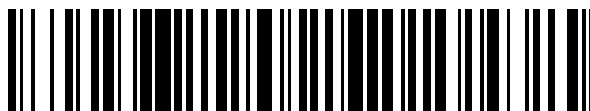


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 787 009**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/24** (2006.01)

**A61L 27/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2016 PCT/EP2016/081928**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.06.2017 WO17108794**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2016 E 16819536 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2020 EP 3393534**

54 Título: **Un material composite de hidrogel de colágeno, un dispositivo oftálmico implantable que comprende dicho material y procedimientos de producción del material composite de hidrogel de colágeno y el dispositivo oftálmico implantable**

30 Prioridad:

**22.12.2015 SE 1551698**

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

**14.10.2020**

73 Titular/es:

**LINKOCARE LIFE SCIENCES AB (100.0%)  
Teknikringen 10  
583 30 Linköping, SE**

72 Inventor/es:

**RAFAT, MEHRDAD**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 787 009 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

Un material composite de hidrogel de colágeno, un dispositivo oftálmico implantable que comprende dicho material y procedimientos de producción del material composite de hidrogel de colágeno y el dispositivo oftálmico implantable

**Campo técnico**

- 5 La divulgación se refiere a un material composite de hidrogel de colágeno para uso en ingeniería de tejidos y un dispositivo oftálmico implantable que comprende tal material. La divulgación también se refiere a procedimientos de producción del material composite de hidrogel de colágeno y el dispositivo oftálmico implantable.

**Antecedentes**

- 10 Los tejidos u órganos lesionados y enfermos han sido tradicionalmente tratados o reemplazados por injertos autólogos, injertos alogénicos o biomateriales sintéticos o de base natural. Sin embargo, existe una gran escasez mundial de injertos de tejido. Los injertos de tejido del donante también pueden causar morbilidad en el sitio del donante y pérdida de la funcionalidad del órgano, y los injertos alogénicos están asociados con el riesgo de transmisión de la enfermedad y a menudo requieren el uso de fármacos inmunosupresores. En cuanto a los biomateriales sintéticos, aunque muchos de ellos han logrado un uso clínico generalizado, aún persisten problemas de respuesta inmunológica y de integración perfecta. Estos problemas han llevado al cambio de paradigma más reciente al desarrollo de biomateriales y dispositivos diseñados por ingeniería tisular que imitan la matriz extracelular (ECM) del tejido natural para la ingeniería de tejidos. Para que estos biomateriales tengan éxito, deben ser mecánicamente robustos y elásticos para soportar y mantener la estructura del tejido, y amigables con las células y biointeractivos para permitir una integración perfecta entre el huésped y el biomaterial que ayuda a restaurar la funcionalidad del tejido.
- 15
- 20 Los colágenos son una familia de macromoléculas de ECM dentro del cuerpo que contribuyen tanto a las propiedades mecánicas como a la función biológica de diversos tipos de tejidos tales como córnea, piel, hueso, tendones, ligamentos, vasos sanguíneos y el corazón. Aunque es muy robusto *in vivo*, el colágeno extraído se degrada rápidamente y carece de tenacidad mecánica y elasticidad, debido a la disociación de los enlaces cruzados naturales durante el procedimiento de aislamiento y purificación.
- 25 Las técnicas de reticulación química actuales a menudo dan como resultado andamios a base de colágeno que son demasiado blandos o demasiado frágiles, que no son lo suficientemente robustos como para resistir las manipulaciones quirúrgicas o que no interactúan activamente con las células y tejidos del cuerpo. Existe, por consiguiente, una necesidad de andamios de colágeno mejorados que sean implantables para aplicaciones de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.
- 30 En el área del trasplante de córnea existe una necesidad insatisfecha de una alternativa a las córneas de los donantes. Las córneas artificiales protésicas, las terapias basadas en células y las terapias basadas en andamios se han seguido rigurosamente, pero su uso clínico se ha limitado debido a desafíos que incluyen: falta de integración en el tejido circundante; fuentes celulares limitadas y funcionalidad; interacción ineficiente con las células huésped e incapacidad de administrar fármacos terapéuticos, respectivamente. Se ha informado el trasplante a base de colágeno libre de células en córneas humanas enfermas y animales. Estos andamios reemplazan la matriz extracelular o el estroma, permitiendo que las células y los nervios del huésped eventualmente crezcan sobre y alrededor del andamio. Sin embargo, en condiciones de cegamiento de la córnea, tales como la deficiencia de células madre epiteliales del limbo (LSCD, heridas inducidas por quemaduras o infección que provoca inflamación y neovascularización, el uso de un andamio estromal solo (humano o ingeniería de tejidos) es insuficiente: la deficiencia subyacente de células madre, la inflamación y/o la neovascularización también deben abordarse para evitar una posible falla del injerto. Para los pacientes con LSCD, primero se requiere el trasplante de injertos limbares o células madre epiteliales limbares expandidas *ex vivo*. Después de la restauración limbar, el trasplante central (queratoplastia) sigue a tratar la cicatrización en el eje visual. Cuando la cicatrización corneal se complica con neovascularización corneal y/o infecciones graves tales como la queratitis por herpes simple (HSK), los agentes antiinflamatorios, antiangiogénicos, antimicrobianos o antivirales se administran junto con el tratamiento con corticosteroides estándar después (o antes) de las queratoplastias de alto riesgo. Estos regímenes terapéuticos se administran más comúnmente por vía tópica con el principal desafío de la baja penetración del fármaco a través del epitelio corneal. La difusión limitada a través de la córnea y el aumento del lavado a través del drenaje lagrimal dan como resultado una baja biodisponibilidad de 1-7 % para la mayoría de los fármacos aprobados. Nuevas rutas de administración, e idealmente un suministro de liberación controlada de fármacos y células a través de implantes poliméricos biodegradables, conducirían a mayores tasas de éxito del trasplante corneal en estas córneas inflamadas severas.
- 40
- 45
- 50
- 55 En estas aplicaciones de alto riesgo, los implantes de bioingeniería son necesarios no solo como andamios transparentes y robustos para reemplazar el tejido corneal enfermo, sino también para administrar agentes terapéuticos o células madre en la córnea. Estos requisitos podrían ser opuestos: la liberación de células o sustancias requiere un cierto grado de biodegradación, sin embargo, esto podría comprometer la transparencia óptica y la integridad corneal. Además, los requisitos de transparencia y no toxicidad de los biomateriales pueden complicar la capacidad de encapsular, administrar y controlar las células y la liberación de sustancias terapéuticas *in vivo*. El documento WO 2009/156866 revela un implante que comprende una capa porosa de colágeno reticulado, una capa

no porosa de colágeno y un miembro de refuerzo que es una malla recubierta con colágeno. El miembro de refuerzo está embebido en dicha capa no porosa.

### Sumario

5 Un objeto de la presente invención es proporcionar un material composite de hidrogel de colágeno para su uso en ingeniería de tejidos que supere o al menos alivie algunas de las desventajas con los andamios de colágeno conocidos. Otros objetivos son proporcionar un dispositivo oftálmico implantable que comprenda dicho material composite de hidrogel de colágeno y proporcionar procedimientos de producción del material composite de hidrogel de colágeno y el dispositivo oftálmico implantable.

10 La invención se define por las reivindicaciones independientes adjuntas. Las realizaciones se exponen en las reivindicaciones dependientes adjuntas y en las figuras.

15 Según un primer aspecto, se proporciona un material composite de hidrogel de colágeno para uso en ingeniería de tejidos, que comprende una primera red de colágeno que comprende colágeno reticulado con un primer agente de reticulación, y/o una segunda red de colágeno que comprende colágeno reticulado con un segundo agente de reticulación, y una malla de colágeno tridimensional que comprende hidrogel de colágeno comprimido parcial y plásticamente con un grado de compresión del 50-95 %, en el que la malla de colágeno tridimensional está embebida en la primera red de colágeno y/o segunda red de colágeno, y la primera red de colágeno y/o la segunda red de colágeno y la malla de colágeno tridimensional están interconectadas física y químicamente en el material composite de hidrogel de colágeno.

20 La primera red de colágeno y/o la segunda red de colágeno y la malla de colágeno tridimensional están interconectadas físicamente a través de la penetración de la (s) red (es) reticulada (s) en la malla de colágeno tridimensional y también reticuladas químicamente a través de enlaces covalentes entre fibrillas de colágeno en la (s) red (es) de colágeno reticulado (s) y fibrillas en la malla de colágeno tridimensional. Los constituyentes del material composite, esto es, la primera red de colágeno reticulado y/o la segunda red de colágeno reticulado y la malla de colágeno tridimensional forman un material composite combinado sin interfaces distintas entre los constituyentes.

25 Hay una transición suave entre los constituyentes del material, creando una apariencia homogénea. En otras palabras, no se puede distinguir una interfase de fase distinta entre los constituyentes en el material composite.

Cuando se ve una vista lateral en sección transversal del material composite de hidrogel de colágeno, la malla de colágeno tridimensional embebida puede estar ubicada centralmente o descentralizada, esto es, ubicada más cerca de una superficie del material composite.

30 El material composite podría comprender una primera red de colágeno reticulado y la malla de colágeno tridimensional, la segunda red de colágeno reticulado y la malla de colágeno tridimensional o la primera red de colágeno reticulado, la segunda red de colágeno reticulado y la malla de colágeno tridimensional.

El primer y segundo agente de reticulación puede ser el mismo agente de reticulación. Alternativamente, el primer y segundo agente de reticulación pueden ser diferentes agentes de reticulación.

35 Con "material de hidrogel" se entiende aquí una red de colágeno que exhibe la capacidad de hincharse en agua o solución acuosa sin disolución, reteniendo una porción significativa de agua o solución acuosa dentro de su estructura.

Con "malla de colágeno tridimensional" se entiende aquí una red de malla de colágeno tridimensional (no reticulada).

40 En la primera y segunda redes de colágeno reticulado se forman puentes intra e intercadena entre/dentro de las moléculas de colágeno y las fibrillas. Estos enlaces cruzados y los interenlaces entre la malla tridimensional y la primera y/o segunda red de colágeno reticulado hicieron posible mejorar simultáneamente la resistencia mecánica y la elasticidad al tiempo que conservan las características biológicas (amigables con las células y no tóxicas *in vitro* e *in vivo*). El nuevo material composite de hidrogel de colágeno es, por consiguiente, biocompatible, fuerte, elástico, mantiene suturas y, por lo tanto, implantable.

45 Al variar el grado de reticulación de la primera y/o segunda red de colágeno y el contenido de colágeno en la (s) red (es) de colágeno reticulado (s) y la malla de colágeno tridimensional, la porosidad del material composite y la velocidad de degradación del material puede ser sintonizado.

50 Con una malla de colágeno tridimensional que comprende hidrogel de colágeno comprimido parcial y plásticamente con un grado de compresión del 50-95 % se entiende aquí que el hidrogel de colágeno (sin ningún agente de reticulación) ha sido sometido a una fuerza/tensión de compresión mecánica para expulsar intersticial fluido del hidrogel. Tal fluido no es parte de la estructura del colágeno, sino que es el resultado de la fundición del hidrogel, esto es, el gel de colágeno se forma, por ejemplo, incubando una solución de colágeno a una temperatura elevada (tal como 37 °C). Los monómeros de colágeno luego se polimerizan en fibrillas. Hay transición de fase y se forma una red semisólida de fibrillas que soportan el líquido intersticial restante que da como resultado la formación de gel.

La compactación controlada, la tensión de compresión, se puede aplicar a las superficies superior y/o inferior del hidrogel que expulsa el fluido intersticial del gel de modo que la altura/volumen del gel se reduzca en un 50-95 %, formando la malla de colágeno tridimensional.

5 En un ejemplo no limitante, la altura del gel antes de la compresión plástica es de 1000  $\mu\text{m}$  y después de la compresión de 100  $\mu\text{m}$ , esto es, un grado de compresión del 90 %.

El gel de colágeno antes de la compresión comprende fibrillas en un líquido intersticial. El gel de colágeno es isotrópico y las fibras de colágeno están orientadas aleatoriamente.

