

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 726**

51 Int. Cl.:

A61K 9/06	(2006.01)
A61K 9/70	(2006.01)
A61K 47/20	(2006.01)
A61K 35/36	(2015.01)
A61K 35/12	(2015.01)
C12N 5/071	(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.01.2011 PCT/US2011/020043**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2011 WO11084925**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.01.2011 E 11732033 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2521535**

54 Título: **Biomateriales fabricados a partir de cabello humano**

30 Prioridad:

05.01.2010 US 292265 P

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

25.06.2018

73 Titular/es:

**CELL CONSTRUCTS I, LLC (100.0%)
2275 Northwest Parkway, SE, Suite 170
Marietta, GA 30067, US**

72 Inventor/es:

BARROWS, THOMAS, H.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 673 726 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

Biomateriales fabricados a partir de cabello humano

5 CAMPO TÉCNICO

El Campo Técnico incluye materiales biomédicos que usan queratina o proteínas derivadas del cabello, así como métodos de uso de estos materiales en las técnicas de ciencias biológicas, por ejemplo, para la cicatrización de heridas.

10

ANTECEDENTES

El campo de la ingeniería de tejidos tiene el objetivo de regenerar o reemplazar el tejido perdido por enfermedad o lesión mediante la implantación de células cultivadas. La mayoría de las células que son útiles para este propósito dependen de la adhesión, lo que significa que no sobrevivirán a menos que estén unidas a algún tipo de superficie sólida. Dentro del cuerpo humano, las células dependientes de la adhesión se fijan a un material de andamiaje natural conocido como matriz extracelular (MEC). Por lo tanto, un implante de ingeniería tisular comprende típicamente células que se han sembrado en un andamio artificial.

20 Algunos avances recientes en el campo de la ingeniería de tejidos se han centrado en materiales poliméricos sintéticos que son compatibles con la adhesión celular. Dado que muchos materiales polimerizables sintéticos, por ejemplo, poli(metacrilato de hidroxietilo) (pHEMA) son repelentes celulares, dichos materiales pueden incorporar típicamente biopolímeros tales como colágeno, laminina, fibronectina, ácido hialurónico u otras proteínas y/o polisacáridos calculados para mejorar la adhesión celular. Como alternativa, se pueden injertar en el hidrogel restos de unión celular específicos tales como motivos de péptidos de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) para conferir potencial de adhesión celular.

30 Las queratinas encontradas en el cabello humano y de otros animales han atraído el interés como potencial biomaterial. Sin embargo, las queratinas están estrechamente unidas entre sí de manera que la recuperación de biomoléculas de queratina es difícil.

RESUMEN

Una realización de la invención es un proceso para fabricar un hidrogel que comprende colocar cabello humano en una solución reductora que los rompe enlaces intermoleculares entre las proteínas de queratina en el cabello, exponer la solución a un agente oxidante, y eliminar la solución reductora, dejando un hidrogel que comprende una red de queratinas reticuladas entre sí con enlaces disulfuro.

Una realización de la invención es un sistema de material que comprende biomoléculas de cabello humano reticuladas intermolecularmente con enlaces disulfuro para formar un hidrogel de acuerdo con la reivindicación 6.

40

Una realización de la invención es un sistema biomédico para su uso en el tratamiento de una herida de acuerdo con la reivindicación 10.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

45

La Figura 1 es una fotografía de una lámina de hidrogel queratinoso con discos cortados a partir de la misma y retirados usando un punzón de biopsia dérmica de 6 mm de diámetro;

la Figura 2A es un montaje de fotomicrografía que muestra una comparación en paralelo de microesferas de hidrogel de biomoléculas de cabello desnaturalizadas (lado izquierdo) y perlas de poliestireno recubiertas de colágeno (lado derecho) (aumento original de 10x); las microesferas de hidrogel tienen aproximadamente el doble del tamaño de las perlas comerciales de 125-212 μm ;

la Figura 2B es una fotomicrografía de una microesfera de hidrogel de biomoléculas de cabello desnaturalizadas en la que los fibroblastos humanos marcados por fluorescencia se fijan a la superficie (la autofluorescencia del propio hidrogel interfiere con la visión de las células, que en esta imagen se puede ver rodeando completamente la superficie de las microesferas);

55

la Figura 3 representa un filamento de hidrogel que se extruye a través de una boquilla de una jeringa;

la Figura 4 representa un cabello con un recubrimiento de hidrogel uniforme y liso;

la Figura 5 es un montaje de fotomicrografía que muestra una capa de contacto de herida de malla de nylon sin tratar (lado izquierdo) que no era adhesiva a las células, pero proporcionó una adhesión celular lista después de que la malla se recubriera con un hidrogel de biomoléculas de cabello desnaturalizadas con modificación de superficie

60

- con fibronectina (lado derecho);
 las Figuras 6A a 6G representan diversas formas para un hidrogel;
 la Figura 7 representa una construcción de cabello para cultivo e implantación capilar;
 la Figura 8 representa un sistema de tratamiento de heridas; y
 5 la Figura 9 representa un sistema alternativo de tratamiento de heridas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Una realización de la invención es un hidrogel fabricado de biomoléculas de cabello desnaturalizadas,
 10 concretamente, queratinas y las demás biomoléculas encontradas en el cabello humano. Este hidrogel puede fabricarse en forma pura con queratina no derivatizada que está libre de materiales no autólogos, pero no obstante es fuerte y flexible.

En contraste, se cree que los enfoques convencionales basados en el uso de una queratina pura o materiales puros
 15 a base de cabello no proporcionan un hidrogel, y están además limitados a materiales diferentes de hidrogel que son débiles y frágiles. Los enfoques convencionales alternativos requieren añadir grupos químicos a la queratina o mezclar materiales sintéticos exógenos con las queratinas para fabricar un material que sea más que meramente suelto y frágil.

20 *Introducción y descripción*

En general, hay dos enfoques para extraer proteínas del cabello, que es excepcionalmente resistente a los disolventes debido a su estructura química reticulada con disulfuro (cistina). Un enfoque es romper los enlaces disulfuro intermoleculares por oxidación (cistina a ácido cisteico) y el otro es romper los enlaces disulfuro por
 25 reducción (cistina a cisteína). El proceso de oxidación comienza con la exposición del cabello a un agente oxidante que convierte cada disulfuro en dos grupos sulfato, es decir, residuos de ácido cisteico. Una vez oxidado, típicamente con ácido peracético, el cabello debe aclararse sin exceso de agente oxidante y posteriormente solubilizarse y extraerse en condiciones alcalinas, a menudo con un agente reductor añadido para escindir de forma reductora las reticulaciones de disulfuro intactas restantes. Un ejemplo de este procedimiento se describe en la
 30 Patente de Estados Unidos N.º 6.159.496 de Blanchard, *et al.*, titulada "Keratin-Based Hydrogel for Biomedical Applications and Method of Production".

Blanchard, *et al.* describen además la obtención de hidrogel extrayendo cabello oxidado con tioglicolato. Los hidrogeles relacionados con el hidrogel de Blanchard se describen, por ejemplo, en *Journal of Biomedical Materials*
 35 *Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 90B, páginas 45-54, 2009 de T. Aboushwareb, *et al.*, titulado "A Keratin Biomaterial Gel Hemostat Derived from Human Hair: Evaluation in a Rabbit Model of Lethal Liver Injury" obtenido con un método similar. El método de extracción con tioglicolato imparte grupos aniónicos hidrófilos producidos químicamente a las proteínas de queratina en forma de derivatización de cisteína-disulfuro de tioglicolato. El término derivatizado, como se usa en el presente documento, se refiere a hacer una sustitución o adición permanente en un
 40 grupo químico. La posterior formación de hidrogel basada en la regeneración oxidativa natural de los enlaces disulfuro en la queratina solubilizada de este modo proporciona típicamente solamente un gel débil debido a la pérdida de un porcentaje sustancial de grupos sulfhidrilo disponibles mediante dicha derivación de tioglicolato.

El enfoque de agente reductor solamente es menos eficaz a menos que se realice usando condiciones de
 45 desnaturalización de proteínas fuertes tales como una alta concentración de urea, que rompe los enlaces de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares. Sin embargo, se puede usar tioglicolato solo (por ejemplo, solución acuosa de tioglicolato de amonio) para obtener las fracciones más fácilmente extraíbles de proteínas capilares. Este es el mismo reactivo usado de forma altamente diluida en salones de belleza para suavizar el cabello para crear una "permanente", que luego se "ajusta" a un estilo deseado mediante la neutralización del agente reductor con peróxido
 50 de hidrógeno diluido.

Un reactivo eficaz para la escisión reductora de enlaces disulfuro de proteína de queratina es el mercaptoetanol, un reactivo comúnmente empleado en bioquímica analítica para solubilizar proteínas reticuladas con disulfuro. Un protocolo bien establecido para obtener un alto rendimiento de todos los constituyentes del cabello, excepto los más
 55 intratables, se conoce como el "Método Shindai" descrito en Nakamura, *et al.* titulado "A Rapid Extraction Procedure of Human Hair Proteins and Identification of Phosphorylated Species", *Biol Pharm Bull*, 25(5), 569-572, 2002. Este método implica la extracción de cabello en una solución tamponada a pH 8,5 que contiene urea 5 M, tiourea 2,5 M y mercaptoetanol al 5 % a 50 °C durante 3 días. El método Shindai se ha empleado en la preparación de películas porosas diferentes de hidrogel compuestas por queratina en forma de partículas, filamentos y estructuras porosas
 60 que se describen en Fujii, *et al.* titulado "Convenient Procedures for Human hair Protein Films and Properties of

Alkaline Phosphatase Incorporated in the Film", Biol Pharm Bull, 27(1), 89-93, 2994.

