

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 289**

51 Int. Cl.:

C08L 89/00	(2006.01)	C07K 17/04	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)		
A61L 27/22	(2006.01)		
A61L 27/48	(2006.01)		
A61L 27/52	(2006.01)		
A61P 19/08	(2006.01)		
C08J 3/075	(2006.01)		
C09D 189/00	(2006.01)		
C12P 21/06	(2006.01)		
C07K 14/435	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2012 PCT/CA2012/000192**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2012 WO12116439**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2012 E 12752652 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2681280**

54 Título: **Biomaterial, método para preparar el biomaterial y usos del mismo**

30 Prioridad:

28.02.2011 US 201161447375 P

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

28.11.2019

73 Titular/es:

**THE ROYAL INSTITUTION FOR THE
ADVANCEMENT OF LEARNING / MCGILL
UNIVERSITY (100.0%)
Office of Sponsored Research, James
Administration Building, 845 Sherbrooke Street
West 2nd Floor
Montreal, Quebec H3A 0G4, CA**

72 Inventor/es:

**NAZHAT, SHOWAN, N.;
MARELLI, BENEDETTO;
BARRALET, JAKE, E.;
FREDDI, GIULIANO y
ALESSANDRINO, ANTONIO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 733 289 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

Biomaterial, método para preparar el biomaterial y usos del mismo

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere en general a un biomaterial, un método para preparar el biomaterial y usos del mismo. Específicamente, pero no exclusivamente, la invención se refiere a biomateriales basados en hidrogeles, tales como el colágeno, y polipéptidos derivados de la fibroína.

Antecedentes de la invención

10 Existe una necesidad cada vez mayor de nuevos biomateriales para la reparación, reemplazo, construcción o aumento de tejidos duros y blandos como respuesta a enfermedades degenerativas, algunas otras enfermedades y afecciones, traumas y tratamientos cosméticos. En particular, existe la necesidad de obtener biomateriales que sean bioactivos, que puedan ser biodegradables y que posean las propiedades físicas y mecánicas apropiadas para algunas aplicaciones específicas. Dependiendo de la aplicación, se pueden requerir biomateriales inyectables o con estructuras porosas tridimensionales (es decir, esqueletos) para inducir la invasión celular, unión y proliferación.

15 Se conocen biomateriales basados en hidrogeles. Por ejemplo, los hidrogeles de colágeno, como el colágeno tipo I, tienen un excelente comportamiento biológico, pueden formar esqueletos fisiológicamente relevantes y pueden ser inyectables. Sin embargo, los materiales de colágeno tienen poca resistencia y, por lo tanto, son inadecuados para muchas aplicaciones. Además, la mayoría de los materiales colágenos son reabsorbidos de forma rápida e impredecible por el cuerpo cuando se implantan y también sufren una contracción celular significativa en condiciones fisiológicas.

20 Los biomateriales basados en colágeno mineralizado son particularmente atractivos para la reparación, reemplazo, construcción o aumento de tejidos duros, por ejemplo, huesos, ya que el colágeno forma el componente orgánico del hueso. Los métodos existentes para mineralizar el colágeno requieren el procesamiento del colágeno en condiciones distintas a las condiciones fisiológicas en términos de pH, temperatura y altas concentraciones de minerales. Como estas condiciones de mineralización no se pueden recrear en el cuerpo, el colágeno debe mineralizarse antes de la implantación y, por lo tanto, tiene que implantarse. Estos materiales tampoco pueden soportar las células vivas durante la mineralización. No existe un biomaterial mineralizable inyectable a base de colágeno. Al igual que el colágeno no mineralizado, el colágeno mineralizado también sufre de propiedades de reabsorción impredecibles y de contracciones inducidas por las células.

25 Por lo tanto, se desea proporcionar un biomaterial mejorado y un método para fabricar el biomaterial, para la construcción, reparación, reemplazo o aumento de tejidos con el fin de superar o reducir, al menos, algunos de los problemas descritos anteriormente.

Sumario de la invención

35 Los aspectos y realizaciones de la presente invención reducen, alivian o superan las desventajas, dificultades y deficiencias de la técnica anterior anteriormente mencionadas al proporcionar un nuevo biomaterial basado en un hidrogel o un precursor de hidrogel, tal como el colágeno, una solución de colágeno u otro material colágeno, incorporando fracciones polipeptídicas aisladas y extraídas de la fibroína.

