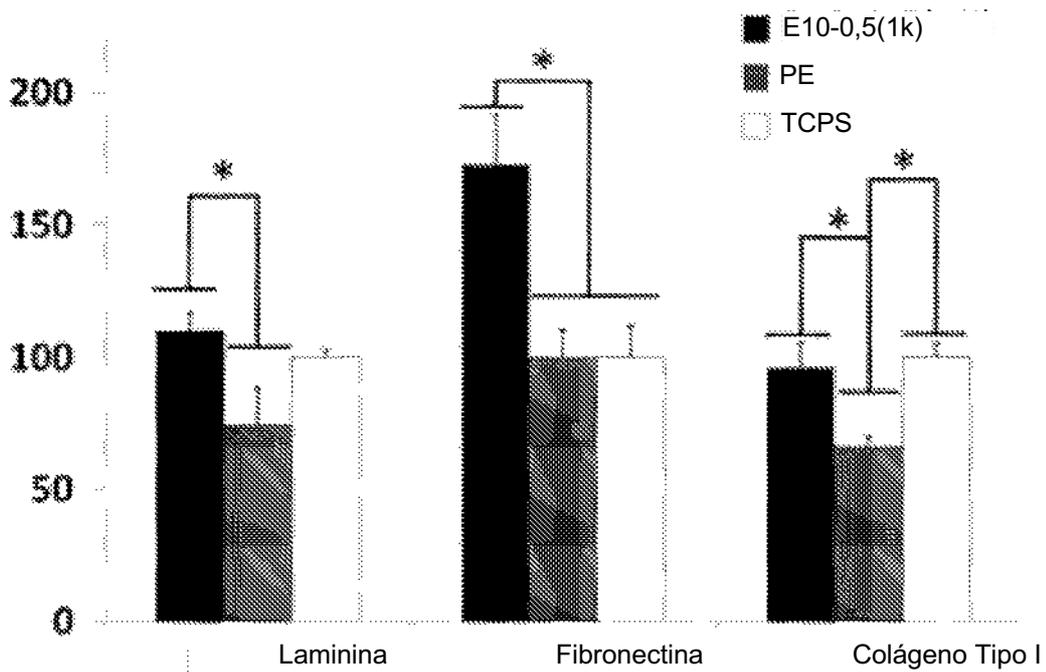


Figura 4 Adsorción relativa de proteínas de la matriz extracelular de soporte neuronal (ECM) (laminina, fibronectina y colágeno tipo I) en películas 2D de E10-0,5(1k) y PE en comparación con un sustrato control, TCPS. (\*  $p < 0,05$ , análisis de varianza de una vía con la prueba post hoc de Tukey).