El tratamiento con el método Shindai de una muestra de cabello da como resultado un cabello desnaturalizado en un disolvente de la solución de Shindai. Sin embargo, este soluto solo puede mantenerse en solución en un entorno químico extremo; existe el problema de no poder mantener las proteínas extraídas en solución tras la eliminación del mercaptoetanol. La diálisis para eliminar la urea, la tiourea y el mercaptoetanol, por ejemplo, da como resultado la precipitación de una porción sustancial de las proteínas disueltas. Además, cualquier intento de dilución del extracto de proteína Shindai con un volumen igual mayor que el de la misma concentración de mercaptoetanol en ausencia de urea también causa precipitación. Como resultado, los tipos de materiales que se pueden fabricar con queratina recuperada por el método Shindai son significativamente limitados. Dado que estos materiales tendían a precipitar, por ejemplo, podían convertirse fácilmente en películas de proteínas agregadas. Pero no se sabía cómo transformar las proteínas procesadas por un método Shindai en un hidrogel.

Hidrogeles

15 Sin embargo, por casualidad, se descubrió que el cabello en una solución de Shindai podría tratarse de manera que pudiera formar un hidrogel. El descubrimiento fue que la exposición a una pequeña cantidad de aire y concentración de la solución crearía un hidrogel fuerte, flexible y elástico. Experimentos adicionales indican que se pueden usar diversos agentes oxidantes, además, o además del oxígeno en el aire. El hidrogel se puede fabricar que sea firme y elástico para que tenga buenas propiedades de manipulación, conformación, procesamiento y uso como biomaterial. Pruebas adicionales han demostrado su utilidad para el cultivo celular y otras aplicaciones. Todas las propiedades se pueden lograr con un hidrogel puro de biomoléculas de cabello desnaturalizadas que esté libre de materiales exógenos y/o derivatizantes y sea muy adecuado para tratamientos autólogos y cultivos celulares.

25 Ciertas realizaciones de la invención se refieren a un hidrogel que comprende biomoléculas de cabello desnaturalizadas reticuladas intermolecularmente con enlaces disulfuro para formar un hidrogel. Una ventaja del uso de estas proteínas y biomoléculas asociadas es que no se derivatizan. Las proteínas están en una forma soluble sin el uso de tioglicolato u otros reactivos que imparten modificación química a las proteínas o interfieren con la accesibilidad de los grupos funcionales sulfhidrilo naturales.

30 Un hidrogel es una red de cadenas poliméricas hidrófilas reticuladas que son insolubles en agua. Los hidrogeles pueden contener una gran cantidad de agua, por ejemplo, más de aproximadamente el 40 %. Por el contrario, una agregación de proteínas o una película de biomoléculas aglomeradas no es un hidrogel. El término reticulado significa que las cadenas de polímero tienen un promedio de más de aproximadamente dos enlaces a otra cadena. 35 Las reticulaciones pueden ser físicas o químicas. El término físico se refiere a enlaces hidrófobos-hidrófilos, se une a través de polaridad o fuerzas de Van der Waals, efectos de agregación o coacervación, y unión iónica o formación de complejos iónicos. El término químico se refiere a enlaces covalentes y disulfuro. Los enlaces covalentes son química y funcionalmente distintos de los enlaces físicos, y estas diferencias tienen implicaciones para la estructura y función del hidrogel, incluidas la solubilidad, durabilidad, módulo elástico, degradabilidad e hinchamiento.

40 El carácter de una red de hidrogel contribuye a las propiedades físicas de un hidrogel tal como la resistencia, el módulo elástico y la flexibilidad. La red son los polímeros que se reticulan entre sí para formar el hidrogel. La distancia entre reticulaciones se refiere a la flexibilidad y el número y la naturaleza de las reticulaciones se refiere a la fuerza. El módulo de Young (también denominado módulo de elasticidad, o módulo) es una relación entre el esfuerzo (fuerza por unidad de área) y la deformación (cambio de longitud por longitud) y tiene unidades de fuerza por área, típicamente Newtons por metro cuadrado, abreviado como Pa (para Pascal). La red puede tener un módulo, con adiciones adicionales al hidrogel que alteran el módulo u otras propiedades del material global hasta cierto punto. El módulo de una red puede determinarse midiéndolo en ausencia de cualquiera de tales adiciones adicionales.

50 Los hidrogeles pueden fabricarse con un módulo de más de aproximadamente 100 Pa. A modo de comparación, otros módulos son: menos de 1 kPa para un gel de agarosa hinchado típico, aproximadamente 0,7 kPa para la mayoría de las formulaciones de consumo de JELL-O, de aproximadamente 0,1 a 1 kPa para el tejido cerebral, de aproximadamente 8 a 17 para el tejido muscular, aproximadamente 25 kPa para un gel de colágeno típico, y 55 aproximadamente $15(10)^6$ kPa para el hueso. Los hidrogeles de biomoléculas capilares descritos en el presente documento pueden proporcionarse con una diversidad de comportamiento elástico, por ejemplo, de aproximadamente 100 Pa a aproximadamente 100 kPa; los expertos apreciarán inmediatamente que se contemplan todos los intervalos y valores dentro del intervalo explícitamente establecido, por ejemplo, más de aproximadamente 100 Pa o de aproximadamente 100 Pa a aproximadamente 100 kPa, o más de aproximadamente 500 Pa. Los 60 hidrogeles pueden fabricarse flexibles, un término que, como se usa en el presente documento, significa que tienen

una flexibilidad para la manipulación manual sin desgarrarse o romperse. La prueba de flexibilidad es preparar una muestra de 1 cm de ancho por 5 cm de largo por 1 mm de alto, y suspender la muestra por un área en un extremo de 0,5 cm por 0,5 cm. Si la muestra se rompe o se desgarran, no es flexible. El hidrogel puede fabricarse plegable; la muestra rectangular de 5 cm de largo puede doblarse sobre sí misma para que los extremos cortos del rectángulo se encuentren sin romper o desgarrar el hidrogel.

Las biomoléculas de cabello desnaturalizadas se pueden preparar con el método Shindai, que implica colocar cabello en una solución tamponada a pH 8,5 de urea de aproximadamente 5 M, tiourea de aproximadamente 2,5 M y mercaptoetanol aproximadamente al 5 % a aproximadamente 50 °C durante al menos aproximadamente 2 días para reducir el cabello. El término biomolécula de cabello desnaturalizada se refiere a una biomolécula derivada del cabello mediante un proceso que rompe los enlaces de reticulación en el cabello natural. Estas biomoléculas capilares incluyen queratinas que se sabe que están presentes en una muestra de cabello humano, así como otras proteínas y materiales. Las moléculas capilares pueden filtrarse opcionalmente para eliminar componentes de peso molecular relativamente bajo, por ejemplo, con un límite de 5.000 a 20.000 daltons; los expertos apreciarán inmediatamente que se contemplan todos los intervalos y valores dentro de los intervalos explícitamente establecidos, por ejemplo, un límite de peso molecular de aproximadamente 10.000. En general, una muestra de cabello (humano u otro mamífero) se coloca en una solución de tratamiento con un agente reductor y un desnaturalizante. El cabello se deja en la solución hasta que se disuelva una porción visiblemente sustancial, por ejemplo, de 10 a 100 horas (los expertos apreciarán inmediatamente que se contemplan todos los intervalos y valores dentro de los intervalos explícitamente establecidos) y la porción restante se puede descartar. La solución se puede calentar, por ejemplo, entre 30 °C y 100 °C; los expertos apreciarán inmediatamente que se contemplan todos los intervalos y valores dentro de los intervalos explícitamente establecidos, por ejemplo, a aproximadamente 50 °C. La solución de tratamiento es una mezcla química que es eficaz para reducir y desnaturalizar el cabello en condiciones reductoras. Puede tener uno o más agentes reductores, por ejemplo, mercaptoetanol, tiourea y compuestos que tienen un grupo tiol. El desnaturalizante es una solución fuerte de uno o más desnaturalizantes. Los ejemplos son urea y tiourea. Los desnaturalizantes y agentes reductores pueden estar presentes a una concentración de al menos aproximadamente 2 % v/v para un líquido y al menos aproximadamente 0,5 M para un sólido.