10 A través de la compresión plástica del hidrogel, el gel se deforma para reducir su altura/volumen, de modo que el gel retiene o retiene sustancialmente su nueva altura/volumen después de eliminar la causa de la compactación. La compresión plástica de un gel de colágeno reduce la distancia entre las fibrillas de colágeno y aumenta el número de puntos de contacto entre las fibrillas adyacentes en el hidrogel, formando un hidrogel de malla tridimensional.

15 Con un bajo grado de compresión (por ejemplo, una reducción de volumen/altura del 50 %), el hidrogel tiene una densidad de colágeno global similar al tejido pero la estructura de la lámina está cada vez menos definida a medida que disminuye el grado de compresión, esto es, todo se une en un grado similar y la variación a través del eje de compresión se hace cada vez más pequeña y más pequeña en la misma escala de longitud.

Con un alto grado de compresión (por ejemplo, una reducción de volumen/altura del 95 %), existe una mayor heterogeneidad estructural a través del eje de compresión y se crea un gradiente de fluido intersticial con la concentración más baja en la superficie de compresión.

20 Si la malla tridimensional está completamente comprimida, esto es, cerca de un grado de compresión del 100 %, no será lo suficientemente porosa como para permitir la penetración de la primera y segunda redes reticuladas, dando como resultado una malla frágil bidimensional.

La compresión parcial (reducción de volumen del 50-95 %) del hidrogel produce redes de malla de colágeno tridimensionales más densas con una arquitectura más parecida a un tejido y propiedades mecánicas más fuertes que los hidrogeles de colágeno no comprimidos y no reticulados.

25 La malla tridimensional producida por compresión parcial es más elástica que la producida por compresión total.

El nivel de compresión se puede ajustar para obtener una velocidad de degradación específica *in vitro* e *in vivo*. Cuanto mayor es el nivel de compresión, más lenta es la tasa de degradación de la malla.

30 La velocidad de compresión debe ser lo suficientemente lenta (por ejemplo, 10 mm/s) para evitar la fibrilación de colágeno (formación prematura de fibrillas y precipitación de la solución) y lo suficientemente rápida como para evitar el secado del hidrogel.

La malla de colágeno tridimensional actúa como una red de soporte embebida y fusionada con la primera o segunda red (es), minimizando las lágrimas prematuras o la rotura del andamio cuando se somete a fuerzas externas tales como suturas.

35 Una de las principales ventajas del material composite de hidrogel de colágeno descrito anteriormente en comparación con los andamios de bioingeniería existentes es que tiene múltiples funcionalidades y cumple requisitos esenciales tales como la administración de células y terapias y la integridad del andamio que a menudo son opuestas. Por ejemplo, en las aplicaciones y pacientes de alto riesgo, los implantes de bioingeniería son necesarios no solo como andamios robustos para reemplazar el tejido enfermo, sino también para administrar terapias o células madre en el tejido circundante. Por ejemplo, la liberación de células o sustancias requiere un grado de biodegradación, sin embargo, esto podría comprometer otras propiedades tales como la transparencia óptica y la integridad del tejido. Además, los requisitos de transparencia y no toxicidad de los biomateriales pueden complicar la capacidad de encapsular, administrar y controlar las células y la liberación de sustancias terapéuticas *in vivo*.

40 El hidrogel de colágeno comprimido parcial y plásticamente puede tener un grado de compresión del 55-90 %, preferiblemente del 60-85 %.

45 Para las mismas concentraciones iniciales de colágeno, cuanto mayor es el grado de compresión (cuanto más líquido se elimina), más densa y menos porosa se vuelve la malla de colágeno tridimensional. Esto puede dar como resultado una malla de colágeno tridimensional frágil y puede evitar la penetración de las redes de colágeno primera y segunda en la malla de colágeno tridimensional. Esto puede reducir la homogeneidad del material composite y disminuir la robustez mecánica y las características de capacidad para suturar del material.

50 El colágeno de la primera y/o segunda red y la malla de colágeno tridimensional se pueden seleccionar de un grupo que consiste en colágeno tipo I, colágeno tipo II, colágeno tipo III, colágeno tipo IV, colágeno tipo V, colágeno tipo VI y colágeno desnaturalizado de origen animal y colágenos recombinantes humanos.

La primera y/o segunda red de colágeno y la malla de colágeno tridimensional pueden comprender el mismo tipo de colágeno.

5 Esto da como resultado una buena coincidencia de materiales entre diferentes componentes. Este fenómeno elimina el desajuste de los materiales y mejora la homogeneidad, y la difusión de los componentes estructurales que mantienen juntas diferentes formas de colágeno, lo que da como resultado una distribución y manipulación de carga mejoradas durante la implantación.

En un ejemplo no limitante, la (s) red (es) de colágeno reticulado y la malla de colágeno tridimensional comprende colágeno tipo I.

El contenido de colágeno en la primera y/o segunda red de colágeno puede ser 1-50 %, preferiblemente 10-20 %.

10 Una amplia gama de concentraciones de colágeno proporciona una herramienta para modular las propiedades del andamio tales como resistencia mecánica, biodegradabilidad, porosidad y permeabilidad hacia nutrientes y metabolitos e interacción celular.

15 El primer y/o segundo agente de reticulación puede ser un agente de reticulación de carbodiimida de corto alcance no polimérico seleccionado de un grupo que comprende clorhidrato de etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC), metyoduro de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDCM), dicitclohexil-carbodiimida (DCC), N-hidroxisuccinimida (NHS) y combinaciones de los mismos.

20 El primer y/o segundo agente de reticulación puede ser un agente de reticulación multifuncional de tipo amina de largo alcance polimérico que comprende reticuladores multifuncionales de tipo amina de la familia de polietilenglicol (PEG), seleccionados de un grupo que comprende PEG succinimidil éster (NHS-PEG-NHS) PEG succinimidil NHS éster multibrazo, poli(etilenglicol) dialdehído (PEG-DA), polietilenglicol dibutilaldehído, polietilenglicol diacrilato y combinaciones de los mismos.

Cuando se usan dos redes de colágeno reticulado, el primer agente de reticulación puede ser un agente de reticulación de carbodiimida de corto alcance y el segundo agente de reticulación puede ser un agente de reticulación polimérico de largo alcance.

25 Los agentes de reticulación de las dos redes reticuladas deberían ser preferiblemente diferentes. La combinación de reticuladores de corto alcance y largo alcance produce efectos sinérgicos sobre la resistencia mecánica y la elasticidad. Los enlaces cruzados de corto alcance conectan las fibrillas de colágeno que se encuentran próximas entre sí para mejorar la resistencia del andamio, lo que puede reducir la elasticidad, mientras que los enlaces cruzados de largo alcance conectan las fibrillas de colágeno que están más lejos entre sí, lo que mejora los enlaces cruzados intermolecular/interfibrilar dando lugar a una robustez y elasticidad significativamente mejoradas simultáneamente.

30 El pH de la primera y/o segunda red de colágeno puede ser ácido, pH 3-6, y el pH de la malla de colágeno tridimensional puede ser neutro, aproximadamente pH 7.

El pH juega un papel clave en la eficiencia de reticulación y, por lo tanto, es una herramienta para controlar el gradiente de degradación dentro del material composite de hidrogel de colágeno.

35 Se pueden formar gradientes de pH en el material composite con el pH más alto en el centro de la malla de colágeno tridimensional.

Una proporción molar de la primera red de colágeno reticulado a la segunda red de colágeno reticulado en el material composite de hidrogel de colágeno puede ser 1:1 a 1:5, o 1:1 a 100:1.

40 La amplia gama de proporciones de reticuladores proporciona una buena herramienta de diseño para personalizar las características de los andamios.

La proporción molar del primer agente de reticulación a colágeno en la primera red de colágeno reticulado puede ser 0,5:1 a 3:1, preferiblemente 1:1.

El grado de reticulación depende de la proporción de colágeno a agente de reticulación.

45 La proporción molar del segundo agente de reticulación a colágeno en la segunda red de colágeno reticulado puede ser de 0,1:1 a 2:1, preferiblemente 0,5:1.

El contenido de colágeno de la malla de colágeno tridimensional puede ser 0,1-20 %, preferiblemente 0,5-10 % o 1-5 %.

Un contenido de colágeno más bajo en la malla de colágeno tridimensional puede dar como resultado una malla de colágeno tridimensional menos estable y, por consiguiente, un material composite menos estable.

La proporción del contenido de colágeno en la malla de colágeno tridimensional al contenido de colágeno en la primera y/o segunda red de colágeno puede ser 1:50, preferiblemente 1:40 o 1:30.

La malla de colágeno tridimensional se puede cargar con células, factores de tejido, factores de crecimiento, agentes bioactivos y fármacos.

- 5 La malla de colágeno tridimensional se puede impregnar con células viables antes de la compresión, de modo que las células estén contenidas dentro del gel de colágeno. El grado de compresión se puede adaptar para minimizar el daño celular.

- 10 La malla de colágeno tridimensional puede ser esencialmente transparente con una transmisión de luz de más del 80 %, esencialmente translúcida con una transmisión de luz de más del 20 % y menos del 80 %, o esencialmente opaca con una transmisión de luz de menos del 20 %

El composite descrito anteriormente se puede usar en dispositivos oftálmicos, reemplazo de piel, reparaciones de la pared cardíaca o aplicaciones de parches cardíacos, o reparación de la pared abdominal débil.

La reparación de la pared abdominal débil puede ser, por ejemplo, la reparación de una hernia.

- 15 Según un segundo aspecto, se proporciona un dispositivo oftálmico implantable que comprende una primera y una segunda región, en el que la primera región comprende el material composite de hidrogel de colágeno descrito anteriormente, y la segunda región comprende un hidrogel de colágeno reticulado esencialmente transparente que comprende las mismas primera y/o segunda redes de colágeno reticulado como el material composite de hidrogel, en el que las regiones primera y segunda son regiones interconectadas conectadas a través de las primera y/o segunda redes de colágeno reticulado.

- 20 Con hidrogel de colágeno reticulado esencialmente transparente se entiende aquí que hay al menos un 80 % de transmisión de luz blanca a través de la primera porción del dispositivo oftálmico y menos del 10 % de dispersión de luz.

- 25 El hecho de que la primera y segunda regiones sean regiones interconectadas conectadas a través de la primera y/o segunda red de colágeno reticulado significa que hay una transición suave entre la primera y segunda regiones adyacentes del dispositivo debido a la presencia de la (s) misma (s) red (es) de colágeno reticulado en ambas regiones.

La segunda región puede restaurar la transparencia corneal, mientras que la primera región puede servir como depósito para células y fármacos para asegurar la supervivencia de un dispositivo implantado.

- 30 La lágrima y la rotura en la interfase entre la primera y la segunda región pueden ser bajas debido a la homogeneidad entre la primera y la segunda región, esto es, la primera y la segunda región contienen la (s) misma (s) red (es) de colágeno reticulado.

La primera región puede distribuir suavemente las cargas mecánicas y la tensión de cizalladura debido a, por ejemplo, la sutura y las fuerzas mecánicas ejercidas sobre el dispositivo.

- 35 El dispositivo oftálmico implantable es un dispositivo que es elástico y suturable, debido a la presencia de la primera región. La primera región puede sostener suturas mejor que la segunda región ya que es posible hacer más elástica que la segunda región, debido a la presencia de la malla de colágeno tridimensional.

El dispositivo oftálmico implantable puede ser más robusto mecánicamente que los implantes oftálmicos de la técnica anterior sin regiones primera y segunda, que solo comprenden una región correspondiente a la segunda región del presente dispositivo. La primera región distribuye suavemente las cargas mecánicas y la tensión de cizalladura debido a la sutura y las fuerzas mecánicas después de la cirugía causadas por el parpadeo o el trauma externo.