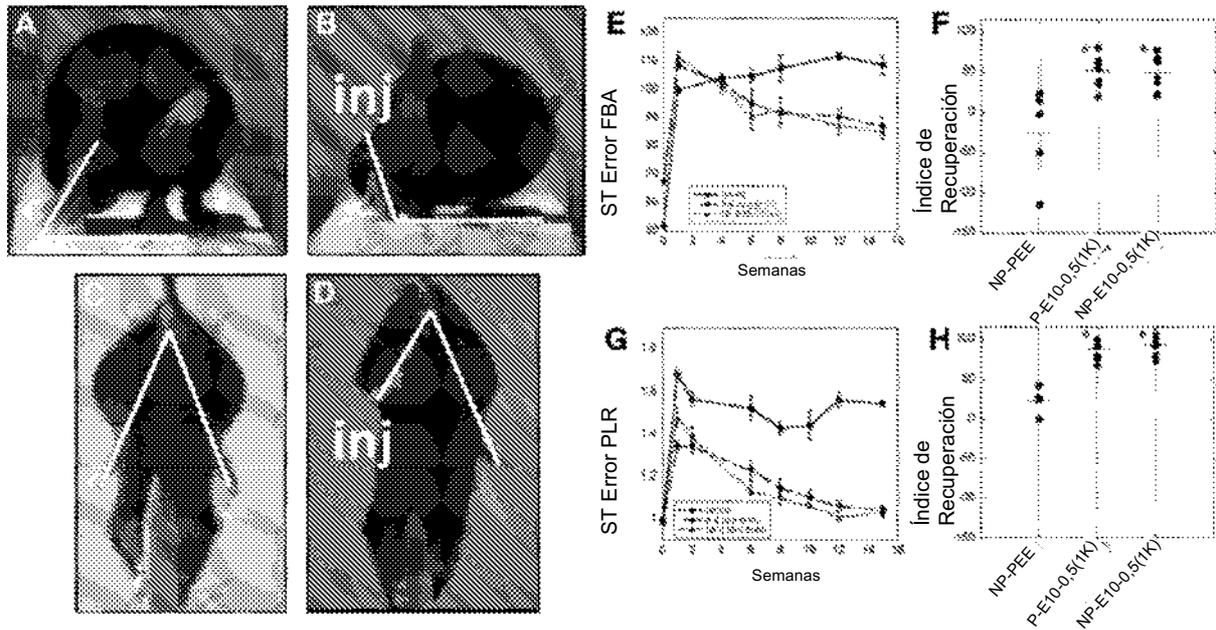


Figura 5 Cuadros de video que muestran las medidas funcionales realizadas en ratones después de la implantación del conducto y las métricas de recuperación funcional promovidas por los conductos E10-0,5(1k) y NP-PE *in vivo*. Los cuadros A y C representan mediciones previas a la lesión y los cuadros B y D representan mediciones posteriores a la lesión (inj). Las líneas blancas dibujadas en los cuadros de video muestran el ángulo de la base del pie (FBA) (A, B) y las longitudes de las extremidades utilizadas para el cálculo de la relación de protracción de las extremidades (PLR) (C, D) (A) el FBA promedio de ratones prelesionados es de 50-70 °. (B) el FBA promedio de ratones 1 semana después de la lesión es de 90-110 °. La recuperación funcional se denota por una reducción en el grado de este ángulo. (C) La prueba de agarre con lápiz mide la PLR en una lesión previa del ratón, donde ambas extremidades se extienden de manera similar, dando una proporción de 1. (D) el PLR en un ratón 1 semana después de la lesión muestra la disparidad en la protracción de la extremidad debido a una lesión, lo que resulta en un PLR>1. (E) el FBA durante un período de 15 semanas después de la inserción quirúrgica de conductos no porosos de PE (NP-PE), conductos porosos E10-0,5(1K) [P-E10-0,5(1K)] y conductos no porosos de E10-0,5(1K) [NP-E10-0,5(1K)] rellenos con solución salina. (F) Índice de recuperación del FBA en la semana 15. Cada punto representa un animal. (G) PLR para todas las condiciones. (H) Índice de recuperación para PLR en la semana 15. (\*p <0,001, análisis de varianza de una vía con la prueba post hoc de Tukey).