El Ejemplo de trabajo 1 (véase la Figura 1) describe un hidrogel preparado mediante estas técnicas. La muestra de cabello se preparó en una solución de tratamiento que desnaturalizó y redujo la muestra de cabello. La solución de tratamiento se concentró y se expuso a un agente oxidante. Los hidrogeles resultantes se lavaron a fondo para eliminar toda la solución de tratamiento y otros productos químicos. La etapa de concentración se puede realizar para llevar la solución al punto donde la urea comienza a cristalizar. Se desea una alta concentración de solución de proteína capilar desnaturalizada para lograr un hidrogel de alto módulo. Una técnica es realizar el proceso repetidamente y establecer tiempos y/o volúmenes de líquido cuando se alcanza este punto. Otro enfoque es monitorear visualmente el proceso de concentración y buscar señales de que la cristalización está a punto de producirse. Opcionalmente, una etapa adicional para facilitar adicionalmente la concentración antes de las etapas de oxidación y lavado es inducir la formación de cristales de urea en la solución de tratamiento no concentrada mediante enfriamiento a 4 °C y almacenamiento a esta temperatura hasta que se produzca la cristalización de la urea. Se descubrió que el enfriamiento de la solución de tratamiento y la eliminación de una porción del contenido de urea original a través de cristalización inducida por frío no provoca la precipitación del cabello solubilizado. Después, la solución fría se filtra o se decanta de los cristales y el sobrenadante se somete a ultrafiltración para dar una solución concentrada que puede concentrarse adicionalmente por evaporación en mayor grado de lo que sería posible sin esta etapa adicional, es decir, se puede evaporar más líquido antes de la aparición de cristales de urea residual. Otro enfoque se demuestra en el Ejemplo 3, que proporciona la concentración por disolvente/eliminación de disolvente. La solución de tratamiento se expuso a otro disolvente que, sin quedar ligado a una teoría particular, aparentemente eliminó algunas porciones de la solución de tratamiento, probablemente mercaptoetanol. El proceso de oxidación puede realizarse en un ambiente húmedo (por ejemplo, al 100 % de humedad relativa) para evaporar preferiblemente solventes no acuosos y permitir que el oxígeno ambiental permee la solución durante un período de tiempo prolongado (por ejemplo, durante una noche) sin causar un secado excesivo que de lo contrario inducirá la cristalización de urea no deseada.

En el Ejemplo 1, las muestras se expusieron al aire vertiéndose sobre una superficie y se dejaron secar parcialmente. Otras se expusieron adicionalmente a un agente oxidante (peróxido de hidrógeno) durante una etapa posterior de rehidratación. En el Ejemplo 3, la solución concentrada (HPE_c) en forma de gotitas suspendidas en aceite se expuso a un agente oxidante mezclado con el aceite (por ejemplo, peróxido de benzoilo) y probablemente también experimentó oxidación por transferencia de mercaptoetanol fuera de la fase acuosa hasta la fase oleosa. El oxígeno en el aire es un agente oxidante y también está presente disuelto en agua y, en menor medida, en aceite vegetal. Además del peróxido de hidrógeno, otros agentes oxidantes solubles en agua pueden ser, por ejemplo,

persulfato potásico, permanganato potásico, ácido perclórico, sales de cromato y dicromato, y ozono. Los agentes oxidantes útiles que tienen cierta solubilidad en aceite, especialmente aceites vegetales, incluyen peróxido de benzoílo, hidroperóxido de t-butilo e hidroperóxido de cumeno. La concentración de agente oxidante se puede controlar para proporcionar una cantidad limitada al cabello en la solución de tratamiento, por ejemplo, limitando el agente a la exposición a oxígeno gaseoso que debe transferirse de la fase gaseosa al disolvente líquido. Otra opción es usar un agente oxidante líquido o sólido a una concentración de aproximadamente el 3 % en el caso del peróxido de hidrógeno en agua y aproximadamente el 0,5 % en el caso del peróxido de benzoílo en aceite vegetal. Las realizaciones incluyen procesos donde el agente oxidante, antes de combinarse con la solución reductora, es un líquido o un sólido a 20 °C y se pone en la solución reductora a una concentración de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 5 % en volumen si es líquido, y del 0,25 % a aproximadamente el 2 % en peso por volumen si es sólido.

El ejemplo 2 demuestra cómo otros materiales derivados del cabello no pudieron convertirse en un hidrogel. Se obtuvieron productos capilares generados por oxidación del cabello y se trataron de la misma manera que los productos capilares usados en el Ejemplo 1. No obstante, solamente se obtuvo un material débil similar a la gelatina. Sin quedar ligado a una teoría particular, se cree que el proceso de oxidación inicial usado para hacer que el cabello sea soluble ha derivatizado sustancialmente las queratinas en el cabello, hasta el punto de que no quedaban suficientes sulfhidrilos libres para formar una concentración adecuada de enlaces disulfuro requeridos para la formación de hidrogel.

Los hidrogeles también se formaron como partículas. El Ejemplo 3 (véase la Figura 2A) detalla un proceso para fabricar microesferas. El cabello en una solución acuosa de tratamiento se concentró y se dispersó como gotitas en un medio hidrófobo (o fase continua, siendo las gotitas la fase dispersa). Un agente oxidante estaba presente en la fase hidrófoba. Las biomoléculas de cabello desnaturalizadas en la solución dispersa se convirtieron en hidrogeles. Se pueden usar otros procesos para formar gotitas, por ejemplo, emulsiones o pulverizaciones. Por ejemplo, la solución de tratamiento con el cabello se puede pulverizar a través del aire u otra fase gaseosa. Estos procesos se pueden controlar para fabricar materiales de un tamaño deseado, por ejemplo, controlando los tamaños y las velocidades de las boquillas. O la agitación y la mezcla se pueden controlar para hacer dispersiones de gotitas de un tamaño deseado. Los ejemplos del tamaño de partícula son: una partícula con una longitud que pasa a través de un punto central de 1 µm a 1 mm; los expertos apreciarán inmediatamente que se contemplan todos los intervalos y valores dentro de los intervalos explícitamente establecidos, por ejemplo, esferas de 10 µm a 100 µm de diámetro. Otros métodos para fabricar una partícula son picar, trocear o troquelar trozos de un hidrogel, por ejemplo, picar una lámina de hidrogel para formar partículas.

Los hidrogeles también se formaron como filamentos. Las hebras delgadas de hidrogel se pueden extruir desde una boquilla, como se demuestra en el Ejemplo 4 (véase la Figura 3). Las hebras se formaron de manera independiente o con una varilla interior o fibra (véase la Figura 4). Un proceso para formar los filamentos puede comprender añadir dimetilsulfóxido (DMSO) u otro disolvente de naturaleza similar que sea sustancialmente soluble en agua, por ejemplo, formamida, dimetilformamida, 2-metil-N-pirrolidinona (también conocida como NMP) y dioxano. Las hebras pueden procesarse adicionalmente. Un ejemplo es un material fabricado de una pluralidad de hebras. Los filamentos pueden estar rodeados por otro hidrogel o mezclados con otros materiales. Una realización es una matriz para aplicaciones de cultivo celular o ingeniería de tejidos.

Se puede hacer que los hidrogeles estén sustancialmente libres de reticulaciones químicas además de los enlaces disulfuro en el hidrogel. El término sustancialmente libre, en este contexto, significa que no hay, o solo hay un pequeño porcentaje con respecto a los enlaces disulfuro, otros agentes de reticulación presentes en el hidrogel: por ejemplo, no más de aproximadamente el 5 % de otras reticulaciones químicas; los expertos apreciarán inmediatamente que se contemplan todos los intervalos y valores dentro de los intervalos explícitamente establecidos, por ejemplo, no más del 0,1 % o no más del 1 %. El número de enlaces disulfuro en un hidrogel puede aproximarse para estos fines estimando el número total de residuos de cisteína y suponiendo que todos están implicados en un enlace disulfuro.

Los hidrogeles pueden estar sustancialmente libres de agentes de reticulación exógenos. Dichos agentes son compuestos con al menos dos grupos funcionales que son capaces de unirse a una queratina. Los ejemplos de agentes de reticulación exógenos o sus grupos funcionales son glutaraldehídos, formaldehídos, succinimidas y maleimidas. Estos no son necesarios para fabricar hidrogeles como se describe en el presente documento. El término sustancialmente libre, en este contexto, significa que no hay, o solo hay un pequeño porcentaje de dichas reticulaciones con respecto a los enlaces disulfuro: por ejemplo, no más de aproximadamente el 5 %; los expertos apreciarán de inmediato que se contemplan todos los intervalos y valores dentro del intervalo explícitamente establecido.

Los hidrogeles pueden estar sustancialmente libres de grupos sulfhidrilo derivatizados. Por ejemplo, pueden estar libres de ácido sulfónico y/o ácido sulfínico y/o ácidos cisteicos (es decir, ácidos de un sulfhidrilo en un aminoácido de cisteína). También pueden estar sustancialmente libres de sulfhidrilos oxidados permanentemente, lo que significa que no hay ninguno, o no es suficiente para evitar la formación de un hidrogel firme con un módulo de más de aproximadamente 5 Pa como se describe en el presente documento. Los residuos de cisteína del hidrogel pueden disponerse sustancialmente como participantes en un enlace disulfuro o sulfhidrilos libres.

Los hidrogeles pueden estar fabricados de manera que estén hechos sustancialmente de biomoléculas capilares. El pelo de un paciente se puede usar, tratar y devolver al paciente como un biomaterial sin la adición de biomoléculas de cabello no autólogas y/o sin ningún material no autólogo. Las realizaciones incluyen hidrogeles fabricados con al menos el 90 % de biomoléculas capilares; los expertos apreciarán inmediatamente que se contemplan todos los intervalos y valores dentro de los intervalos explícitamente establecidos, por ejemplo, al menos aproximadamente el 95 %, o al menos aproximadamente el 98 %. Los porcentajes se pueden calcular como p/p en seco, lo que significa que el peso en seco de la porción diferente de cabello se representa como un porcentaje del peso en seco total del hidrogel.