- 40 La primera región se puede cargar con células, factores de tejido, factores de crecimiento, agentes bioactivos y fármacos que se pueden administrar al área de implantación mejorando y aumentando la regeneración de tejido. La primera región también puede reclutar células del estroma del huésped que bloquean el dispositivo en su lugar, mientras que la segunda región tiene una integridad y transparencia mantenidas. Para inducir la regeneración tisular, debe estar presente la tríada de ingeniería tisular (biomateriales, células y moléculas de señalización tales como factores de crecimiento y fármacos terapéuticos). Este nuevo diseño de andamio cumple con este requisito crucial.

- 45 Las combinaciones de enlaces cruzados de corto alcance y largo alcance y los interenlaces de malla de hidrogel hicieron posible mejorar simultáneamente la resistencia mecánica y la elasticidad al tiempo que conservan las características biológicas (amigables con las células y no tóxicas *in vitro* e *in vivo*) y sin comprometer la claridad óptica en la segunda región. El nuevo andamio es biocompatible, fuerte, elástico, sujeta suturas y, por lo tanto, implantable por queratoplastia penetrante, y es superior a las córneas de bancos de ojos humanos en claridad óptica.

- 50 Se pueden formar gradientes de pH en el material composite con el pH más alto en el centro de la malla de colágeno tridimensional y el pH más bajo en el centro de la región sin malla.

Los andamios corneales basados en colágeno libres de células de la técnica anterior permiten que las células huésped y los nervios eventualmente crezcan sobre y alrededor del andamio. Sin embargo, en condiciones cegadoras de la córnea, tal como la deficiencia de células madre epiteliales del limbo (LSCD), heridas inducidas por quemaduras o infección que conduce a inflamación y neovascularización, el uso de un andamio estromal solo es insuficiente: la deficiencia subyacente de células madre, inflamación y/o la neovascularización también se debe abordar para evitar la eventual falla del injerto. Para los pacientes con LSCD, primero se requiere el trasplante de injertos limbares o células madre epiteliales limbares expandidas *ex vivo*. Después de la restauración limbar, sigue el trasplante central (queratoplastia) para tratar la cicatrización en el eje visual. Cuando la cicatrización corneal se complica con la neovascularización corneal y/o infecciones graves tales como la queratitis por herpes simple (HSK), se administran agentes antiinflamatorios, antiangiogénicos, antimicrobianos o antivirales junto con el tratamiento con corticosteroides estándar después (o antes) de queratoplastias de alto riesgo. Estos regímenes terapéuticos se administran comúnmente por vía tópica con el principal desafío de la baja penetración del fármaco a través del epitelio corneal. La difusión limitada a través de la córnea y el aumento del lavado a través del drenaje lagrimal dan como resultado una baja biodisponibilidad de 1-7 % para la mayoría de los fármacos aprobados. Nuevas rutas de administración, e idealmente un suministro de liberación controlada de fármacos y células a través de implantes poliméricos biodegradables, conducirían a mayores tasas de éxito del trasplante corneal en estas córneas inflamadas severas.

En estas aplicaciones de alto riesgo, los implantes de bioingeniería son necesarios no solo como andamios transparentes y robustos para reemplazar el tejido corneal enfermo, sino también para administrar agentes terapéuticos o células madre en la córnea. Estos requisitos podrían ser opuestos: la liberación de células o sustancias requiere un cierto grado de biodegradación, sin embargo, esto podría comprometer la transparencia óptica y la integridad corneal. Además, los requisitos de transparencia y no toxicidad de los biomateriales pueden complicar la capacidad de encapsular, administrar y controlar las células y la liberación de sustancias terapéuticas *in vivo*.

El dispositivo oftálmico implantable descrito anteriormente, por consiguiente, es una solución a este problema ya que la segunda región del dispositivo puede funcionar como un sustituto del estroma corneal y la primera región como un depósito biodegradable para fármacos y células terapéuticas. La segunda región es un hidrogel de colágeno reticulado transparente y estable y la primera región es una malla de colágeno tridimensional comprimida mecánicamente embebida en la red de colágeno reticulado de la segunda región.

Este diseño permite que la primera región se degrade más rápido que la segunda región, por lo tanto, hace que la capacidad del composite de liberación lenta de células/fármacos.

El contenido de colágeno, el grado de reticulación y el agente de reticulación de las primera y/o segunda redes de colágeno reticulado de la primera y segunda región pueden ser los mismos. La primera y segunda regiones pueden tener una tasa de degradación *in vitro* diferente medida por la degradación de colagenasa, en el que la primera región se puede degradar de 2-100 veces más rápido que la segunda región.

La primera y segunda regiones pueden tener una velocidad de degradación diferente *in vivo*, en el que la primera región se puede degradar de 2 a 100 veces más rápido que la segunda región. La tasa de degradación *in vivo* se puede rastrear trazando la malla opaca visible dentro del dispositivo oftálmico implantado.

El gradiente de degradación en la primera y segunda regiones se puede crear para facilitar la encapsulación y liberación de células y agentes terapéuticos en la primera región mientras se mantiene un andamio estable en la segunda región como un reemplazo de tejido y soporte mecánico para los tejidos circundantes. El gradiente de velocidad de degradación ascendente desde la segunda región hacia la primera región se puede lograr usando colágenos en diferentes formas, con diferentes acidez y con diferentes proporciones de reticulación en la primera y segunda regiones.

El dispositivo oftálmico implantable puede ser un implante corneal onlay, corneal inlay, o corneal de espesor total.

Un "corneal onlay" es aquí un dispositivo oftálmico configurado, en tamaño y forma, para ubicarse entre el epitelio o una capa de células epiteliales y la membrana de Bowman en un ojo, de un humano o animal. Un corneal onlay puede descansar completamente sobre la membrana de Bowman, o puede incluir una o más porciones que se extienden dentro de la membrana de Bowman.

Un "corneal inlay" es un dispositivo o implante configurado para colocarse en el estroma de un ojo. Los corneales inlay se pueden colocar en el estroma formando un colgajo o una bolsa en el estroma. Los corneales inlay se colocan debajo de la membrana del ojo de Bowman.

Un "implante corneal de espesor total" se refiere a un dispositivo que está configurado para reemplazar todo o parte de una córnea no saludable de un ojo situado anterior al humor acuoso del ojo.

La primera región se puede colocar en un área periférica del dispositivo. Puede verse como un área del faldón. En la aplicación corneal, la segunda región puede ser una región central y la primera región una región periférica, que rodea la segunda región.

La primera región puede contener suturas mejor que la segunda región.

Según un tercer aspecto, se proporciona un procedimiento de producción de un material composite de hidrogel de colágeno, que comprende las etapas de: formación de una primera red de colágeno en forma líquida, la red de colágeno que comprende colágeno reticulado con un primer agente de reticulación, y/o formación de una segunda red de colágeno en forma líquida, la red de colágeno comprende colágeno reticulado con un segundo agente de reticulación, formación de una malla de colágeno tridimensional por compresión plástica parcial de un hidrogel de colágeno a un grado de compresión del 50-95 %, y moldeo por compresión simultánea de la primera red de colágeno y/o la segunda red de colágeno y la malla de colágeno tridimensional para formar un material composite de hidrogel de colágeno interconectado física y químicamente, en el que la malla de colágeno tridimensional está embebida en la primera red de colágeno y/o segunda red de colágeno.

Con simultáneo se entiende aquí que todas las redes se forman al mismo tiempo.

La primera región puede ser esencialmente transparente con una transmisión de luz de más del 80 %, esencialmente translúcida con una transmisión de luz de más del 20 % y menos del 80 %, o esencialmente opaca con una transmisión de luz de menos del 20 %.

Si la primera región es no transparente pero al menos parcialmente opaca, puede ser posible rastrear un dispositivo implantado *in vivo* y no de forma invasiva.

Según un cuarto aspecto, se proporciona un procedimiento de producción de un dispositivo oftálmico implantable, que comprende las etapas de: formación de una primera red de colágeno en forma líquida, la red de colágeno que comprende colágeno reticulado con un primer agente de reticulación, y/o formación de una segunda red de colágeno en forma líquida, la red de colágeno comprende colágeno reticulado con un segundo agente de reticulación, formación de una malla de colágeno tridimensional por compresión plástica de un hidrogel de colágeno a un grado de compresión del 50-95 %, eliminando área (s) de material a partir de la malla de colágeno tridimensional formada, y el moldeo por compresión simultánea de la primera red de colágeno y/o la segunda red de colágeno y la malla de colágeno tridimensional con el área o las áreas eliminadas para formar un dispositivo oftálmico implantable que comprende una primera región que comprende material composite de hidrogel de colágeno física y químicamente interconectado, en el que la malla de colágeno tridimensional está embebida en la primera red de colágeno reticulado y/o la segunda red de colágeno reticulado, y (a) la segunda región o regiones libres de malla, que corresponden al área o las áreas eliminadas de la malla de colágeno tridimensional, que comprende hidrogel de colágeno reticulado esencialmente transparente que comprende la primera y/o segundas redes de colágeno reticulado.

La eliminación de área (s) de material de la malla de colágeno tridimensional formada (s) puede significar aquí formar un anillo de malla tridimensional.

Tal anillo de malla de colágeno tridimensional puede tener un área eliminada, esto es, un orificio libre de malla, como la óptica central de un dispositivo oftálmico implantable de núcleo y faldón, el faldón que comprende material composite de hidrogel de colágeno y el núcleo de red de colágeno reticulado esencialmente transparente.

#### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una vista esquemática de un dispositivo que comprende un material composite de hidrogel de colágeno en una primera región del dispositivo y en una segunda región, un hidrogel de colágeno reticulado esencialmente transparente.

Las figuras 2a-2c son micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de diferentes regiones del dispositivo en la figura 1.

La figura 3 muestra un dispositivo oftálmico implantable, implante corneal, con una primera región periférica que es opaca y visible y una segunda región transparente.

La figura 4 muestra una micrografía electrónica de barrido del dispositivo de la figura 1.

La figura 5 muestra el tamaño de las fibrillas de colágeno en diferentes regiones del dispositivo en la figura 1 en comparación con los del estroma de conejo nativo.

La figura 6 ilustra la compresión plástica del hidrogel de malla.

La figura 7 muestra una malla de colágeno con una sección eliminada centralmente.

Las figuras 8a y 8b muestran transmisión de luz y dispersión de luz para diferentes materiales.

Las figuras 9a y 9b muestran fotografías de un andamio incorporado en malla de polipropileno (PP) y un andamio incorporado en malla de colágeno, respectivamente, antes y después de haber sido sometidos a una fuerza de tracción.

Las figuras 10a y 10b muestran la capacidad para suturar de los implantes de bioingeniería con malla de colágeno en el faldón y los implantes de control sin dicha malla de colágeno, respectivamente.



La figura 11 es un gráfico que muestra el tiempo de degradación *in vitro* para diferentes materiales.

La figura 12 muestra fotografías de un dispositivo oftálmico implantado en córneas de conejo el día de la operación y tres meses después de la operación.

5 La figura 13 muestra una fotografía tres meses después de la implantación de una región periférica, faldón, de un implante invadido por células estromales.

### Descripción detallada

10 En la figura 1 se muestra una vista esquemática de un dispositivo 1 que comprende una primera región A con un material composite 2 de hidrogel de colágeno que comprende una malla 3 de colágeno tridimensional parcialmente comprimida embebida en una red 4 de colágeno reticulado y una segunda región B que comprende la red 3 de colágeno reticulado solamente.

15 La micrografía de microscopía electrónica de barrido (SEM) en la figura 2a muestra una micrografía SEM de la malla 3 de colágeno tridimensional antes de fusionarse en la red 4 de colágeno reticulado. En la figura 2b, la red 4 de colágeno reticulado de la región B de la del dispositivo 1 se muestra mientras que la figura 2c muestra una micrografía SEM del material composite 2 de hidrogel de colágeno en la primera región A. Como se puede véase en estas micrografías, la malla 3 de colágeno tridimensional (Fig. 2a) exhibe una estructura fibrosa más compacta en comparación a la red 4 de colágeno reticulado (Fig. 2b).

En la figura 3 se muestra un dispositivo oftálmico implantable, implante corneal, con una primera región A opaca periférica y una segunda región B transparente.