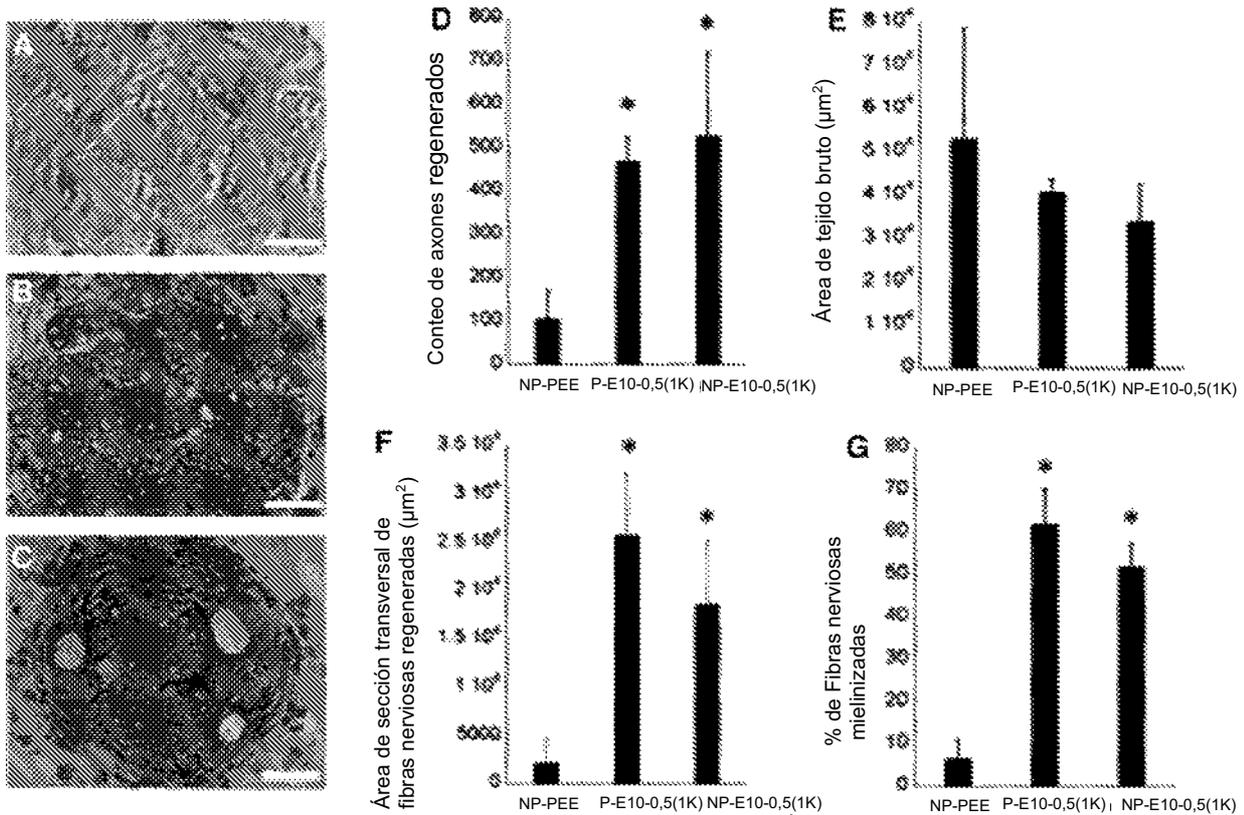


Figura 6 Análisis histomorfométrico de nervios femorales regenerados en conductos E10-0,5(1K) y conductos NP-PE. (A-C) Imágenes representativas de sección transversal (40x, barra de escala: 50 µm) de secciones nerviosas teñidas con azul de toluidina desde el punto medio del nervio femoral regenerado después de la tubulización con (A) conductos no porosos PE (NP-PE), (B) conductos porosos E10-0,5(1K) [P-E10-0,5(1K)], o (C) conductos no porosos E10-0,5(1K) [NP-E10-0,5(1K)]. (D) Recuento de axones de axones mielinizados en el cable de regeneración en la sección del nervio del conducto medio para cada tipo de conducto. (E) Área de tejido bruto. (F) Área de sección transversal de fibras nerviosas regeneradas. (G) % de fibras nerviosas mielinizadas en el cable nervioso en regeneración. \* Diferencia significativa entre los valores medios de grupo de NP-PE ( $p < 0,05$ , análisis de varianza de una vía con la prueba post hoc de Tukey).