Incorporación de agentes terapéuticos y materiales bioactivos

Se puede incluir un agente terapéutico en un hidrogel. Un método es añadir el agente durante la fabricación. Otro proceso es cargar el agente en el hidrogel después de su formación, por ejemplo, hinchándolo en un primer disolvente que contiene el agente y deshinchándolo en un segundo disolvente. Los ejemplos de agentes son antibióticos, antimicóticos, agentes anticancerosos, esteroides antiinflamatorios y no esteroideos, fármacos de moléculas pequeñas, biomoléculas bioactivas, y factores de crecimiento, incluyendo factores de crecimiento que inducen la formación de hueso nuevo, vasos sanguíneos, tejido conjuntivo, tejido neural, y los que aceleran la curación, tales como los factores derivados de las plaquetas.

Los materiales bioactivos se pueden combinar con los hidrogeles durante y/o después de la formación de hidrogel. Además, en algunas aplicaciones es beneficioso unir los agentes y/o materiales al exterior de un hidrogel, ya sea covalentemente o por adsorción. Los espaciadores útiles y los protocolos de adhesión se describen, por ejemplo, por Greg T. Hermanson en un libro titulado "Bioconjugate Techniques", 1996, Elsevier Science, Academic Press, incorporado por la presente en el presente documento por referencia. Muchos de estos esquemas implican hacer reaccionar un grupo funcional nucleófilo, tal como una amina o tiol con un grupo electrófilo, por ejemplo, ácido maleico o éster de succinimida. Otros grupos funcionales para la reacción son hidroxilos y carboxilos. El Ejemplo 6 detalla una realización de un hidrogel modificado con fibronectina que se usó con éxito para la adhesión celular y el cultivo.

Algunos materiales bioactivos son útiles para la adhesión celular u otros usos. Los ejemplos incluyen laminina, fibronectina, vitronectina, fibrina, MATRIGEL[®], moléculas de matriz extracelular o fragmentos de unión específica de células de cualquiera de estos. Ejemplos adicionales son péptidos de adhesión celular o fragmentos de unión celular, por ejemplo, que comprenden el tripéptido RGD. Se describe una descripción adicional de la modificación de hidrogel con el propósito de interacción con células por Salinas CN and Anseth KS, "The influence of the RGD peptide motif and its contextual presentation in PEG gels on human mesenchymal stem cell viability", J Tissue Eng Regen Med. 2008 Jul;2(5):296-304, incorporado por la presente en el presente documento por referencia.

Se pueden usar algunas técnicas de unión que aprovechan la abundancia de enlaces sulfhidrilo y disulfuro disponibles para la reacción. El ejemplo 5 detalla tal proceso. Las biomoléculas añadidas tienen uno o más sulfhidrilos libres para la reacción y están expuestas a los hidrogeles junto con un agente reductor. Como alternativa, se introduce un espaciador con un tiol, estando disponible otro grupo en el espaciador para la reacción posterior. Las realizaciones para la adhesión incluyen mezclar una molécula tiolada (por ejemplo, biomolécula, molécula sintética, polímero, biopolímero) con un agente reductor y exponer un hidrogel a la molécula tiolada reducida y un agente reductor. La molécula tiolada puede ser bioactiva y/o puede ser un espaciador con un grupo funcional para una reacción adicional (por ejemplo, amina, carboxilo, hidroxilo). Los ejemplos de espaciadores son polímeros, polímeros hidrófilos, por ejemplo, polietilenglicol y ácido poliacrílico, y polímeros hidrófobos, por ejemplo, alcanos.

Incorporación de materiales vivos

Las células pueden integrarse con los hidrogeles. Un enfoque implica preparar un hidrogel y exponerlo a las células. Las células se pueden unir y también crecer en los hidrogeles. Los hidrogeles pueden ser planos o curvados, por ejemplo, una lámina o una microsfera. Los hidrogeles pueden ser biomoléculas de cabello esencialmente puras o

pueden incluir además otros materiales, por ejemplo, moléculas de adhesión celular. El Ejemplo 6 (véase la Figura 5) detalla una realización de un hidrogel modificado utilizado con éxito para la adhesión celular y el cultivo.

- 5 Los ejemplos de células incluyen fibroblastos, células de papila dérmica, queratinocitos, células epiteliales, células progenitoras y células madre. Cuando se ponen en un paciente, las células pueden ser autólogas para el paciente, aunque también se podrían cultivar otras células. Las aplicaciones que implican células madre pluripotentes de tejidos particulares se detallan a continuación, por ejemplo, células madre pluripotentes adiposas, células madre pluripotentes epidérmicas, y células madre pluripotentes dérmicas.
- 10 En algunas realizaciones, se usa un hidrogel como se describe en el presente documento para unir células madre. Las células madre pueden ser, por ejemplo, células madre adultas. En otra realización, las células madre usadas son células madre adultas autólogas. Se pueden obtener células útiles para este propósito a partir de aspirado de liposucción y/o folículos capilares. También se pueden obtener a partir de médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre menstrual, placenta, tejido amniótico, músculo y otras fuentes.

15 *Hidrogeles conformados y compuestos*

- Los hidrogeles se pueden preparar en una diversidad de formas y tamaños, por ejemplo: láminas, varillas, partículas, esferas, filamentos y discos. Los hidrogeles también pueden formarse sobre o alrededor de otros materiales. Las opciones para fabricar materiales incluyen preparar un molde y verter el cabello en una solución concentrada de tratamiento en el molde, donde el hidrogel se fraguará y se conformará en la forma del molde. El hidrogel puede incluir además otros materiales que están recubiertos o encapsulados. Por ejemplo, un cabello o un polímero pueden estar recubiertos o rodeados con un hidrogel. O un primer material puede estar recubierto o encapsulado dentro del hidrogel. Por ejemplo, una malla o lámina puede estar recubierta con el hidrogel.

- 20 La Figura 6 representa algunas realizaciones de un hidrogel. La Figura 6A representa la lámina de hidrogel 60. La Figura 6B representa la lámina 60 que encapsula la malla 62, que está completamente encerrada. La Figura 6C representa la varilla 64 de un material rodeado en torno a una porción de su longitud por hidrogel translúcido 66. La Figura 6D representa una colección 68 de microesferas de hidrogel 70. La Figura 6E representa el filamento de hidrogel 72. La Figura 6F representa hidrogeles con forma de varilla 74 encapsulados dentro del material 76, por ejemplo, otro hidrogel del mismo o diferente material. La figura 7G representa partículas de hidrogel 78.

Aplicaciones para el crecimiento del cabello

- 35 La restauración quirúrgica cosmética del cabello es una tecnología comprobada que en Estados Unidos genera más de 800 millones de dólares en ingresos al año. Este procedimiento simplemente cosecha los folículos de la parte posterior de la cabeza y los implanta en el frente. Claramente esto no crea cabello nuevo; simplemente redistribuye la cantidad limitada de folículos capilares localizados en la franja permanente del cabello (en hombres) que es resistente a la calvicie de patrón. Se ha propuesto la multiplicación del cabello mediante la cual solo se cosechan unos pocos folículos, se extraen sus células madre, se cultivan las células para que crezcan más, y luego las células madre multiplicadas se convierten en miles de implantes que inducen folículos. Desde finales de la década de 1990, se han realizado especulaciones y pronunciamientos autoritarios de que la restauración capilar a base de células es inminentemente factible, pero, de hecho, no ha sido posible.
- 45 Aunque las células necesarias para lograr la neogénesis del folículo piloso se pueden obtener por medios conocidos, actualmente existe una falta de tecnología habilitadora para crear una construcción celular eficaz. Se necesita la habilitación del ensamblaje de células madre en implantes inductores de folículos capilares para la creación de nuevos folículos capilares (neogénesis folicular).
- 50 Los métodos y materiales descritos en el presente documento abordan este problema y proporcionan un recubrimiento para un implante percutáneo sobre el cual se pueden sembrar células madre dérmicas y epidérmicas en capas concéntricas. La figura 7 es una vista en sección transversal de una construcción celular inductora de folículos capilares compuesta por un cabello (por ejemplo, cabello del paciente) recubierto con un hidrogel derivado de cabello (opcionalmente autólogo) y luego invertido primero con una capa concéntrica de células madre epiteliales derivadas del folículo capilar autólogas y en segundo lugar con una capa concéntrica de células madre de papila dérmica (mesenquimales). La construcción 100 tiene el cabello 102 recubierto con el primer hidrogel 104 y el segundo hidrogel 106. Primero, el hidrogel interior 104 comprende células madre foliculares epidérmicas. En segundo lugar, el hidrogel exterior 106 comprende células de papila dérmica.
- 60 Opcionalmente, todos o esencialmente todos los ingredientes son autólogos, proporcionando de este modo una

seguridad clínica mejorada. El corte del cabello puede proporcionar un núcleo de implante percutáneo y las proteínas para fabricar el hidrogel. Se puede usar sangre autóloga donada para proporcionar fibronectina para la adhesión celular-mejora de la modificación del hidrogel y los suplementos del factor de crecimiento que se pueden añadir a los medios de cultivo celular. Y una biopsia del cuero cabelludo proporciona folículos para el aislamiento y cultivo de células madre.