20 En la figura 4 se muestra una micrografía electrónica de barrido de la primera región A, marcada con S en la micrografía, y la segunda región B, marcada con una estrella en la micrografía. Las flechas en la micrografía indican la sección transversal de la primera región A que exhibe una estructura más fibrosa en comparación con la segunda región B.

25 El análisis microestructural del dispositivo 1 mediante microscopía electrónica reveló que las fibras de colágeno en la primera región A formaban una estructura más fibrosa con un grado de autoalineamiento localizado, mientras que la segunda región B tenía una distribución de fibrilla más uniforme, pero menos densamente compactada. El diámetro de la fibra en la primera región A fue significativamente más delgado ( $P < 0,001$ ) que en la segunda región y en el estroma del conejo nativo, véase la figura 5.

30 En la siguiente sección experimental y de caracterización se describen los procedimientos de producción del dispositivo 1 descrito anteriormente y el material composite de hidrogel de colágeno. Se presta especial atención a los dispositivos oftálmicos implantables que comprenden tales materiales composites. Sin embargo, como se discutió anteriormente, el material composite de hidrogel también es apropiado como equivalentes de tejido para el reemplazo de otros tejidos y se puede usar como reemplazo de la piel, como un parche cardíaco para reparar la pared cardíaca o para reparar la pared abdominal débil.

### Experimental

#### 35 Productos químicos

Agentes de reticulación: metyoduro de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDCM) y N-hidroxisuccinimida (NHS), Poli(etilenglicol) dialdehído (PEG-DA,  $M_n = 2000$ ); colágeno (atelo tipo I) obtenido y altamente purificado de piel porcina.

#### Red de colágeno reticulado

40 Las soluciones diluidas (0,1 %) de colágeno se liofilizaron en condiciones controladas y luego se reconstituyeron en agua estéril para obtener una concentración de colágeno objetivo de, por ejemplo, 18 %. La alta concentración de colágeno también se puede lograr mediante la evaporación controlada al vacío de la solución diluida a temperatura ambiente. Las soluciones de colágeno se centrifugaron y se transfirieron a jeringas de vidrio separadas. El pH de las  
45 soluciones se ajustó a 3-6. Cantidades predeterminadas de los agentes de reticulación EDCM/NHS y poli (etilenglicol) dialdehído (PEGDA) se disolvieron por separado en agua a una concentración de 18 % p/p y se agregaron a cada solución de colágeno a proporciones molares de 0,75: 1 y 0,5: 1 para el primer agente de reticulación y el segundo agente de reticulación a colágeno, respectivamente, mientras se mezcla bien. La proporción de la primera red de colágeno reticulado a la segunda red de colágeno reticulado fue 1: 0,5. Las soluciones separadas se mezclaron juntas en un sistema de jeringa y luego se moldearon entre placas de vidrio o en moldes corneales curvados para hacer un andamio de hidrogel homogéneo. Se usaron un espaciador de 150  $\mu\text{m}$  de espesor y un sistema de sujeción para el  
50 moldeo por compresión de andamios de 150  $\mu\text{m}$  de espesor. Las muestras se curaron a 37 °C, en cámaras de humedad del 90 %. El desmoldeo se logró por inmersión en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 1 hora. Posteriormente, las muestras se lavaron tres veces con solución de PBS (1 X PBS, que contenía cloroformo al 1 % v/v) a temperatura ambiente para extraer los subproductos de reacción y desinfectar las muestras.

Alternativamente, solo se puede usar un agente de reticulación para formar la red de colágeno reticulado.

#### Material composite de hidrogel de colágeno

Se prepararon 1 % y 2 % de soluciones de colágeno tipo I y luego se mezclaron con 1 x medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) en una proporción de 9:1. Después de ajustar el pH a pH neutro, aproximadamente 7, y la incubación a 37 °C, la solución de hidrogel se comprimió parcialmente para formar la malla 3 de colágeno tridimensional. En la figura 6 se ilustra el procedimiento de compresión plástica. La solución 3 de hidrogel se colocó entre dos mallas 12 de plástico. En la parte superior de la malla de plástico superior se coloca una placa 11 de vidrio y debajo de la malla 12 de plástico inferior se coloca una malla 13 de alambre y papel 14 de filtro. En la parte superior del hidrogel (el fluido sale del hidrogel como lo indican las flechas en la figura 6) para formar una malla de colágeno tridimensional. Se fabricaron dos espesores de las mallas de colágeno tridimensionales. Se usaron concentraciones de colágeno de 1 % y 2 % para una primera y segunda malla de colágeno tridimensional. La primera malla tenía un grado de compresión del 95 % (la altura del gel se redujo desde 1000  $\mu\text{m}$  a 50  $\mu\text{m}$ ). La segunda malla tenía un grado de compresión del 90 % (la altura del gel se redujo desde 1000  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ ).

Las mallas de colágeno gruesas o delgadas se colocaron luego dentro de una mezcla de reticulante de colágeno que comprende a) solución de colágeno al 18 % y los agentes de reticulación EDCM/NHS y/o b) poli(etilenglicol) dialdehído (PEG-DA), en la proporción del contenido de colágeno en la red de malla de colágeno al contenido de colágeno en la primera y/o segunda red de colágeno es 1:40. Las otras proporciones y el pH fueron los mismos que los descritos para la *red de colágeno reticulado*. La combinación completa se moldeó posteriormente y se colocó entre dos placas de vidrio con separadores de 150  $\mu\text{m}$  y se comprimió para formar un hidrogel de colágeno composite homogéneo. El moldeo por compresión permitió que la mezcla de colágeno-reticulante penetrara en la malla de colágeno parcialmente comprimida formando un único composite de malla-hidrogel combinado. El composite se curó a 37 °C, durante 24 horas, luego se desmoldeó y se lavó en PBS. La transparencia dependía de la concentración de colágeno y el grado de compresión en la malla de colágeno tridimensional, con una solución del 2 % que resulta en más opacidad que el 1 %.

#### Dispositivos oftálmicos implantables

Los dispositivos oftálmicos implantables se fabricaron como el material composite de hidrogel de colágeno anterior. Se eliminaron los botones 20 (2-7 mm de diámetro) de la malla 3 parcialmente comprimida, véase la figura 7. La malla de colágeno se colocó luego dentro de una mezcla de reticulante de colágeno entre las placas de vidrio o dentro de moldes corneales curvos y se comprimió además como se indicó anteriormente formando un único composite de malla-hidrogel combinado con regiones sin malla correspondientes a las áreas con botones eliminados que se ocupan con el colágeno reticulado.

#### Control

Como control negativo para el cultivo celular y las pruebas mecánicas, se usó malla de polipropileno (BD Biosciences, San José, USA), en lugar de malla de colágeno para formar una malla totalmente sintética, que posteriormente es embebido en una solución reticulada, siguiendo el procedimiento anterior.

#### Caracterización

##### Transmisión de luz y medidas de dispersión

La transmisión y dispersión de la luz se midieron a temperatura ambiente, con luz blanca (fuente de lámpara de halógeno de cuarzo) y regiones espectrales estrechas (centradas a 450, 550 y 650 nm) usando un instrumento óptico personalizado. Las muestras de 150  $\mu\text{m}$  de espesor se hidrataron en PBS antes y durante las mediciones.

Se evaluaron la córnea humana, la córnea nativa de conejo, la red 4 de colágeno reticulado y el material composite 2 de hidrogel de colágeno. El control de la transparencia de la malla de colágeno en el material composite se logró variando la concentración de colágeno entre 1 y 2 % y el espesor de la malla de 50-100  $\mu\text{m}$ . La transmisión de luz y la dispersión, véase la figura 8a, indicaron que la red 4 de colágeno reticulado tenía una transmisión de luz superior a la córnea del donante humano, mientras que la transmisión se redujo de manera controlable en el material composite 2 en comparación con la red 4 de colágeno reticulado y la córnea del donante humano. La transmisión reducida y el aumento de la dispersión, véase la figura 8b, se debieron a fibras de colágeno comprimidas adicionales en el material composite 2, que se pueden usar para facilitar el seguimiento *in vivo* de la degradación del implante. El porcentaje de dispersión de la luz de la red 4 de colágeno reticulado fue elevado (dispersión del 4-5 %) con respecto a la córnea del conejo nativo (1-2 %) pero aún por debajo del umbral de transparencia del 10 %. El porcentaje de dispersión de luz para el material composite 2 fue mayor que el de la red 4 de colágeno reticulado y el conejo debido a las fibras de colágeno altamente compactadas.

#### Propiedades mecánicas

El impacto de la incorporación de la malla 3 de colágeno en la red 4 de colágeno reticulado sobre las propiedades mecánicas se evaluó usando un sistema de prueba de materiales automatizados Instron Serie IX (Modelo 3343, Instron, Canton, MA) equipado con una celda de carga de capacidad de 50N y agarres de metal neumático a una velocidad de cruceta de 5 mm/min. Las soluciones de colágeno se dispensaron y curaron en moldes de teflón con forma de mancuerna, con extremos que contenían malla de colágeno y el centro permaneció sin malla. También se incorporó una malla sintética hecha de malla de polipropileno (PP) en los extremos de algunas muestras para compararla con la malla a base de colágeno y para investigar el impacto de la coincidencia/desajuste de los materiales en el comportamiento mecánico de los materiales composites. Las muestras con mancuernas equilibradas con PBS se unieron a los agarres con una presión neumática de 40 psi y se sumergieron en un recipiente con temperatura controlada (baño BioPuls) lleno de PBS a 37 °C, durante la prueba.

Cuando las muestras se sometieron a una fuerza de tracción, el andamio incorporado en malla de polipropileno (PP) se rompió X en la interfase de colágeno y malla del PP, lo que indica una debilidad localizada, véase la figura 9a.

Muestras con una red 4 de colágeno reticulado en el centro y la región periférica compuesta por el material composite que comprende una malla de colágeno, la fuerza de tracción se transfirió al centro de la muestra de prueba que estaba compuesta por el colágeno 4 reticulado solo donde el hidrogel era más débil que las pestañas y finalmente se rompió Y, véase la figura 9b.

La capacidad para suturar de los implantes que comprenden una red 4 de colágeno reticulado en el centro y la región periférica compuesta por el material composite que comprende una malla de colágeno se ensayaron suturándolos sobre ojos de cerdo explantados. Como se muestra en las imágenes SEM en la figura 10a, los implantes contenían suturas y no se rasgaron mientras que los implantes de control, figura 10b (red de colágeno reticulado sin malla de colágeno) no contenían todas las suturas y no eran tan buenos como los implantes que contienen material composite de hidrogel de colágeno.

#### Degradación de colagenasa

Para evaluar la tasa de degradación *in vitro* de biomateriales, se usó colagenasa tipo I (de *Clostridium histolyticum*). En resumen, se incubaron muestras de 80 mg (150 µm de espesor) de la red de colágeno reticulado y material composite de hidrogel de colágeno en solución tampón de colagenasa. Los hidrogeles se pesaron en diferentes puntos de tiempo después de que el agua superficial se eliminó suavemente (0, 1, 2, 3, 6, 8, 10, 14, 16, 18 horas). El porcentaje de masa residual de hidrogeles se calculó según la proporción del peso en cada punto de tiempo al peso de hidrogel inicial en el tiempo cero.

En el ensayo de colagenasa *in vitro*, los materiales composites (primera región A) fueron menos resistentes a la degradación de la colagenasa que la red de colágeno reticulado (segunda región B), véase la figura 11. La red de colágeno reticulado se degradó en un 50 % *in vitro* en 11 horas, mientras que el material composite tardó solo 4 horas en degradarse en un 50 % *in vitro* debido a un menor grado de reticulación en este material.

Por consiguiente, un dispositivo oftálmico implantable muestra un mayor grado de degradación en las regiones con material composite que en las regiones con red de colágeno reticulado.