40 Sorprendentemente, los inventores han descubierto que una fracción polipeptídica soluble (Cs) obtenida por digestión con α -quimotripsina de la fibroína y extraída de la fibroína digerida tiene propiedades mineralizantes en condiciones fisiológicas cuando se usa sola y cuando se incorpora en un biomaterial, como un hidrogel o precursor de hidrogel. Los inventores también han descubierto sorprendentemente que una fracción polipeptídica precipitada (Cp) obtenida por digestión con α -quimotripsina de la fibroína y extraída de la fibroína digerida puede mejorar las propiedades mecánicas del material en el que se incorpora. Se ha descubierto que las fracciones de Cs y Cp extraídas pueden incorporarse solas y en combinación en un hidrogel o un precursor de hidrogel para adaptar las propiedades del biomaterial resultante.

45 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un biomaterial que comprende al menos una fracción polipeptídica aislada y extraída de fibroína incorporada en un hidrogel o un precursor de hidrogel, en donde la al menos una fracción polipeptídica aislada y extraída está aislada de forma quimotróptica, y es seleccionada de una fracción soluble Cs, y una fracción precipitada Cp.

50 En otras palabras, un primer aspecto se dirige a un biomaterial que comprende un hidrogel o un precursor de hidrogel que incluye una fibroína derivada de un polipéptido que se ha aislado de la fibroína por digestión quimotróptica y que se extrae de la fibroína digerida. Por "incorporado" se entiende la unión, o el potencial de unión, por atracciones químicas o físicas o la unión, por ejemplo, por acción enzimática o similar, entre el polipéptido extraído y el hidrogel o precursor de hidrogel. Por lo tanto, la invención abarca biomateriales antes, durante y después de la gelificación del hidrogel. Por fracción del polipéptido aislada y extraída se entiende que la fracción de

polipéptido se ha aislado de la fibroína y se ha eliminado o separado de otros componentes aislados o no aislados de la fibroína.

5 Preferiblemente, las fibroínas se originan a partir de seda de gusanos de seda (clase Insecta, orden Lepidoptera, familia Bombycidae (género Bombyx, especie Bombyx mori, Bombyx mandarina) y Saturniidae (género Antheraea, Samia, etc.), seda de araña (seda producida por artrópodos pertenecientes a la clase Arachnida, orden Araneae), fibras dentro de la familia de la queratina o cualquier otra fibra natural.

10 La digestión con α -quimotripsina de la fibroína produce el aislamiento de la fracción del polipéptido hidrófilo (Cs) que comprende secuencias de aminoácidos cargadas negativamente y la fracción hidrófoba (Cp) que comprende fragmentos apolares. La fracción de Cs es soluble en agua (Cs) y comprende polipéptidos que pertenecen a las regiones amorfas de la fibroína. El peso molecular de los péptidos de la fracción Cs varía de 2 a 10 kDa. Cs contiene los aminoácidos Asp, Ser, Glu, Gly, His, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Lys, Ile, Leu y Phe. La fracción Cp está formada por los péptidos más hidrófobos que comprenden principalmente las secuencias repetitivas $-(Ala-Gly)_n$ - características de las regiones cristalinas de la fibra. Cp contiene los aminoácidos Asp, Ser, Glu, Gly, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Lys, Ile, Leu y Phe.

15 La fracción de Cp aislada se puede extraer de la solución de fibroína digerida centrifugando la solución de fibroína digerida, o cualquier otro método adecuado para extraer la fracción de Cp de la solución de fibroína digerida. La fracción de Cs aislada puede extraerse por liofilización de la solución de fibroína digerida una vez que se haya eliminado la fracción de Cp, o por cualquier otro método adecuado para extraer la fracción de Cs de la solución de fibroína digerida. Las fracciones de Cp y Cs extraídas pueden incorporarse por separado o juntas en diferentes cantidades en el hidrogel o precursor de hidrogel para adaptar las propiedades del biomaterial. Las fracciones de Cp y Cs extraídas pueden estar en polvo, líquido o en cualquier otra forma adecuada.