Una hebra de cabello es un material de partida preferido para fabricar un implante de construcción celular porque simula la tecnología comprobada del trasplante autólogo de folículo completo, en el que el tallo del cabello sobresale de la herida de implantación y posteriormente se desprende. Sin embargo, recubrir el cabello con una solución acuosa presenta un problema debido a la repelencia al agua natural del cabello. Por lo tanto, simplemente sumergir el cabello en una solución acuosa da como resultado un rebordeado en lugar de un recubrimiento. Este es un resultado no deseado porque el recubrimiento no es consistentemente delgado y distribuido. Como se describe en el presente documento, sin embargo, un hidrogel puede recubrirse uniformemente sobre un cabello u otra varilla. Las células inductoras de folículos pilosos se siembran de forma óptima en una capa concéntrica uniforme que es paralela al núcleo del tallo para replicar la microarquitectura de un folículo capilar natural.

Como alternativa, se puede usar un polímero o material en forma de varilla en lugar de cabello 102. O se puede usar un solo hidrogel que comprende células madre de diversos tipos. O un hidrogel podría usarse con células madre de cualquier lado. Se pueden usar otras moléculas o motivos de adhesión celular en lugar de la fibronectina.

Aplicaciones para un relleno dérmico

Actualmente, el mercado de los rellenos dérmicos cuenta con una amplia variedad de sustancias inyectables, sobre todo las que comprenden colágeno o ácido hialurónico y sus derivados. Ninguna de estas sustancias inyectables convencionales proporciona una corrección duradera de los defectos tisulares y arrugas. Más recientemente, ha habido un renovado interés en la transferencia de grasa autóloga para el rejuvenecimiento facial cosmético debido a la popularidad de la liposucción para la eliminación de grasa no deseada y mejoras en la tecnología de recolección de células madre de la aspiración de liposucción. La transferencia de grasa, sin embargo, adolece de una gran variabilidad en el logro de los efectos deseados debido a la imprevisibilidad de su persistencia. Además, la obtención de muestras de grasa adecuadas del paciente puede ser una etapa adicional no deseada.

Un reciente estudio de Natesan S, *et al.* titulado "Adipose Derived Stem Cell Delivery into Collagen Gels using Chitosan Microspheres", *Tissue Eng Part A*. Nov. 16, 2009 ha demostrado que las células madre derivadas de liposucción (derivadas de tejido adiposo) se pueden unir a microesferas para la supervivencia celular y el injerto. Un hidrogel de biomoléculas de cabello como se expone en el presente documento se puede proporcionar como microesferas y servir como un vehículo de administración para células madre adheridas, y/u otras células, para mejorar su supervivencia e injerto. Por ejemplo, pueden usarse en aplicaciones de transferencia de grasa y relleno dérmico.

Durante el uso, un hidrogel como se expone en el presente documento, opcionalmente en forma de partículas (por ejemplo, esferas), se cultiva con células derivadas de tejido adiposo. Las células pueden comprender células madre, o consistir esencialmente en células madre. Las células cultivadas se introducen en el paciente como una carga dérmica, típicamente por inyección. Adicionalmente, o como alternativa, pueden usarse hidrogeles sin células. Los hidrogeles pueden incluir opcionalmente agentes y/o factores de unión o crecimiento.

Aplicación en la cicatrización de heridas

Un apósito de terapia celular para acelerar la cicatrización de heridas crónicas, especialmente heridas diabéticas, es un área de terapia médicamente importante y muy necesaria. Las úlceras del pie diabético, que afectan al 15 % de todas las personas con diabetes en algún momento de sus vidas, son la principal causa de hospitalización entre los pacientes diabéticos y, a menudo, conducen a la amputación. Se estima que estas heridas le costarán al sistema de salud de Estados Unidos más de 5 billones de dólares al año.

Las velocidades de cicatrización para las úlceras del pie diabético tienen un promedio de 12 a 20 semanas en ensayos clínicos, pero en la práctica estas heridas a menudo nunca cicatrizan. Cuanto más tiempo permanezca abierta la herida, mayor es el riesgo de infección, agrandamiento de la herida, osteomielitis y, en última instancia, la necesidad de una amputación. Actualmente, la diabetes afecta a más de 20 millones de estadounidenses o al 7 % de la población. Más del 60 % de las amputaciones de extremidades no traumáticas en este país ocurrieron entre personas con diabetes. Otros tipos de heridas crónicas tales como úlceras por estasis venosa y úlceras por decúbito (llagas en la cama) también se pueden abordar mediante el método descrito en el presente documento.

Un problema algo relacionado son quemaduras graves. En este caso, el paciente previamente pudo haber tenido un buen estado de salud, pero la gravedad del trauma sobrepasa la capacidad del cuerpo para la cicatrización normal y el precio de la supervivencia son cicatrices desfigurantes. De hecho, la contracción de la herida y la formación de cicatrices son el extremo opuesto de la cicatrización anormal en comparación con las heridas crónicas. Sin embargo, ambos problemas implican una inflamación excesiva y una falta de cicatrización regenerativa. Los productos de terapia de células madre que usan el hidrogel descrito en el presente documento abordan estos problemas proporcionando mitigación de la inflamación excesiva y preparación del tejido lesionado para un proceso de cicatrización regenerativo ordenado con formación de cicatrices reducida.

Por consiguiente, una realización de la presente invención es un apósito que se pone en contacto con la herida para aplicarse sobre las heridas (por ejemplo, después del desbridamiento de la herida y el control de la infección, si se requiere). Las heridas pueden ser crónicas, diabéticas, ulcerosas, por estasis venosas o quemaduras, por ejemplo. El apósito puede comprender un hidrogel como se expone en el presente documento. El hidrogel puede comprender una célula y/o agente y/o factor como ya se ha descrito.

Una realización es cultivar células en el hidrogel y aplicar el hidrogel a la herida. El hidrogel pueden ser microesferas y las células pueden ser células madre; durante el uso, las células cultivadas se colocan en el sitio de la herida. Se puede aplicar una cobertura a continuación. Además, se puede colocar un recubrimiento sobre las partículas y en contacto íntimo con la herida. El recubrimiento puede ser permeable al aire y/o a los fluidos y no permeable a las células y/o las partículas. Por ejemplo, se puede aplicar una lámina de un hidrogel de biomoléculas de cabello a la herida después de que se hayan aplicado partículas del hidrogel portador de células. La hoja puede comprender una malla. La malla puede dimensionarse para contener las células madre o ser más abierta y permitir el paso de las células, pero contener micropartículas. La malla puede estar recubierta con un hidrogel que la encapsula completa o parcialmente. La malla puede tener, además, aberturas entre sus fibras recubiertas, siendo el hidrogel una capa fina adherente que no se puentea sobre los huecos de la malla.

Una realización de un sistema de apósito 200 se ilustra en la Figura 8. Las células madre aplicadas 202 están en contacto directo e íntimo con la superficie de la herida 204. Las células 202 están opcionalmente unidas al hidrogel de biomoléculas de cabello desnaturalizadas 208, que puede comprender una malla porosa 206. La siguiente capa del apósito es un material absorbente opcional 210 diseñado para absorber el fluido que emana de la herida 204 y a través de las capas porosas por debajo. El material 210 se puede cambiar a diario según sea necesario sin alterar las capas subyacentes, que pueden permanecer en contacto con la herida para estimular la cicatrización regenerativa. La capa superior 210 es un recubrimiento opcional. Durante el uso, las células recuperadas del paciente se cultivan en el hidrogel 208, que luego se aplica a la superficie de la herida 204. El material absorbente 210 se cubre y se asegura. El hidrogel 208 puede tratarse con materiales autólogos, por ejemplo: uno o más de suero autólogo, albúmina, fibronectina, fibrina, fibrinógeno, vitronectina, plasma sanguíneo y plaquetas.

Otra realización es un apósito en el que las células madre están unidas a un hidrogel en forma de microesferas. Como se ilustra en la Figura 9, las microesferas sembradas con células madre 220 se administran en primer lugar para proporcionar cobertura y contacto íntimo con la herida 222. Las células madre vivas liberan factores que estimulan la cicatrización de heridas (flechas F que apuntan a la herida) mientras permiten que el exudado de la herida (flechas E que apuntan hacia fuera de la herida) mane de la herida, a través de un hidrogel retentivo de microesferas aplicado 224 (líneas discontinuas) y hasta el material de apósito absorbente superpuesto 226. El hidrogel 224 comprende opcionalmente una malla, por ejemplo, nylon.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Formación de hidrogel

Un lote de extracto de proteína Shindai, que es una solución de extracto de proteína capilar (HPE), se concentró en una celda de ultrafiltración, usando una membrana de ultrafiltración de límite de 10.000 de peso molecular en una celda agitada AMICON® a 30 psi durante una noche. Se concentraron aproximadamente 50 ml de HPE hasta aproximadamente 5 ml de un concentrado de extracto de proteína capilar viscosa, en lo sucesivo en el presente documento "HPE_c", que tenía la consistencia y el color del sirope para tortitas. Después, el HPE_c se convirtió en hidrogel siguiendo las etapas a continuación:

1. Proporcionar HPE filtrado a través del método Shindai,
2. Concentrar el HPE por ultrafiltración para obtener HPE_c,
3. Recubrir el HPE_c sobre una superficie o sustrato,

4. Permitir que el HPE_c se seque al aire libre hasta la fase de sequedad, de tal forma que un secado posterior podría cristalizar la urea disuelta,

5. Hidratar la película secada al aire resultante exponiéndola a alta humedad o medios acuosos, que contienen opcionalmente un agente oxidante, por ejemplo, peróxido de hidrógeno,

5 6. Extraer exhaustivamente el hidrogel resultante con agua para eliminar toda la urea, tiourea y mercaptoetanol residuales.