#### Evaluación del crecimiento de células epiteliales corneales humanas.

Se usaron células epiteliales corneales humanas (HCEC) inmortalizadas (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, EE. UU.) para evaluar la biocompatibilidad celular de los materiales. Los HCEC se sembraron en pocillos dentro de una placa de cultivo celular de 96 pocillos sin hidrogeles (control), encima de piezas de 150 mm<sup>2</sup> de material composite de hidrogel de colágeno, o malla de composite-PP y redes de colágeno reticulado y luego se suplementaron con un medio sin suero optimizado para el cultivo de células epiteliales corneales humanas (EpiGRO™ Human Ocular Epithelia Complete Media Kit, Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). Una vez que los pocillos de control se volvieron confluentes, después de aproximadamente 3 días de cultivo, todos los pocillos se tiñeron con el ensayo de viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD® (Invitrogen). Las células teñidas se fotografiaron con un microscopio fluorescente invertido Zeiss usando el software Zen (Zeiss LSM700) con un aumento de 10x en el día 5 posterior a la siembra. La fluorescencia verde y roja correspondió a células vivas y muertas, respectivamente.

El material composite de hidrogel de colágeno apoyó el crecimiento y la proliferación de HCEC, mientras que las células no parecían poblar malla de composite-polipropileno. El material composite de hidrogel de colágeno y la red de colágeno reticulado apoyaron igualmente el crecimiento y la proliferación celular muy similar a la superficie de la placa de Petri de control positivo (no mostrada).

#### Animales y queratoplastia intraestromal asistida por láser de femtosegundos (FLISK)

Con la aprobación del Linköping Animal Research Ethics Committee (Solicitud No. 108-12) y siguiendo las pautas de Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) para el Uso de Animales en la Investigación Oftalmológica y de la Visión, se operaron 10 conejos albinos blancos de Nueva Zelanda machos con un peso de 3-3,5 kg. La cirugía se realizó bajo anestesia general con inyección intramuscular de 25 mg/kg de ketamina (Ketalar 50 mg/ml; Parke-Davis, Taby, Suecia) y 5 mg/kg de xilazina (Rompun 20 mg/ml; Bayer, Gotemburgo, Suecia). También

se usaron gotas anestésicas locales (gotas oculares de clorhidrato de tetracaína al 1 %, Chauvin Pharmaceuticals Ltd., Surrey, Reino Unido). El ojo derecho se sometió a un trasplante corneal intraestromal en los 25 conejos, mientras que los ojos izquierdos sirvieron como controles negativos intactos. Las operaciones se realizaron según la técnica de queratoplastia intraestromal asistida por láser de femtosegundo (FLISK). Se usó un láser de femtosegundo Intralase iFS de 150 kHz (Abbott Medical Optics, Solna, Suecia) para cortar botones corneales de tejido puramente estromal (sin incluir ninguna parte del epitelio o endotelio). Las dimensiones precisas y la ubicación de los botones que se van a eliminar fueron preprogramadas a través de la interfaz de usuario del láser y fueron idénticas para todos los conejos. Para el estudio actual, se extrajeron botones de 3 mm de diámetro de tejido nativo de 150  $\mu\text{m}$  de espesor de una profundidad del estroma medio (125  $\mu\text{m}$  de profundidad desde la superficie corneal hasta la superficie anterior del botón extirpado). En todos los grupos, los botones cortados con láser de femtosegundos se extirparon manualmente con unas pinzas quirúrgicas (a través de una abertura en forma de arco a la superficie corneal limitada a 70° de la circunferencia, dejando un bolsillo estromal vacío. Inmediatamente antes de la implantación de los biomateriales, se usó trefina de tejido de diámetro de 3 mm para cortar botones circulares de láminas planas de 150  $\mu\text{m}$  de espesor del biomaterial, el dispositivo oftálmico implantable que comprende material composite de hidrogel de colágeno en la periferia, faldón, del dispositivo y red de colágeno reticulado en el centro, núcleo. Las regiones del núcleo y del faldón eran claramente visibles (debido a la diferencia en la transparencia del núcleo y del faldón) y se consideraron viables para la implantación y el seguimiento *in vivo*. Los conejos se dividieron en 2 grupos. En el primer grupo (control positivo), el tejido corneal nativo se cortó intraestromalmente con un láser de femtosegundo, se extirpó y luego se insertó manualmente de nuevo en su posición anterior en el bolsillo del estroma vacío usando pinzas anatómicas (trasplante de autoinjerto). En el segundo grupo, el procedimiento FLISK fue idéntico, excepto que el tejido corneal extirpado fue reemplazado por el dispositivo oftálmico implantable de bioingeniería. No se usaron suturas después de la cirugía porque la ubicación intraestromal y el pequeño corte de acceso fueron suficientes para garantizar que los implantes permanecieran en su lugar dentro del bolsillo del estroma del huésped. Después de la cirugía y durante el primer día postoperatorio, todos los ojos operados recibieron ungüento antibiótico para los ojos (Fucithalamic 1 %, Leo Pharmaceuticals, Dinamarca) tres veces al día. El uso de esteroides (gotas oftálmicas Opnol 1 mg/ml, CCS Healthcare AB, Borlänge) fue mínimo y se limitó a ojos muy inflamados después de la operación.

Todos los procedimientos de FLISK se realizaron sin complicaciones intraoperatorias. Se extrajo tejido estromal medio nativo y se reemplazó con biomaterial o con el mismo tejido extraído (autoinjerto).

#### Evaluación clínica postoperatoria.

La evaluación de la ubicación intraestromal de los implantes y la medición del espesor corneal se realizó mediante tomografía de coherencia óptica del segmento anterior (ASOCT; Visante OCT, Carl Zeiss AB, Estocolmo, Suecia) en modo de alta resolución (promedio de tres mediciones de espesor por córnea). Inmediatamente después de la operación, el examen AS-OCT confirmó la presencia intraestromal de implantes y la ausencia de perforación corneal y reveló una inflamación variable de las córneas que remitió después de 1 mes y se estabilizó completamente después de 3 meses, mientras que tres meses después de la implantación, todos los implantes fueron retenidos, y los materiales del implante permanecieron transparentes.

Los implantes se estudiaron durante 3 meses *in vivo* en la córnea del conejo durante el cual fueron retenidos y fueron estables sin efectos adversos. El núcleo transparente y el faldón semitransparente se pueden visualizar por fotografía, véase la figura 12, el día de la operación y tres meses después de la operación. (Las córneas se fotografiaron con una cámara digital de gran aumento (cámara Nikon D90, Nikon Canada Inc., Toronto, Canadá). No se observó inflamación ni vascularización de los implantes, a pesar de la ausencia de tratamiento con esteroides postoperatorios. Tres meses después de la implantación, ambos el faldón y el núcleo transparente del biomaterial eran apenas visibles. La región del faldón fue invadida por las células del estroma, véase la figura 13 (la flecha negra indica las células dentro del implante), y se observó la invasión del nervio del estroma de los implantes. Adicionalmente, la sección del faldón se degradó lentamente, con el tiempo como se esperaba mientras se restauraba el medio corneal morfológico y fisiológico. Después de tres meses, el implante tenía una región central intacta y un remanente parcial del faldón. La actividad de los fibroblastos dentro del corte con láser de femtosegundos disminuyó y permitió que los nervios subepiteliales atravesaran el corte circular. A los tres meses, todas las córneas implantadas permanecieron transparentes *in vivo*. Los conejos fueron sacrificados después de 3 meses.

#### Evaluación histopatológica.

Las córneas de conejo con los implantes se explantaron, se fijaron y se embebieron en parafina y se seccionaron a 4  $\mu\text{m}$  de espesor y se realizó tinción con hematoxilina y eosina (H&E). Para el análisis inmunohistoquímico, se desparafinaron secciones de tejidos embebidos en parafina, se tripsinizaron y se bloqueó la peroxidasa endógena. Las secciones se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios durante 30 minutos: actina monoclonal anti-alfa de músculo liso de ratón,  $\alpha$ -SMA (dilución 1:25, ab 7817, Abcam, Cambridge, Reino Unido), colágeno monoclonal anti-tipo III de ratón (dilución 1:100, Acris AF 5810, Alemania), antígeno común monoclonal de ratón anti-leucocito CD45 (dilución 1:400, Acris AM02304PU-S, Alemania). Después de la aplicación e incubación de anticuerpos en HRP envision, se aplicó cromógeno líquido DAB a todas las muestras y las secciones se contratiñeron con hematoxilina. Las muestras se deshidrataron, se aclararon en xileno y se cubrieron con medio de montaje Mountex (Histolab Products AB, Gotemburgo, Suecia). En todos los casos, se usaron muestras de control y la omisión del anticuerpo

primario eliminó la tinción específica. La microscopía óptica se realizó con un fotomicroscopio Axiophot (Zeiss, Alemania Occidental) con un aumento de 10x y 20x.

Microscopía electrónica de transmisión y de barrido

5 La microscopía electrónica de barrido (SEM) se realizó usando un microscopio de emisión de campo ZEISS (LEO 1550 Gemini). Las muestras de biomaterial se prepararon por inmersión en nitrógeno líquido durante 60 segundos seguido de liofilización durante 24 horas. Las muestras se pulverizaron con un recubrimiento de oro de 2 nm antes del montaje para SEM. Las muestras se examinaron usando un voltaje de aceleración de 3 KeV y una distancia de trabajo de 3 - 5,5 mm.

10 Para la microscopía electrónica de transmisión (TEM), las muestras fijas fueron embebidas en resina (Epon 812; TAAB, Reading, Inglaterra). Se hicieron secciones de 4 µm de espesor y se tiñeron con tinte azul de toluidina para microscopía óptica con el fin de especificar el área de interés. Se cortaron secciones ultrafinas de 60 nm del bloque polimerizado y estas secciones se recogieron en rejillas de cobre de malla 200. Finalmente, las secciones ultrafinas se tiñeron con uranilo y citrato de plomo y se tomaron imágenes con un microscopio electrónico de transmisión (EM JEM 1230, JEOL Ltd., Tokio, Japón). Se usaron imágenes TEM para la cuantificación del diámetro de fibrillas de colágeno. Se usaron imágenes que representan diferentes regiones para las mediciones del diámetro de fibrillas de colágeno en el estroma corneal nativo, el núcleo central y la región periférica del faldón (3 imágenes para cada una). Para las partes del núcleo y el faldón, se analizaron las imágenes TEM antes de la implantación. A partir de cada imagen, se midió el diámetro de 30 fibrillas de colágeno diferentes como se muestra en la figura 5.

Análisis estadístico

20 El espesor de los materiales implantados medidos por OCT se comparó usando análisis de varianza unidireccional (ANOVA). El cambio en el espesor corneal en los mismos ojos en relación con el postoperatorio inmediato y el examen final se analizó mediante la prueba t pareada. La densidad del nervio subbasal entre los grupos a los 3 meses después de la operación se comparó mediante ANOVA de una vía. Las medidas de diámetro de fibrillas de colágeno se compararon ANOVA unidireccional de Kruskal-Wallis en rangos con el procedimiento de Dunn para aislar las diferencias por pares. Para todas las pruebas estadísticas, la significación de dos colas por debajo de 0,05 se consideró significativa, y todas las pruebas se realizaron con el software Sigma Stat 3.5 (Systat Software Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

Estado nervioso

30 El examen IVCM reveló la cobertura de todas las córneas implantadas por el epitelio después de la operación. El epitelio corneal deriva la inervación del plexo nervioso subbasal, que fue visualizado por IVCM. No se encontraron diferencias significativas en la densidad del nervio subbasal entre la córnea nativa del conejo, el biomaterial o los autoinjertos a los tres meses, y la morfología nerviosa parecía normal con fibras nerviosas delgadas que corrían más o menos paralelas.