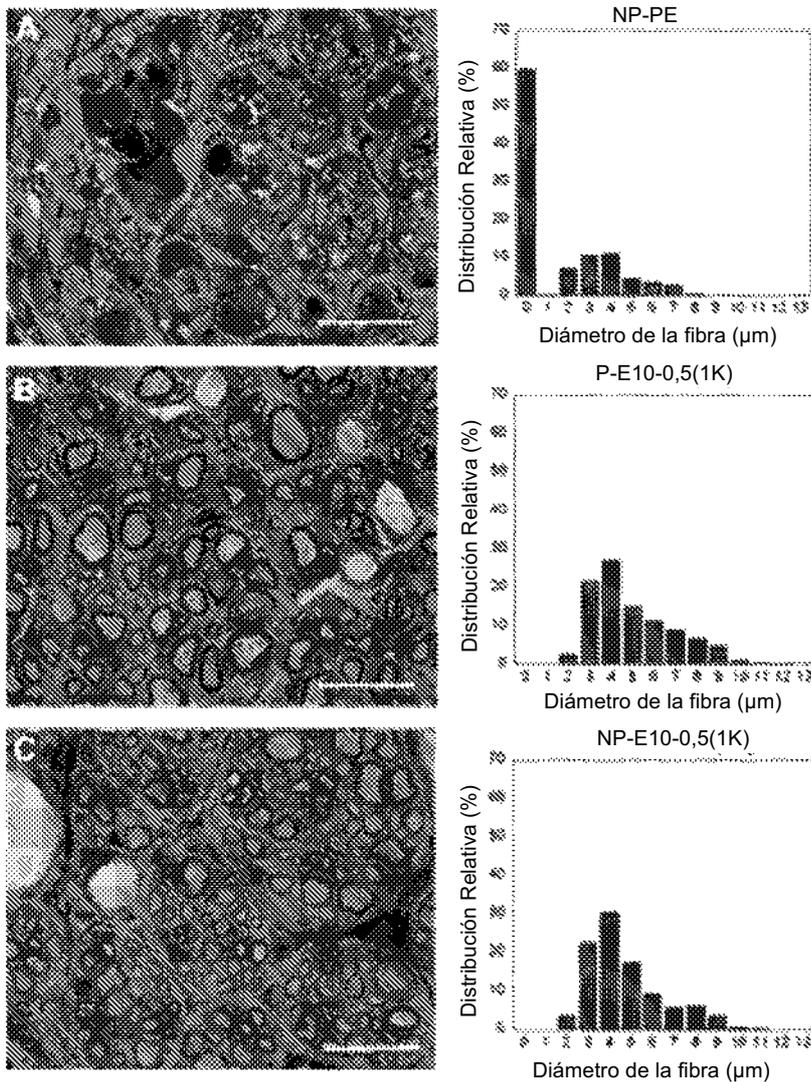


Figura 7 Secciones nerviosas representativas y análisis del diámetro de la fibra. Imágenes representativas de la sección transversal (100x, Escala: 20 mm) de secciones nerviosas teñidas con azul de toluidina desde el punto medio del nervio femoral regenerado e histograma de la distribución relativa del diámetro de la fibra nerviosa después de la tubulización con (A) conductos no porosos PE (NP-PE), (B) conductos porosos E10-0,5(1K) [P-E10-0,5(1K)], o (C) conductos no porosos E10-0,5(1K) [NP-E10-0,5(1K)]. Los histogramas del diámetro de la fibra revelan un número reducido de axones pequeños y un mayor número de axones más grandes en animales tratados con conductos E10-0,5 (1K) en comparación con los animales tratados con conductos NP-PE. Hubo una distribución relativa estadísticamente más alta (%) de diámetros de fibra de 4, 5, 6, 7 y 8 mm en conductos P-E10-0,5(1K) y NP-E10-0,5(1K) en comparación con conductos NP-PE. ( $p < 0.05$ , análisis de varianza de una vía con la prueba post hoc de Tukey).