El hidrogel obtenido mediante este proceso, después de secarse para dar un sólido en el aire, se rehidrata al remojarlo en agua desionizada para producir un gel que contiene de aproximadamente el 50 a aproximadamente el
10 60 % de agua. Un hidrogel de HPE_c totalmente hidratado es transparente como el cristal con una buena integridad física y se puede cortar en formas como se muestra en la Figura 1 o 6G.

Ejemplo 2. Fallo al formar un hidrogel

15 Los enfoques alternativos no dieron como resultado la formación de un hidrogel. Se fabricó un material mediante el mismo proceso que el expuesto en el Ejemplo 1, excepto que se usó cabello oxidado en lugar de HPE del método Shindai. Específicamente, un tratamiento con ácido peracético del cabello como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 6.159.496 provocó un blanqueo sustancial del cabello y un debilitamiento de las fibras. La posterior extracción y concentración a través de ultrafiltración según las etapas del Ejemplo 1 dio un rendimiento
20 inferior de un concentrado de menor viscosidad y una gelatina débil y friable. Este material no era un hidrogel con suficiente integridad física y resistencia para permitir el procesamiento en materiales de ensayo comparables con un hidrogel de HPE_c. El tratamiento oxidativo de la Patente de Estados Unidos N.º 6.159.496 probablemente causó un daño sustancial a las proteínas más allá de la simple oxidación de la cisteína al ácido cisteico.

25 Ejemplo 3. Micropartículas de hidrogel

Puede producirse un hidrogel de HPE_c (véase el Ejemplo 1) en forma de microesferas que pueden proporcionar un vehículo de administra para células madre unidas para mejorar su supervivencia e injerto en aplicaciones de transferencia de grasa y de relleno dérmico. Específicamente, se vertieron 1,5 ml de HPE_c en 250 ml de aceite de
30 cacahuete con mezcla a una velocidad moderada por medio de un impulsor de acero inoxidable accionado por un motor superior. Después de aproximadamente 2 horas, la agitación se detuvo y el aceite se mantuvo sin alteraciones. Después de sedimentar durante aproximadamente 4 horas, la mayor parte del aceite se decantó y la porción restante se examinó bajo el microscopio de disección y se descubrió que contenía esferas perfectamente formadas de hidrogel de HPE_c. Si desear quedar ligado a ninguna teoría específica, se puede racionalizar que las
35 gotitas de líquido se convierten en gel debido a la transferencia de mercaptoetanol de las gotitas al aceite o mediante la transferencia de oxígeno del aceite a las gotitas. Por lo tanto, cualquier alteración en la composición de la fase oleosa basada en dicha teoría que acelere esta conversión descubierta de HPE_c en microesferas de hidrogel, tal como la adición de un agente oxidante, está dentro del alcance de esta realización.

40 Por ejemplo, el procedimiento anterior se repitió con la adición de 10 ml de una solución al 10 % (p/v) de peróxido de benzoilo en tolueno con respecto al aceite. Las microesferas resultantes se recogieron más fácilmente en papel de filtro tras la filtración del aceite. Estas microesferas se aclararon con hexano para eliminar el aceite, se secaron y luego se resuspendieron en agua destilada. En la Figura 2A se muestra una muestra de las microesferas de hidrogel de HPE_c obtenidas mediante este procedimiento en comparación con microesferas de cultivo celular comercialmente
45 disponibles.

Ejemplo 4. Filamentos de hidrogel

Se realizó otro descubrimiento inesperado que permite que HPE_c se espese en un semisólido extruible. La adición
50 de dimetilsulfóxido (DMSO) a HPE_c dio como resultado inicialmente una disminución de la viscosidad, como se esperaba. Sorprendentemente, pronto hubo una inversión del adelgazamiento y la mezcla se espesó rápidamente.

Estos resultados permitieron un proceso de moldeo alrededor de un objeto. Al colocar un cabello dentro de una aguja hipodérmica de calibre 27 y expresar HPE_c espesado con DMSO a través de una jeringa unida, fue posible
55 expulsar el pelo de la aguja de manera que el cabello quedara uniformemente cubierto con gel y libre de perlas, como se muestra en la Figura 4. Someter dicho cabello recubierto al proceso mencionado anteriormente, Etapas 4, 5 y 6, hará que el DMSO soluble en agua se lixivie junto con los demás ingredientes de HPE_c que necesitan ser eliminados, proporcionando de este modo el andamio deseado para el cabello modificado por ingeniería tisular. Este andamio puede entonces procesarse adicionalmente según se desee para la modificación de la superficie con las
60 biomoléculas apropiadas.

El efecto inesperado y sorprendente de DMSO en HPE_c se ilustra adicionalmente simplemente por "hilado en seco" de un filamento del extremo de una jeringa que contiene este nuevo material. El filamento secado al aire se empapó en peróxido diluido, como se muestra en la Figura 3, y presentó una integridad física inesperada.

5

Ejemplo 5. Incorporación de biomoléculas

Las biomoléculas que contienen funcionalidad sulfhidrilo se pueden incorporar en una red de hidrogel de biomoléculas que comprenden grupos sulfhidrilo y/o enlaces disulfuro como se describe en el presente documento.

10 Por ejemplo, pueden usarse las siguientes etapas.

A. Proporcionar un hidrogel de HPE_c usando el proceso descrito en el Ejemplo 1,

B. Proporcionar una solución de biomoléculas donde la biomolécula contiene enlaces disulfuro inter y/o intramoleculares y/o grupos sulfhidrilo libres, por ejemplo, proteínas naturales o sintéticas,

15 C. Añadir mercaptoetanol u otro agente reductor de capacidad reductora similar a la solución de la etapa B,

D. Combinar la solución de la etapa C con el hidrogel de la etapa A y permitir que los materiales combinados se empapen durante un período de tiempo,

E. Retirar el hidrogel tratado de la etapa D de la solución de la etapa C, aclarar con agua o peróxido de hidrógeno diluido, y almacenar en isopropanol al 70 % u otro desinfectante adecuado hasta que se necesite para su posterior

20 procesamiento.

Ejemplo 6. Adhesión celular a hidrogel modificado superficial

Un proceso de modificación de hidrogel puede incluir injertar químicamente una molécula espaciadora sobre el hidrogel seguido de acoplamiento covalente de biomoléculas potenciadoras de la adhesión celular tales como

25 motivos RGD en los grupos terminales espaciadores colgantes. Por ejemplo, después de la Etapa 4 y antes de la Etapa 5 del Ejemplo 1, puede añadirse una solución de ácido mercaptoundecanoico (MUA) que contiene mercaptoetanol a pH alto al hidrogel de HPE_c. El extremo mercapto del MUA se une a la estructura reticulada de disulfuro mixto del gel y el extremo de ácido carboxílico es libre para la modificación química adicional para activarlo

30 hacia el injerto de biomoléculas potenciadoras de la adhesión celular.

Específicamente, la solución de HPE_c se revistió sobre un portaobjetos de vidrio y se cubrió con una pieza de malla de nylon (capa en contacto con la herida de 3M TEGADERM[®]). Se puso HPE_c adicional sobre la parte superior del nylon y se cepilló para dar un recubrimiento uniforme. El HPE_c se dejó secar solo hasta que el líquido se volvió

35 pegajoso. Después, se inundó una solución de MUA (5 mg/ml) en hidróxido de amonio 1 N que contenía mercaptoetanol al 5 % sobre la superficie del residuo de HPE_c y se dejó secar parcialmente para formar un compuesto. El material compuesto se empapó entonces en una solución acuosa al 3 % de peróxido de hidrógeno durante una hora para convertir la solución de HPE_c seca en hidrogel de HPE_c. Se preparó una muestra control de forma concomitante de la misma manera, excepto sin tratamiento con MUA. Las muestras se retiraron del vidrio y se

40 suspendieron en 3 litros de agua desionizada con agitación durante una noche para extraer todas las trazas de mercaptoetanol, urea y tiourea. Se cortaron discos (6 mm de diámetro) de cada muestra, se dejaron secar y luego se incubaron en una mezcla 9:1 (v/v) de acetona:agua que contenía 5 mg/ml de una carbodiimida soluble en agua (N,N'-etil-diisopropil carbodiimida) durante una hora. Las muestras se aclararon con tampón de fosfato estéril (PBS) y se incubaron con 1 mg/ml de fibronectina de suero bovino durante 20 minutos. Las muestras se aclararon de nuevo

45 con PBS, se pusieron en placas de cultivo de 24 pocillos revestidas con metacrilato de polihidroxietilo (en lo sucesivo en el presente documento "poliHEMA"). Las muestras se fijaron al fondo de los pocillos añadiendo en primer lugar metanol a los pocillos para aglutinar el poliHEMA, y luego dejando que el metanol se evaporase en la cabina de seguridad biológica. Después, las muestras se cubrieron con medios de cultivo compuestos por DMEM (medio de cultivo mínimo esencial de Dulbecco) que contenía el 10 % de FBS (suero bovino fetal) y se sembraron con

50 fibroblastos de prepucio humano que se habían preincubado con colorante fluorescente rojo CELL-TRACKER[®]. Como se muestra en la Figura 5, las muestras de este hidrogel proporcionaron un buen sustrato para la adhesión celular. Las muestras de control de nylon no tratado, nylon revestido con hidrogel de HPE_c sin ningún tratamiento adicional, y el nylon revestido con hidrogel de HPE_c incubado con fibronectina pero sin pretratamiento con MUA, no presentaron evidencia significativa de adhesión celular.