20 Los inventores han demostrado en este documento que la fracción de Cs de fibroína aislada y extraída tiene propiedades mineralizantes en condiciones tanto óseas como no óseas. La mineralización del colágeno es la formación de una fase inorgánica dentro de la matriz colagenosa, donde la fase inorgánica puede incluir fosfato de calcio, carbonatos de calcio, oxalatos de calcio, especies de silicatos, etc. La mineralización puede ser un indicador de formación ósea. Se encontró que el efecto mineralizante de la fracción de Cs extraída por sí solo es más intenso que el de la forma no digerida de fibroína. La fracción de Cs extraída también ha demostrado en este documento propiedades osteoinductivas. Sobre la base de estas propiedades de mineralización y osteoinductivas demostradas, se cree que la incorporación de la fracción de Cs extraída en un hidrogel o precursor de hidrogel puede mejorar la capacidad de formación de hueso del biomaterial, como la osteogénesis y la osteoconducción. Por lo tanto, la fracción de Cs extraída, ya sea incorporada en un hidrogel, un precursor de hidrogel o cualquier otro biomaterial, podría ser útil para aplicaciones de tejidos duros donde se requiera la reparación, regeneración, aumento, construcción o reemplazo de hueso o dientes.

35 Los inventores también han demostrado en el presente documento que la fracción Cp aislada y extraída de la fibroína puede mejorar el módulo de compresión mecánica y la tensión de un material en el que se incorpora. Por lo tanto, la integración de la fracción de Cp extraída en un hidrogel o precursor de hidrogel puede llevar al refuerzo mecánico del biomaterial resultante que puede disminuir su reabsorción in vivo. El control de las propiedades mecánicas del biomaterial también puede dirigir el fenotipo y la diferenciación de células madre u otras células sembradas en el biomaterial. La Cp también podría reducir la vulnerabilidad de un hidrogel como el colágeno al comportamiento contráctil inducido por las células. Por lo tanto, la combinación de fracciones de polipéptidos Cp extraídos y un hidrogel podría ser útil para adaptar las propiedades mecánicas de un hidrogel para aplicaciones de tejidos blandos. Un biomaterial basado en esta combinación sería particularmente útil para el suministro de células no mineralizantes. Se considera que Cp solo estabiliza una matriz.

45 Ventajosamente, la fibroína es un material ampliamente disponible y las fracciones de polipéptidos aisladas y extraídas, Cs y Cp, pueden obtenerse de forma rápida, económica y barata de la fibroína mediante métodos conocidos, como la digestión quimotriptica de la fibroína. Los polipéptidos así obtenidos son biocompatibles, fáciles de esterilizar, procesar y mantener.

50 En lugar de obtener la fracción polipeptídica extraída a través de un enfoque de arriba hacia abajo de digestión quimotriptica, las fracciones de Cs y Cp como se definen en este documento se pueden sintetizar a través de un enfoque de abajo hacia arriba.

55 El biomaterial puede estar en forma de un sistema inyectable. En este caso, la fracción de polipéptido aislada y extraída se incorpora en un precursor de hidrogel, o un hidrogel con una viscosidad adecuada para su inyección en un cuerpo humano o animal. En otras palabras, el biomaterial es fluido o sustancialmente líquido. Por sustancialmente líquido se entiende que el biomaterial tiene una viscosidad adecuada para permitir que se administre en un sitio de tratamiento en un paciente (por ejemplo, mediante inyección o similar). El biomaterial puede volverse más viscoso (por ejemplo, gel) in situ debido a un cambio en la temperatura, el pH, el ambiente iónico o similares. La gelificación en el biomaterial se puede iniciar justo antes de inyectar en un sitio huésped, por ejemplo, ajustando la temperatura, el pH o el ambiente iónico del biomaterial. Ventajosamente, cuando se encuentra en forma inyectable, el biomaterial se puede administrar para llegar a sitios difíciles dentro de un hospedador, también puede

transportar células, medicamentos y otros agentes, se puede gelificar in situ y, por lo tanto, se pueden rellenar formas difíciles, se puede permitir el contacto directo entre las células en el biomaterial y el tejido huésped, y puede reducir la necesidad de cirugía invasiva. Los hidrogeles inyectables con capacidad de biodegradación pueden proporcionar una encapsulación eficaz y homogénea de fármacos/células y una operación quirúrgica conveniente in vivo de forma mínimamente invasiva, lo que causa un menor tamaño de cicatrices y menos dolor para los pacientes. La gelificación y la biodegradación del biomaterial son dos factores que afectan al destino celular o a la administración de fármacos del biomaterial.