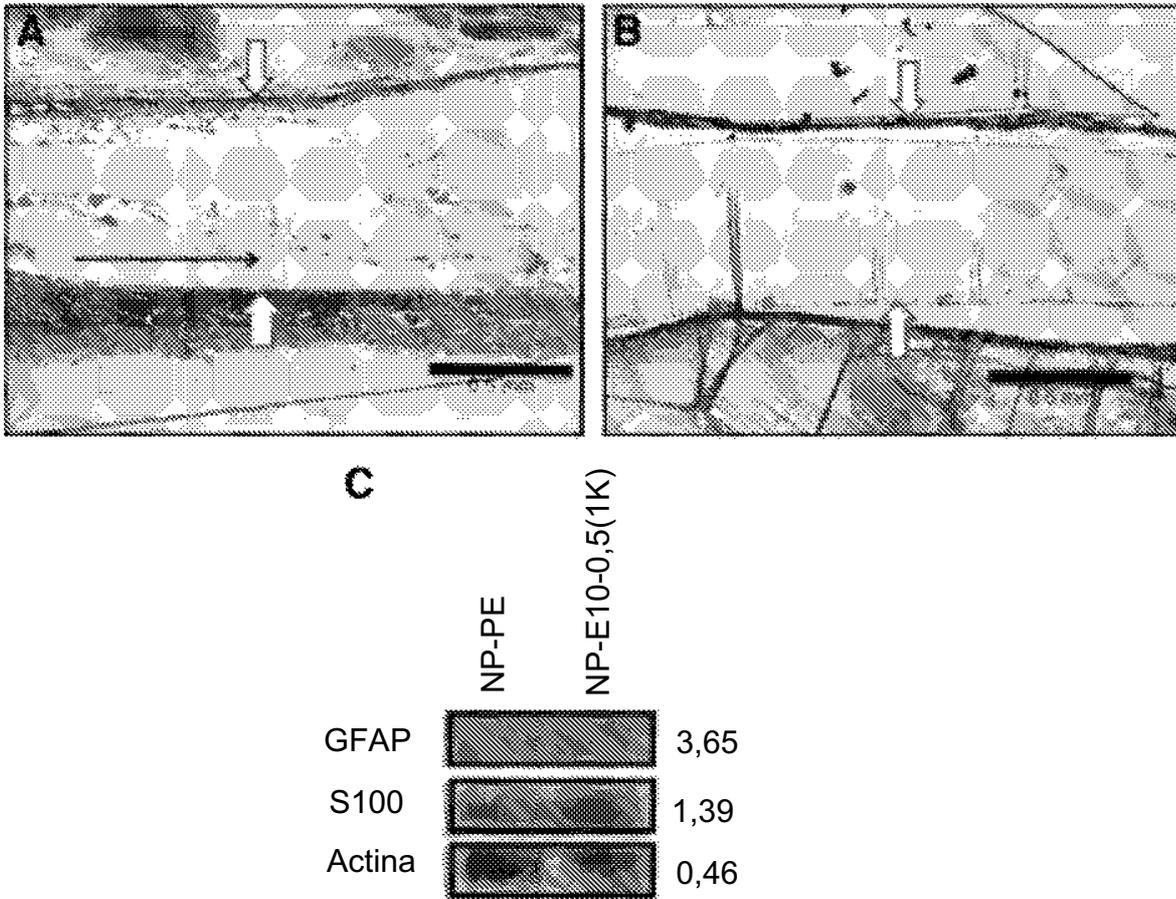


Figura 8 Primeras diferencias en la reparación nerviosa entre los materiales del conducto. (A) y (B) muestran imágenes representativas de secciones longitudinales de la matriz de fibrina acelular dentro de los conductos a las 2 semanas después de la implantación. (A) La matriz natural encontrada en los conductos E10-0,5(1K). (B) La matriz presente en los conductos NP-PE. Los polímeros que comprenden la matriz de fibrina natural en el E10-0,5(1K) tenían una orientación longitudinal predominante (flecha negra en A), mientras que no se observaron hebras de fibrina en los conductos NPPE. Las flechas blancas marcan los bordes del lumen interno dentro de cada tipo de conducto. Barra de escala: 0,5 mm. (C) Análisis de *Western blot* representativo de S100b y proteína ácida fibrilar glial (GFAP) colectada de exudados de conductos no porosos E10-0,5 (1K) y NP-PE 1 semana después de la implantación. Los valores a la derecha de las bandas indican densidades ópticas relativas de las bandas (NP-E10-0,5(1K)/NPPE).