Migración de células estromales después de la implantación

35 El examen corneal a nivel celular se realizó *in vivo* por IVCM, y *ex vivo* por H&E y tinción inmunohistoquímica. El IVCM de las interfaces periféricas del núcleo-faldón reveló células reflectantes redondas u ovaladas con núcleo oscuro a uno y tres meses, muy cerca de los restos visibles del faldón. Esta morfología celular corresponde a macrófagos maduros, que también se encontraron en autoinjertos. La región central implantada en los autoinjertos estaba poblada por queratocitos estromales, mientras que en los biomateriales, se observaron células dispersas similares a los queratocitos y macrófagos dentro del material del implante. La tinción histoquímica confirmó que inicialmente los implantes acelulares se poblaron con células huésped a los tres meses. Se encontraron células tanto en el núcleo como en los restos del faldón, y consistían en miofibroblastos α-SMA+ que se originan a partir de queratocitos activados y/o células derivadas de médula ósea CD45+, tales como los macrófagos. Aunque se observaron células inflamatorias *in vivo* y *ex vivo*, no se observaron signos de inflamación en el examen clínico de los ojos implantados a los tres meses.

50 Se han identificado veintinueve tipos de colágenos, pero los tipos I, II y III son los más abundantes y constituyen la mayoría de las macromoléculas de la matriz extracelular y tienen varias funciones. Por ejemplo, más del 90 % del colágeno en el cuerpo humano es de tipo I. El material composite de hidrogel de colágeno descrito anteriormente es aplicable a todos los colágenos que forman fibrillas (por ejemplo, tipos I, II, III, V, XI, etc.). Esto se debe a que muchos de los sitios de reticulación necesarios para la formación de redes de reticulación son comunes entre estos colágenos. Además, estos colágenos son complejos de proteínas cuyas unidades básicas consisten en las mismas triples hélices (tropocolágeno) en las que tres cadenas de polipéptidos se enrollan entre sí como un trozo de cuerda. Las moléculas de colágeno se pueden autoensamblar en microfibrillas y luego fibrillas.

55 Para aplicaciones de ingeniería de tejidos, se puede usar un tipo de colágeno o una combinación de diversos tipos dependiendo del tejido u órgano diana que necesite ser reemplazado o reparado. Por ejemplo, el colágeno tipo I es abundante en la córnea humana, la piel, el tendón y el hueso, mientras que el colágeno tipo II es abundante en el

cartílago y el tipo III es abundante en las venas. El colágeno tipo III es más abundante en la piel, los pulmones, la córnea y el sistema vascular, frecuentemente asociado con colágeno tipo I.

**REIVINDICACIONES**

1. Un material composite de hidrogel de colágeno para uso en ingeniería de tejidos, que comprende:
- una primera red de colágeno que comprende colágeno reticulado con un primer agente de reticulación, y/o
  - una segunda red de colágeno que comprende colágeno reticulado con un segundo agente de reticulación, y
- 5 - una malla de colágeno tridimensional que comprende hidrogel de colágeno comprimido parcial y plásticamente con un grado de compresión del 50-95 %, en el que la malla de colágeno tridimensional está embebida en la primera red de colágeno y/o segunda red de colágeno, y
- la primera red de colágeno y/o la segunda red de colágeno y la malla de colágeno tridimensional están interconectadas física y químicamente en el material composite de hidrogel de colágeno.
- 10 2. El material composite de hidrogel de colágeno de la reivindicación 1, en el que el colágeno de la primera y/o segunda red de colágeno y la malla de colágeno tridimensional se selecciona de un grupo que consiste en colágeno tipo I, colágeno tipo II, colágeno tipo III, colágeno tipo IV, colágeno tipo V, colágeno tipo VI y colágeno desnaturalizado de origen animal y colágenos recombinantes humanos.
- 15 3. El material composite de hidrogel de colágeno de la reivindicación 1 o 2, en el que el contenido de colágeno en la primera y/o segunda red de colágeno es 1-50 %, preferiblemente 10-20 %.
- 20 4. El material composite de hidrogel de colágeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el primer y/o segundo agente de reticulación es un agente de reticulación de carbodiimida de corto alcance no polimérico seleccionado de un grupo que comprende clorhidrato de etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC), metyoduro de 1-[3-(dimetilamino) propil]-3-etilcarbodiimida (EDCM), dicitclohexil-carbodiimida (DCC), N-hidroxisuccinimida (NHS) y combinaciones de los mismos.
- 25 5. El material composite de hidrogel de colágeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el primer y/o segundo agente de reticulación es un agente de reticulación polimérico multifuncional de tipo amina de largo alcance que comprende reticuladores multifuncionales de tipo amina de la familia del polietilenglicol (PEG), seleccionada de un grupo que comprende PEG succinimidil éster (NHS-PEG-NHS) PEG succinimidil NHS éster multibrazo, poli(etilenglicol) dialdehído (PEG-DA), polietilenglicol dibutilaldehído, polietilenglicol diacrilato y combinaciones de los mismos.
- 30 6. El material composite de hidrogel de colágeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el contenido de colágeno de la malla de colágeno tridimensional es 0,1-20 %, preferiblemente 0,5-10 % o 1-5 %.
7. El material composite de hidrogel de colágeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la proporción del contenido de colágeno en la malla de colágeno tridimensional al contenido de colágeno en la primera y/o segunda red de colágeno es 1:50, preferiblemente 1:40 o 1:30.
- 35 8. El material composite de hidrogel de colágeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la malla de colágeno tridimensional se puede cargar con células, factores de tejido, factores de crecimiento, agentes bioactivos y fármacos.
9. El material composite de hidrogel de colágeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la malla de colágeno tridimensional es esencialmente transparente con una transmisión de luz de más del 80 %, esencialmente translúcida con una transmisión de luz de más del 20 % y menos de 80 %, o esencialmente opaco con una transmisión de luz de menos del 20 %.
- 40 10. El material composite de hidrogel de colágeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para uso en dispositivos oftálmicos, reemplazo de piel, reparaciones de la pared cardíaca o aplicaciones de parches cardíacos, o reparación de la pared abdominal débil.
11. Un dispositivo oftálmico implantable que comprende:
- una primera y una segunda región, en el que
- 45 la primera región comprende el material composite de hidrogel de colágeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, y
- la segunda región comprende un hidrogel de colágeno reticulado esencialmente transparente que comprende las mismas primera y/o segunda redes de colágeno reticulado que el material composite de hidrogel,
- en el que la primera y segunda regiones son regiones interconectadas conectadas a través de las primera y/o segunda redes de colágeno reticulado.

12. El dispositivo oftálmico implantable de la reivindicación 11, en el que el dispositivo es un implante corneal onlay, corneal inlay o de espesor total.
13. El dispositivo oftálmico implantable de la reivindicación 11 o 12, en el que la primera región es colocada en un área periférica del dispositivo.
- 5 14. Procedimiento de producción de un material composite de hidrogel de colágeno, que comprende las etapas de:
- formación de una primera red de colágeno en forma líquida, la red de colágeno comprende colágeno reticulado con un primer agente de reticulación, y/o
  - formación de una segunda red de colágeno en forma líquida, la red de colágeno comprende colágeno reticulado con un segundo agente de reticulación,
- 10 - formación de una red tridimensional de malla de colágeno mediante compresión plástica parcial de un hidrogel de colágeno hasta un grado de compresión del 50-95 %, y
- moldeo por compresión simultánea de la primera red de colágeno y/o la segunda red de colágeno y la malla de colágeno tridimensional para formar un material composite de hidrogel de colágeno interconectado física y químicamente, en el que la malla de colágeno tridimensional está embebida en la primera red de colágeno y/o
- 15 segunda red de colágeno.
15. Procedimiento de producción de un dispositivo oftálmico implantable, que comprende las etapas de:
- formación de una primera red de colágeno en forma líquida, la red de colágeno comprende colágeno reticulado con un primer agente de reticulación, y/o
  - formación de una segunda red de colágeno en forma líquida, la red de colágeno comprende colágeno reticulado con un segundo agente de reticulación,
- 20 - formación de una malla de colágeno tridimensional mediante compresión plástica de un hidrogel de colágeno hasta un grado de compresión del 50-95 %,
- eliminación del área o las áreas de material de la malla de colágeno tridimensional formadas, y
  - moldeo por compresión simultánea de la primera red de colágeno y/o la segunda red de colágeno y la malla de colágeno tridimensional con el área o las áreas eliminadas para formar un dispositivo oftálmico implantable que comprende una primera región que comprende material composite de hidrogel de colágeno interconectado física y químicamente, en el que la malla de colágeno tridimensional está embebida en la primera red de colágeno reticulado y/o la segunda red de colágeno reticulado, y (a) segunda (s) región (es) libre (s) de malla, que corresponde al área o las áreas eliminadas de la malla de colágeno tridimensional, que comprende hidrogel de colágeno reticulado esencialmente transparente que comprende la primera y/o segunda red de colágeno
- 25 reticulado.
- 30