En una realización, se proporciona un biomaterial inyectable basado en colágeno que puede mineralizarse in vivo, comprendiendo el biomaterial inyectable una fracción polipeptídica de Cs aislada y extraída de forma quimotrópica en un material colágeno. El material colágeno es una solución de colágeno. La fracción de polipéptido Cs extraída puede estar en forma de partículas y colocarse en suspensión en la solución de colágeno.

Alternativamente, el biomaterial es sustancialmente sólido o sustancialmente gelificado e implantable en un cuerpo humano o animal. El biomaterial comprende un esqueleto tridimensional o matriz. El biomaterial implantable puede ser una lámina plana o enrollada, una esponja o una película. El biomaterial puede tener cualquier otra forma, como un tubo, bloque, anillo o fibra. El biomaterial puede moldearse por moldeo durante la gelificación o el corte después de la gelificación, por ejemplo. El biomaterial también puede ser un constructo de múltiples capas y puede formar parte de un constructo de múltiples capas.

Preferiblemente, las fracciones de polipéptidos extraídas se añaden al hidrogel o al precursor de hidrogel antes de que el hidrogel se haya gelificado. El biomaterial también puede ser un hidrogel denso, como un hidrogel de colágeno denso, que incorpora la fracción o fracciones de polipéptidos aisladas.

Preferiblemente, el hidrogel o el precursor de hidrogel se basa en colágeno de tipo I. Ventajosamente, éste es reabsorbible y biocompatible y es un componente importante del hueso. El hidrogel o precursor de hidrogel también puede ser cualquier material colágeno de cualquier fuente adecuada, como el tendón de cola de rata y la dermis bovina (para colágeno de tipo I) y cartilago para el colágeno de tipo II. El hidrogel o el precursor de hidrogel puede tener fuentes naturales o sintéticas, y puede incluir fibrina, quitosán, ácido hialurónico, alginatos, gelatina, heparina, sulfato de condroitina, etc. El hidrogel o el precursor de hidrogel puede ser reabsorbible. El uso de materiales derivados naturalmente en un biomaterial es ventajoso desde el punto de vista de la biocompatibilidad. Aunque los ejemplos en el presente documento utilizan materiales basados en colágeno como el hidrogel y el precursor de hidrogel, se cree que se obtendría un efecto similar con otros hidrogeles distintos al colágeno.

Ventajosamente, cuando el hidrogel o el precursor de hidrogel es colágeno o una solución de colágeno, el biomaterial resultante retiene las propiedades beneficiosas del material colágeno y se beneficia de las propiedades de la fracción o fracciones de los polipéptidos extraídos incorporados. En las realizaciones en las que el biomaterial comprende partículas de Cs y Cp aisladas y extraídas en un material colágeno, el biomaterial gelificado comprende una matriz de fibrillas de colágeno que tienen partículas o aglomerados de partículas de Cs o Cp unidas a las fibrillas.

Preferiblemente, la, al menos una, fracción polipeptídica aislada y extraída se incorpora en el hidrogel o precursor de hidrogel en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50% en peso seco, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 30% en peso seco, más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10% en peso seco, lo más preferiblemente aproximadamente 10% en peso seco. Preferiblemente, un contenido de Cs es menor o igual a aproximadamente 30% en peso seco de Cs en un hidrogel de colágeno o precursor de hidrogel de colágeno. Estos intervalos de incorporación de fracciones de polipéptidos aislados y extraídos pueden producir biomateriales con un intervalo de propiedades (biológicas, mecánicas, químicas y similares). Por lo tanto, se puede utilizar un contenido apropiado de fracción polipeptídica de acuerdo con el uso previsto del biomaterial.