55

Ejemplo 7. Adhesión celular a microesferas de hidrogel de HPE_c

Las microesferas preparadas como se describe en el Ejemplo 3 se incubaron con colorante fluorescente rojo como se describe en el Ejemplo 6, excepto que los pocillos de la placa de 24 pocillos no se recubrieron con poliHEMA. En

60 cambio, tanto las células como las microesferas se dejaron reposar sin perturbaciones en el fondo del pocillo y se

dejaron sin perturbar en la incubadora de cultivo celular de dióxido de carbono al 5 % a 37 °C durante 3 días. Las microesferas se recuperaron suavemente con una pipeta y se colocaron en un pocillo fresco con medio fresco durante 3 días más. Tras la inspección, como se muestra en la Figura 2B, las células rodearon completamente las microesferas. Sin embargo, se descubrió que la adhesión celular solo era detectable usando muestras de 5 microesferas que se habían extraído previamente durante al menos un período de una noche en un gran volumen de agua. Por lo tanto, una extracción completa de las microesferas fue eficaz para eliminar todas las trazas de urea y otros componentes de la solución de tratamiento capilar.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para fabricar un hidrogel que comprende
5 colocar cabello humano en una solución reductora que rompa los enlaces intermoleculares entre las proteínas
queratínicas del cabello, y
concentrar la solución, y
exponer la solución a un agente oxidante, y
eliminar la solución, dejando un hidrogel que comprende una red de queratinas reticuladas entre sí con enlaces de
10 disulfuro.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 comprende además concentrar la solución de cabello reducida
antes de la exposición al agente oxidante, donde la solución reductora comprende urea, tiourea y mercaptoetanol.
- 15 3. El proceso de la reivindicación 2, donde la solución reductora comprende una solución tamponada a
pH 8,5 de urea aproximadamente 5 M, tiourea aproximadamente 2,5 M y mercaptoetanol aproximadamente al 5 %, y
que comprende además mantener la solución a aproximadamente 50 °C durante al menos aproximadamente 2 días
para reducir el cabello.
- 20 4. El proceso de la reivindicación 2, donde la concentración del cabello reducido en la solución
comprende la ultrafiltración.
5. El proceso de la reivindicación 1, que comprende además dispersar la solución que contiene cabello
reducido como gotitas en una solución hidrófoba para formar hidrogel en las gotitas.
25
6. Un sistema de material que comprende biomoléculas de cabello humano desnaturalizadas reticuladas
intermolecularmente con enlaces disulfuro para formar un hidrogel que puede obtenerse mediante el método de una
cualquiera de las reivindicaciones 1-5 con un módulo de más de aproximadamente 100 Pa, estando el hidrogel
sustancialmente libre de otras reticulaciones químicas entre las biomoléculas de cabello humano.
30
7. El sistema de la reivindicación 6, donde el hidrogel comprende al menos aproximadamente el 40 % p/p
de agua.
8. Sistema de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, donde el hidrogel comprende además
35 un agente terapéutico.
9. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde el material comprende una pluralidad de
partículas de hidrogel.
- 40 10. Un sistema biomédico para su uso en el tratamiento de una herida que comprende un hidrogel que
puede obtenerse mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que comprende biomoléculas de
cabello humano desnaturalizadas reticuladas intermolecularmente con enlaces disulfuro para formar el hidrogel con
un módulo de más de aproximadamente 100 Pa; y células madre unidas al hidrogel, donde el hidrogel está
sustancialmente libre de otras reticulaciones químicas entre las biomoléculas de cabello humano.
45
11. El sistema de la reivindicación 10, donde el hidrogel comprende una pluralidad de partículas que
comprenden además un recubrimiento permeable al oxígeno y al fluido, siendo el recubrimiento no permeable a las
células de vertebrados.