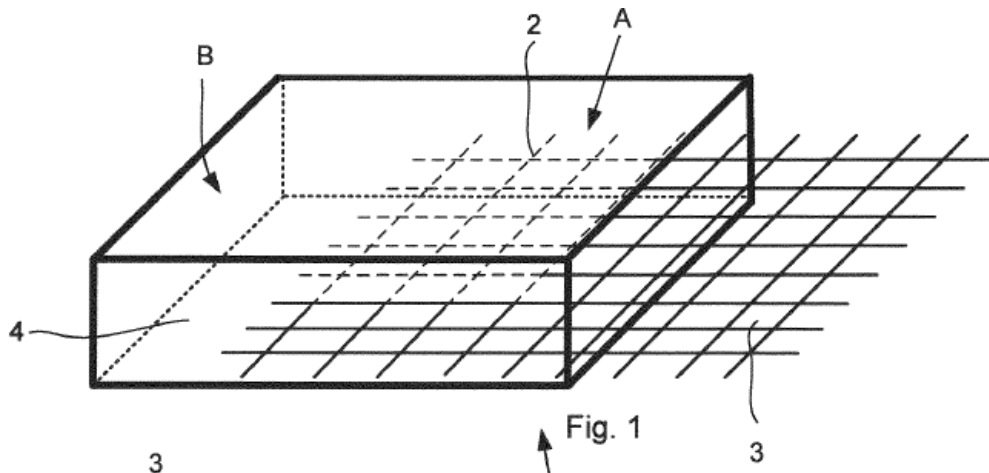


Fig. 1

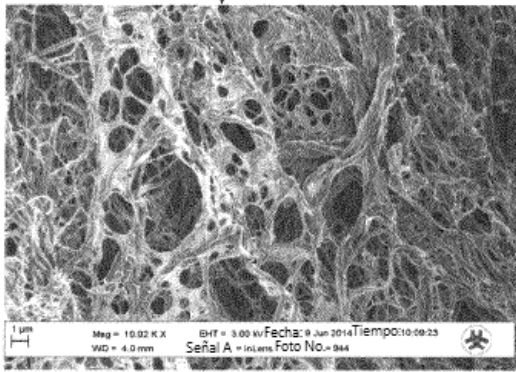


Fig. 2a

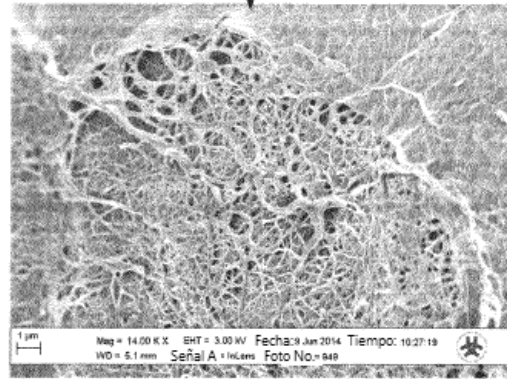


Fig. 2c

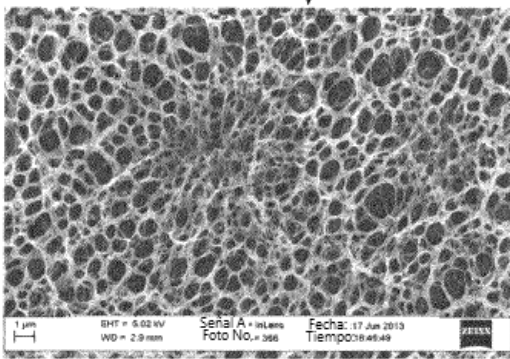


Fig. 2b

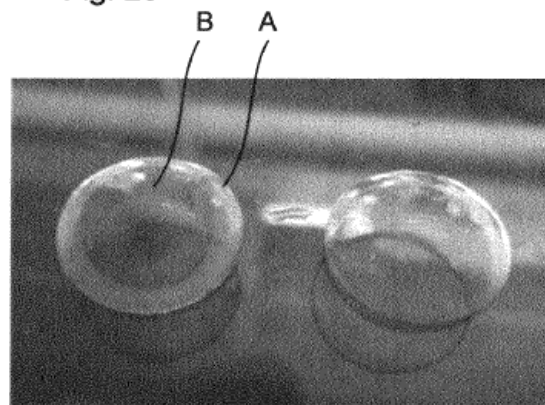


Fig. 3

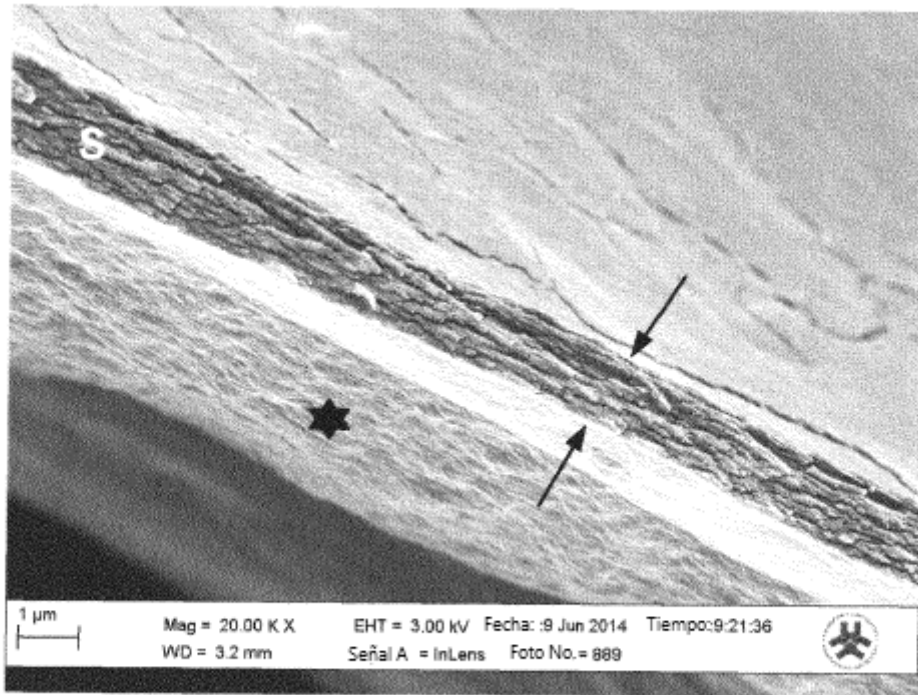


Fig. 4

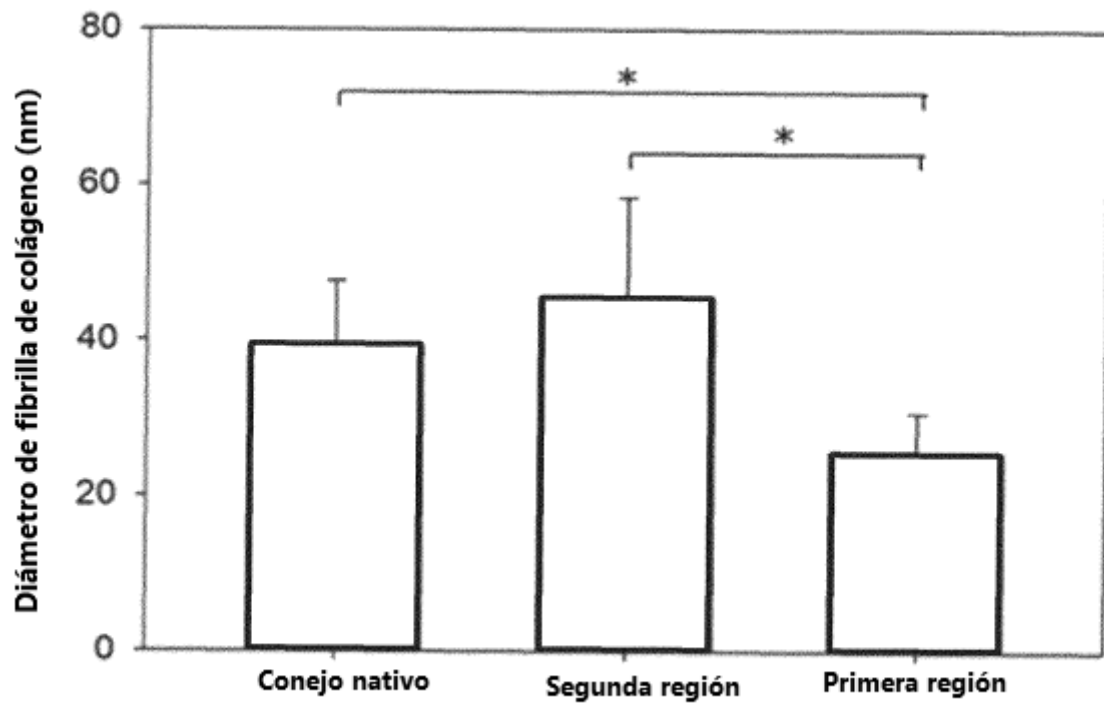


Fig. 5

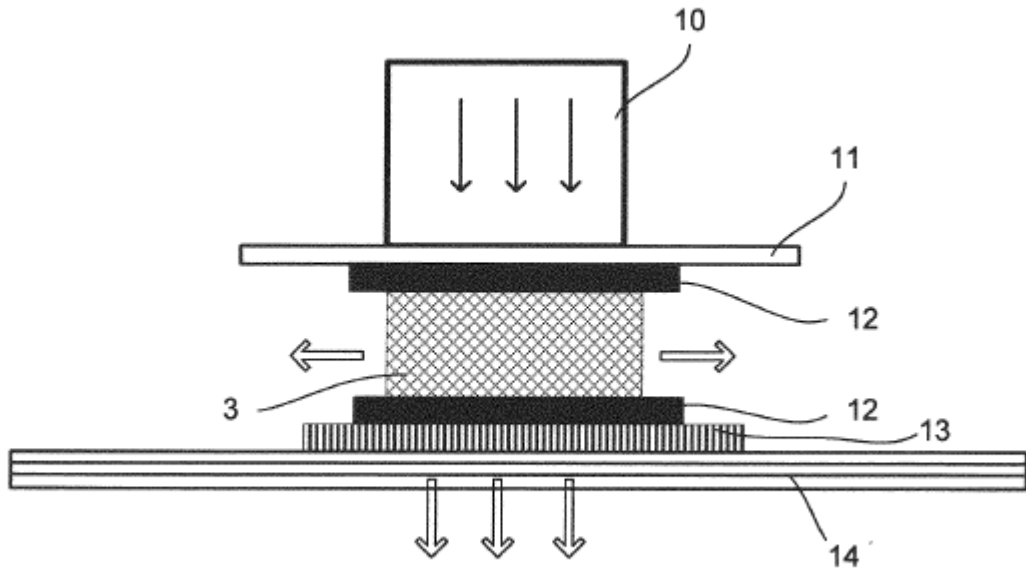


Fig. 6

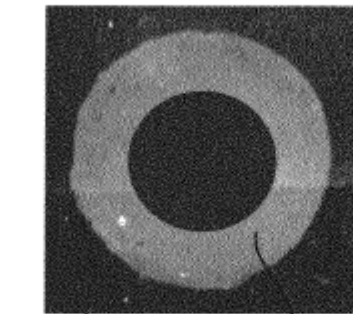