El biomaterial puede incluir adicionalmente células, moléculas de fármaco, agentes terapéuticos, partículas, agentes bioactivos o similares, sin alterar adversamente la viabilidad o el estado de estas sustancias. Las células, moléculas de fármaco, agentes terapéuticos, partículas, agentes bioactivos o similares pueden distribuirse intersticialmente dentro del biomaterial en cualquier disposición, como de forma homogénea o en zonas o capas definidas. Los ejemplos de agentes bioactivos incluyen vidrio bioactivo, vidrio soluble, fosfato de calcio reabsorbible, hidroxiapatito, vitrocerámica, por nombrar algunos. Las células pueden incluir aquellas involucradas en la generación, regeneración, reparación y mantenimiento de tejidos duros y blandos, por ejemplo, células madre mesenquimales, células madre de la médula ósea, osteoblastos, preosteoblastos, fibroblastos, células musculares y condrocitos, y similares. Los agentes terapéuticos pueden incluir hormonas, agentes antimicrobianos, anti-rechazo y similares. Los medicamentos pueden ser cualquier molécula para el tratamiento o el control de enfermedades, afecciones o síntomas, agentes antiinflamatorios, factores de crecimiento, vesículas para la liberación de iones, liberación de gases, liberación de nutrientes y enzimas. De esta manera, el biomaterial se puede usar como portador de sustancias o como vehículo de administración, tal como para la liberación controlada de fármacos o agentes terapéuticos.

Las células, las moléculas de fármaco, los agentes terapéuticos, las partículas, los agentes bioactivos o similares pueden agregarse al biomaterial antes o después de la gelificación del precursor de hidrogel para formar el hidrogel, de manera ventajosa, puede ocurrir la gelificación de una solución de colágeno que incluye las fracciones del polipéptido extraídas bajo condiciones fisiológicas o, al menos, condiciones que no sean perjudiciales para las células, moléculas de fármacos, agentes terapéuticos, partículas, agentes bioactivos o similares. Se pueden agregar al precursor de hidrogel y se pueden administrar en un sitio huésped mediante inyección o similar. Ventajosamente, se ha encontrado que cuando las partículas de Cs extraídas están presentes en el biomaterial, las células madre se dirigen a las células óseas. En otras palabras, las partículas de Cs extraídas son osteoinductivas.

En una realización, el biomaterial comprende colágeno o una solución de colágeno que incluye partículas de Cs aisladas y extraídas. Esto puede ser considerado como un 'biomaterial de colágeno'. Ventajosamente, este biomaterial puede mineralizarse en condiciones fisiológicas in vitro e in vivo (ver Ejemplos) en un marco de tiempo relativamente corto. Como el biomaterial está basado en materiales colágenos, es inherentemente biocompatible. El biomaterial es lo suficientemente poroso como para permitir la siembra y penetración de las células, así como el transporte de oxígeno y nutrientes a las células sembradas. In vivo, el biomaterial se puede reabsorber en un período de tiempo compatible con el proceso de reparación del tejido. Imita la estructura extracelular de los tejidos debido a su base de material colágeno. Al variar la cantidad de partículas de Cs extraídas, así como agregar partículas de Cp extraídas al biomaterial, las propiedades del biomaterial se pueden adaptar para muchos tipos diferentes de tejidos y usos, como se indicó anteriormente. Se puede administrar in vivo en forma líquida y gel in situ. El biomaterial no es inmunogénico.

A diferencia de los sistemas de la técnica anterior, el biomaterial de la presente invención, cuando se basa en materiales colágenos, mantiene las propiedades biológicas, químicas y físicas originales del material colágeno debido a su gelificación o fibrillogénesis en condiciones fisiológicas. Sin embargo, las propiedades desventajosas del material colágeno se superan o minimizan mediante la incorporación de las fracciones polipeptídicas derivadas de fibroína aisladas y extraídas Cs, Cp o Cs y Cp.

En la presente invención, el uso de polipéptidos derivados de fibroína y su hibridación con un material colágeno o un hidrogel proporciona un nuevo biomaterial con propiedades mejoradas. Este nuevo biomaterial combina las ventajas de los polipéptidos extraídos con las propiedades ventajosas y beneficiosas de los materiales colágenos. Sorprendentemente, las propiedades del biomaterial resultante están más allá de las de los componentes individuales que forman el biomaterial. Las partículas de polipéptido Cs y Cp extraídas no son capaces de producir sistemas de hidrogel por sí mismos. La fibroína de seda puede formar un hidrogel, pero requiere condiciones no fisiológicas y, por lo tanto, no puede soportar células viables. El colágeno no puede mineralizarse bajo condiciones fisiológicas.