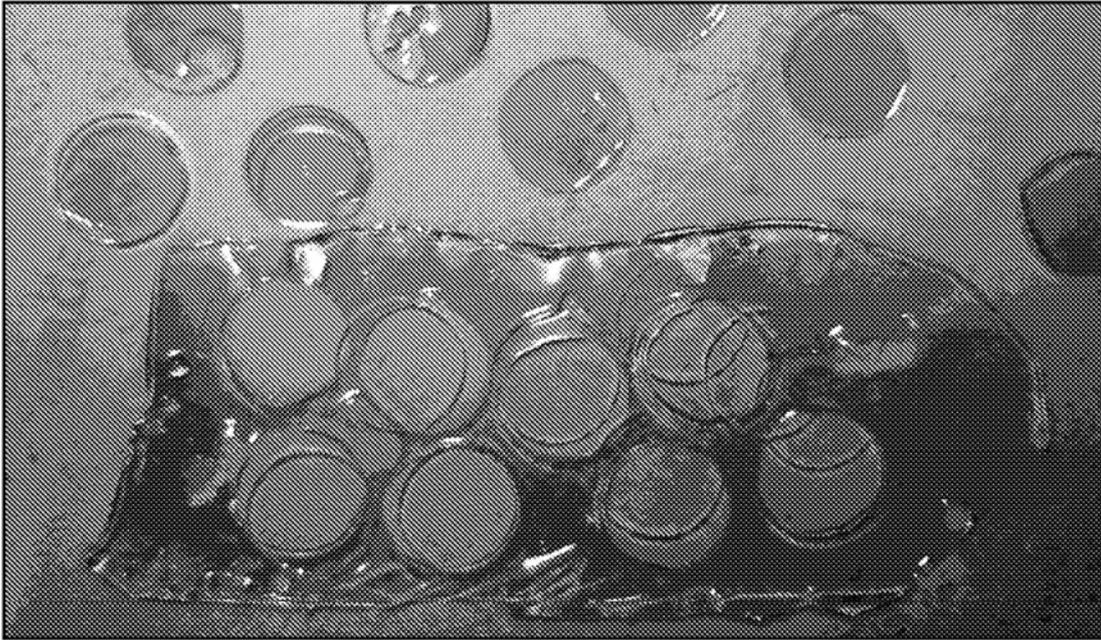


FIG. 1

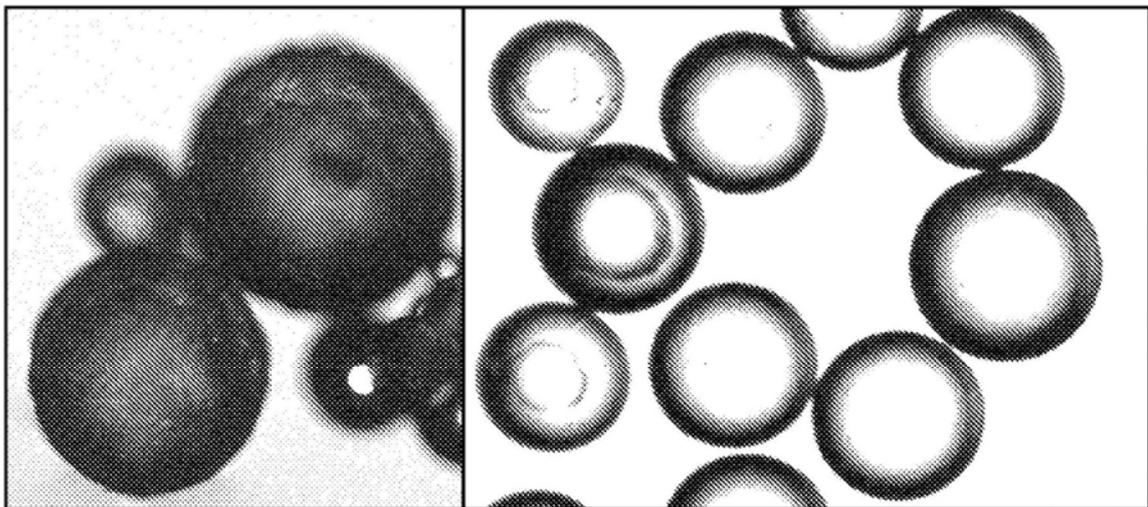


FIG. 2A

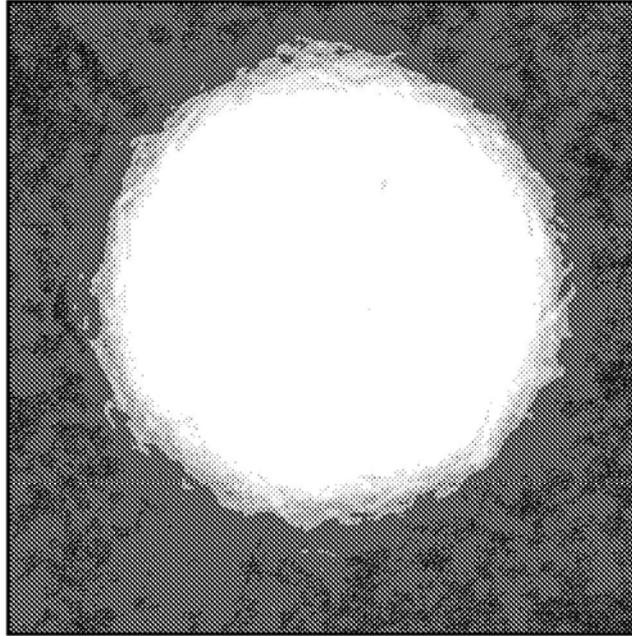


FIG. 2B

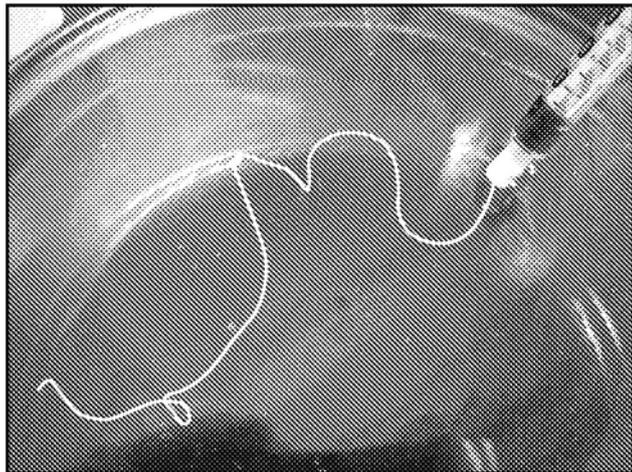


FIG. 3

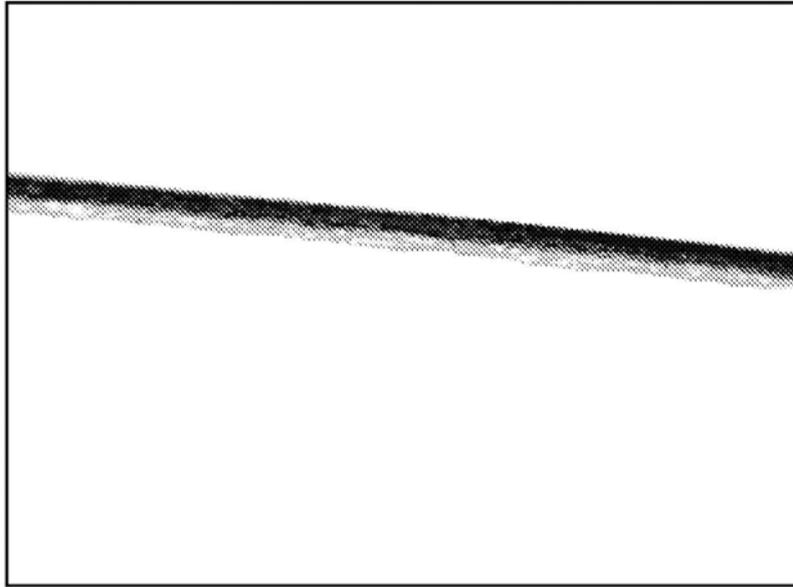


FIG. 4

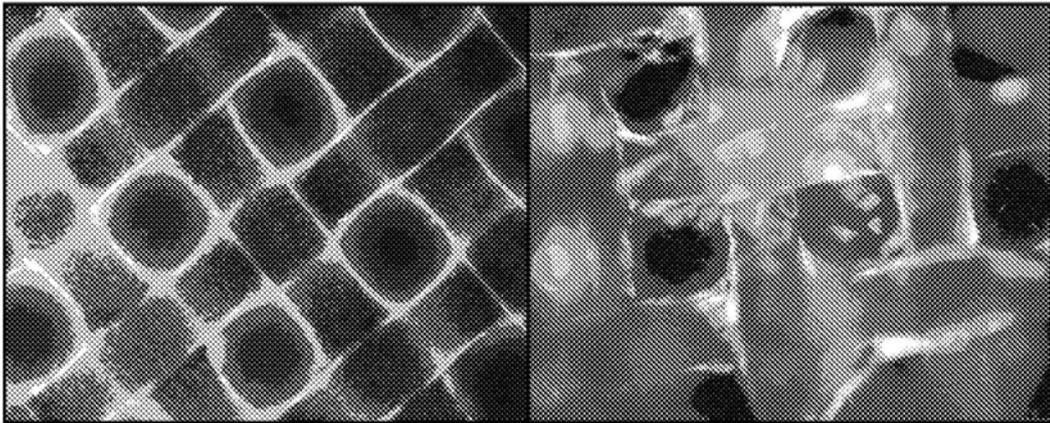


FIG. 5

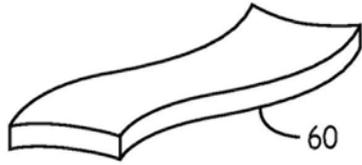


FIG. 6A

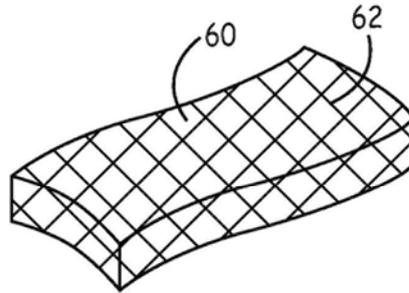


FIG. 6B

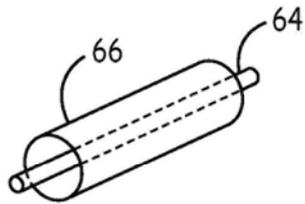


FIG. 6C

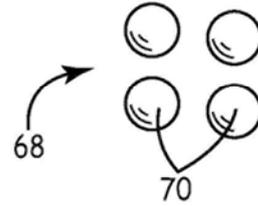


FIG. 6D



FIG. 6E

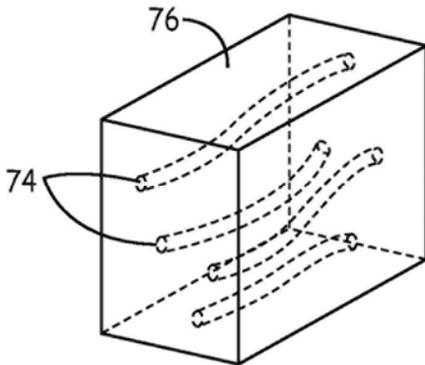


FIG. 6F

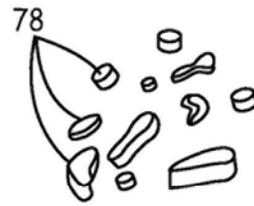


FIG. 6G

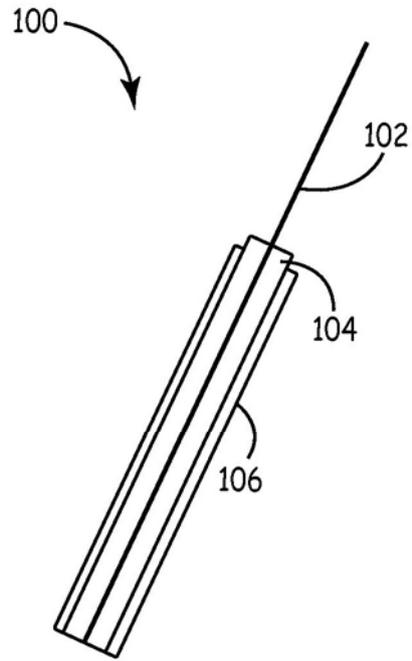


FIG. 7

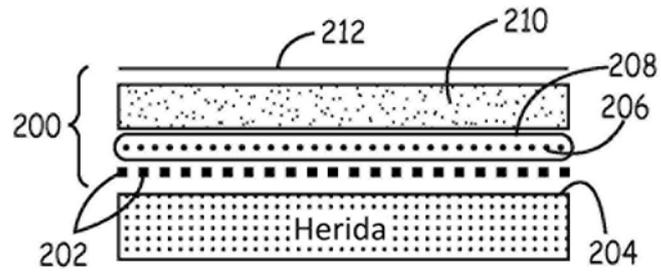


FIG. 8

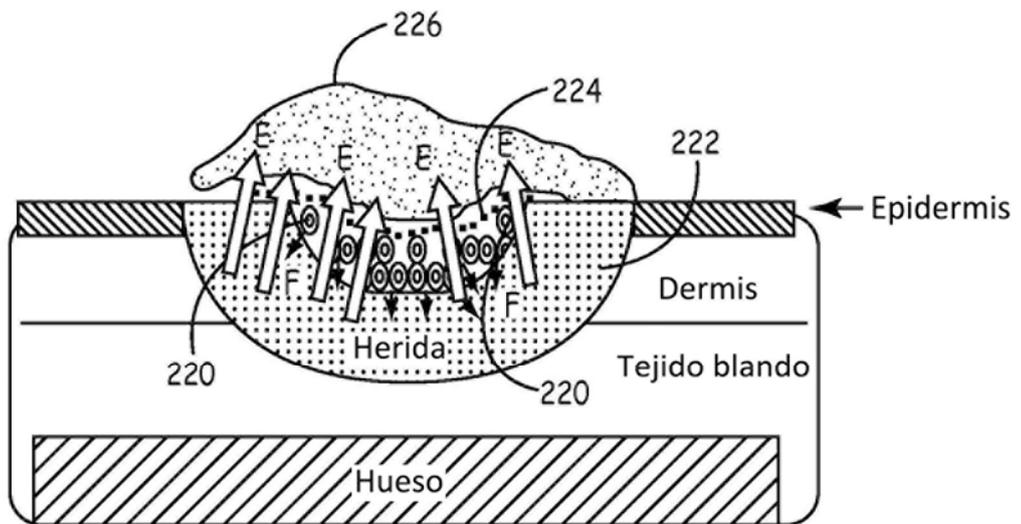


FIG. 9