Fig. 7

3

20

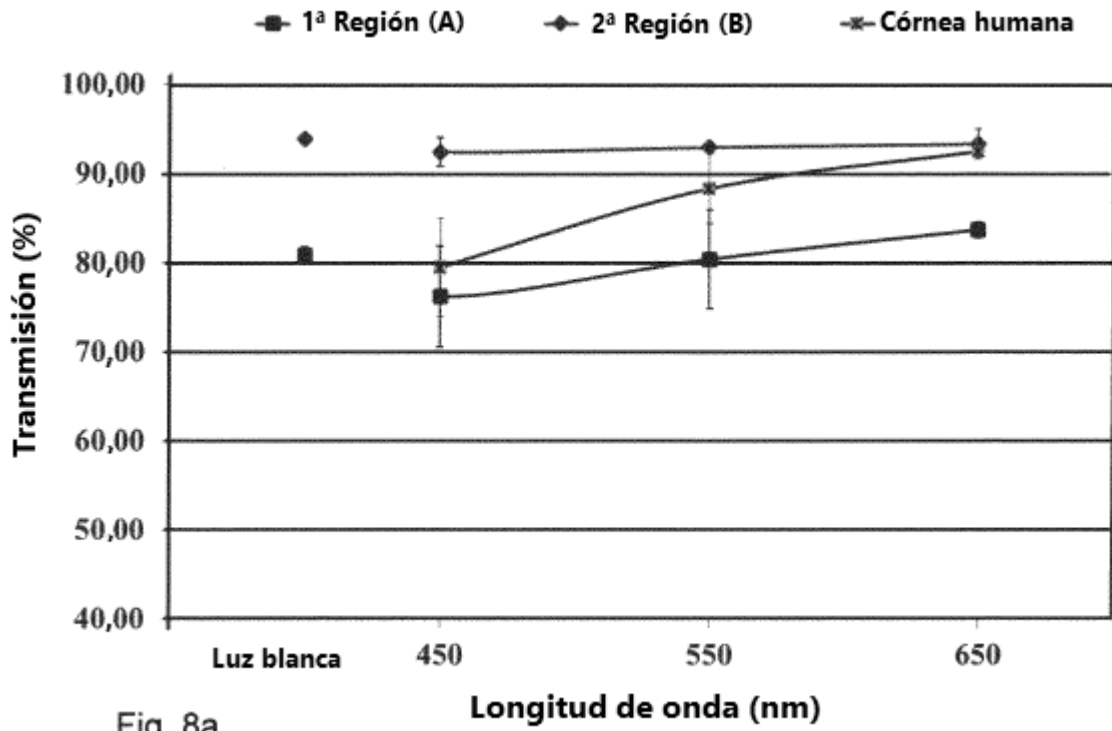


Fig. 8a

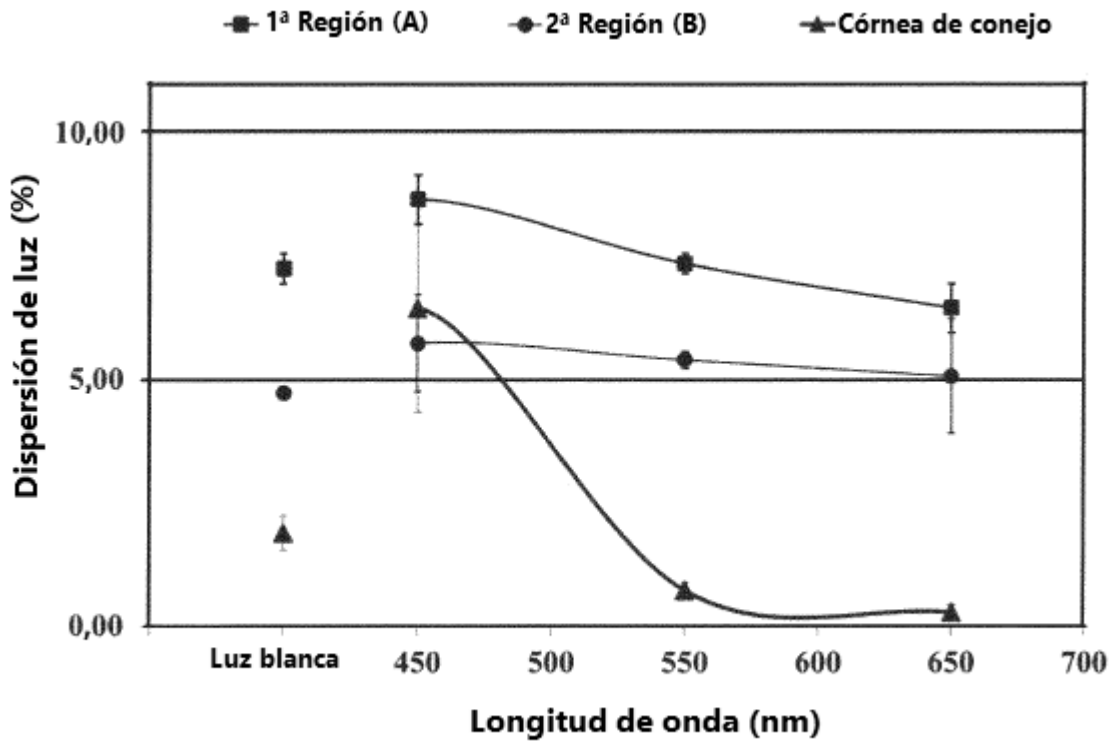


Fig. 8b

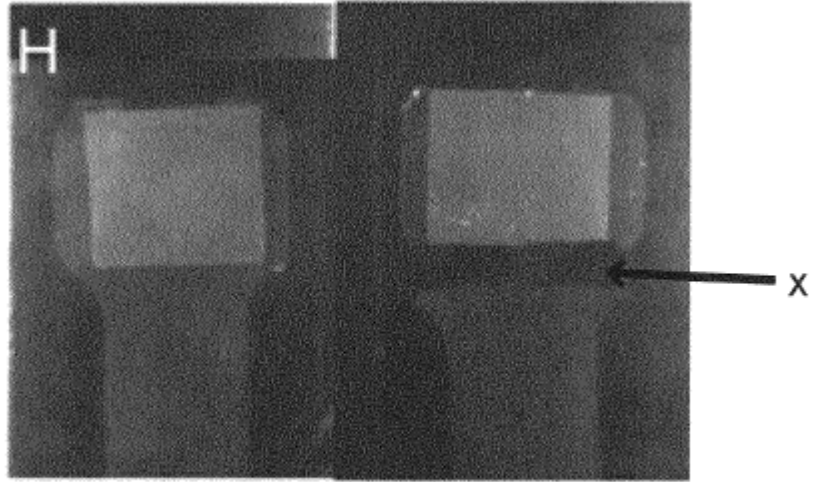


Fig. 9a

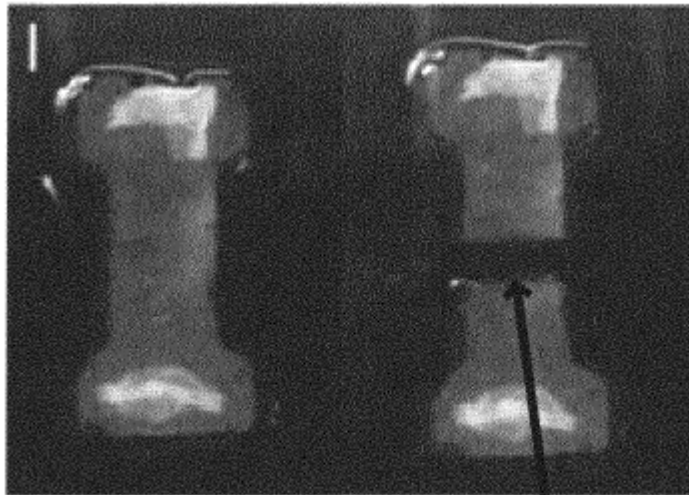


Fig. 9b

Y

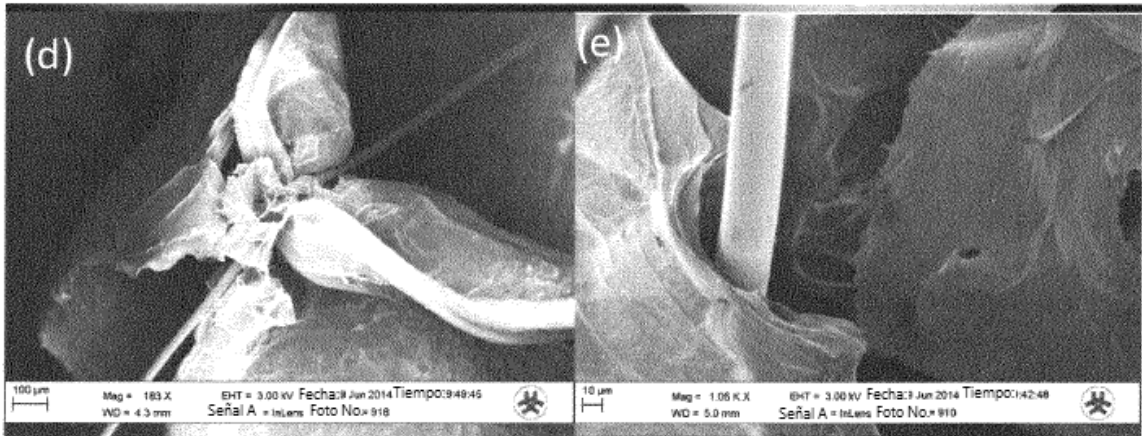


Fig. 10a

Fig. 10b

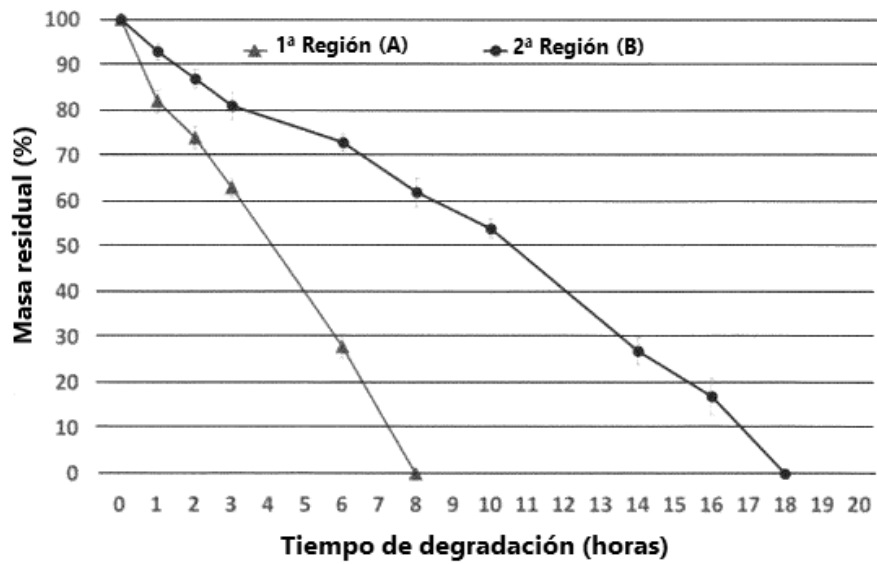


Fig. 11

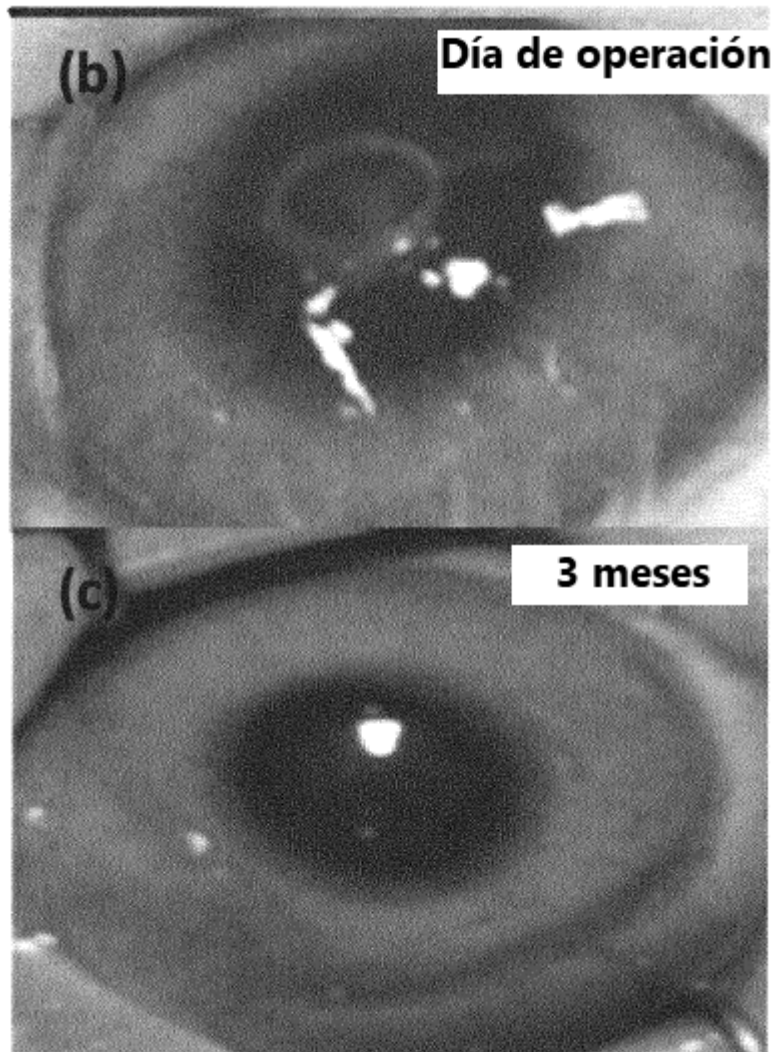


Fig. 12

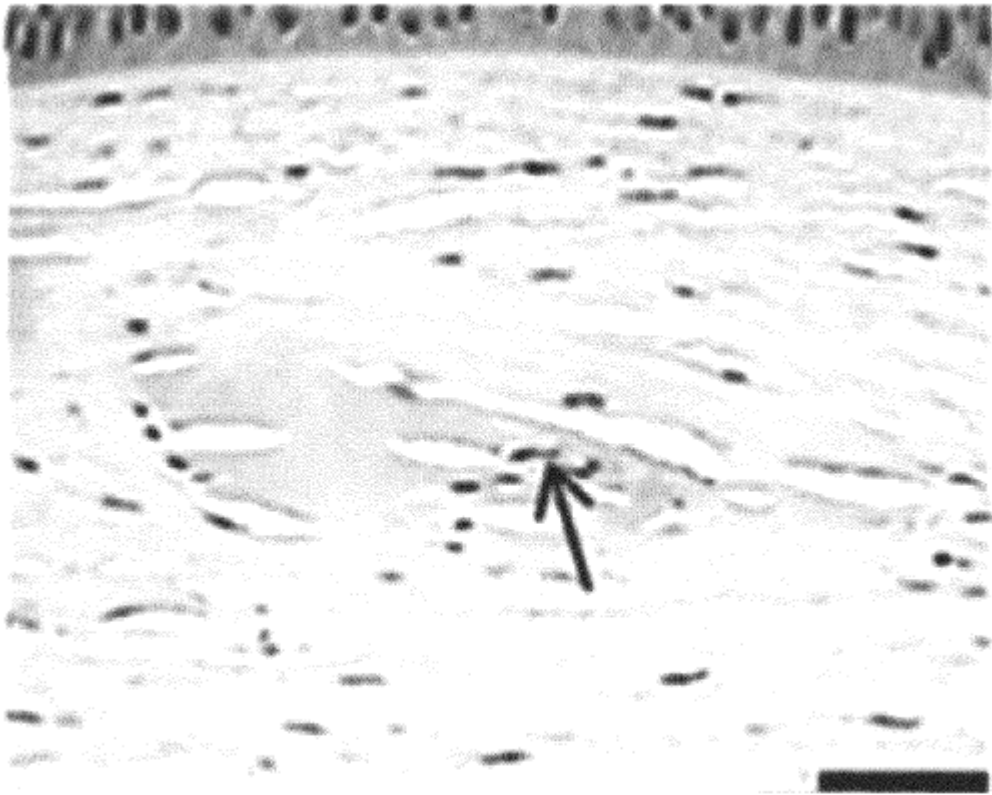


Fig. 13