La fibroína de seda es conocida por su bioactividad y por sus propiedades mecánicas y biológicas. Sin embargo, hasta ahora en la técnica anterior, su procesamiento en gel ha requerido el uso de condiciones no fisiológicas y largos períodos de tiempo (desde un día hasta varias semanas). A 37°C y pH 7,4, la transición sol-gel de fibroína tarda de días a semanas y, por consiguiente, hace imposible incorporar células y mantenerlas vivas en el gel. Agregar sales en concentraciones superiores a los niveles fisiológicos (es decir, citotóxicos) no altera significativamente la cinética de gelificación, pero compromete la incorporación de la célula. Bajar el pH (pH <5) o aumentar la temperatura (> 60°C) podría reducir el tiempo de gelificación a unas pocas horas, pero estas condiciones alteran la función celular y afectan la viabilidad celular. Alternativamente, la pre-sonicación de la solución de fibroína aumenta la cinética de la gelificación en un entorno fisiológico, pero no garantiza el logro de una estructura nanofibrilar altamente adecuada para usos como biomateriales. La incorporación en un hidrogel de polipéptidos derivados de fibroína aislados y extraídos nunca se ha propuesto, según el conocimiento de los inventores. Las propiedades específicas de tales fracciones polipeptídicas aisladas y extraídas tampoco se han identificado previamente.

Las aplicaciones o usos adecuados para el biomaterial de la presente invención incluyen ingeniería de tejidos, construcción, reparación, regeneración y/o aumento de tejidos blandos y duros. La medicina regenerativa es otro uso, como el suministro de células madre en la cardiomioplastia, la curación de heridas, la diabetes y las enfermedades neurodegenerativas, por nombrar algunas. El tejido duro puede incluir huesos y dientes. El tejido blando puede incluir piel, músculos, tendones, ligamentos, cartílago, córnea, tejido periodontal, vasos, vejiga y tejidos de las vías respiratorias como el pulmón y similares. Otras aplicaciones incluyen construcciones in vitro o in vivo; materiales de recubrimiento; sustratos de cultivo celular de dos o tres dimensiones; vehículos de liberación de células, drogas y otros agentes; para fines cosméticos como tratamientos antienvjecimiento o reconstrucción facial.

La invención también se refiere al uso del biomaterial como se define anteriormente como un dispositivo médico o implante, o incluido en un dispositivo médico o implante. Ventajosamente, los implantes pueden ser implantes equivalentes a tejidos. El biomaterial se puede usar en una cantidad terapéuticamente eficaz para aliviar o tratar un defecto de hueso, diente o cartílago en un mamífero. Por lo tanto, la invención también incluye un método para aliviar o tratar un defecto de hueso, diente o cartílago en un mamífero que comprende administrar a dicho defecto una cantidad terapéuticamente eficaz de un biomaterial como se describe en el presente documento. También se incluye el uso del biomaterial como se describe en este documento en ortopedia. También se incluye el uso del biomaterial para rellenar al menos parcialmente un defecto óseo o dental.

Desde otro aspecto, se proporciona el uso de un biomaterial como se define anteriormente para construir, reparar, reemplazar, regenerar o aumentar tejido blando o duro; como una construcción in vitro o in vivo; como material de recubrimiento; o como medio de liberación de células, moléculas o partículas. Un uso ventajoso del biomaterial que incorpora al menos la fracción del polipéptido Cs extraído es para promover la mineralización o formación ósea, incluyendo uno o más de osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis.

Desde otro aspecto más, se proporciona un método para fabricar un biomaterial que comprende proporcionar al menos una fracción polipeptídica aislada y extraída de forma quimiotriptica de la fibroína, y agregar la, al menos una, fracción polipeptídica extraída a un precursor de hidrogel antes de la gelificación, en donde la, al menos una, fracción polipeptídica extraída se selecciona de una fracción soluble Cs, una fracción precipitada Cp, o una combinación de las fracciones Cs y Cp. Se entenderá que antes de gelificación significa antes de que haya tenido lugar una gelificación o polimerización sustancial. El proceso de gelificación o polimerización no necesita ser completo.

El método puede comprender además aislar la, al menos una, fracción polipeptídica de la fibroína mediante digestión con α -quimotripsina y extraer la, al menos una, fracción polipeptídica aislada de la fibroína digerida. El precursor de hidrogel puede ser una solución de colágeno, por ejemplo, a base de colágeno de tipo I derivado naturalmente. La incorporación de al menos una fracción de polipéptido aislada y extraída puede comprender proporcionar la fracción de polipéptido extraída en forma de partículas y formar una suspensión en el precursor de hidrogel, como en la solución de colágeno.

El método puede comprender además, al menos parcialmente, gelificar el precursor de hidrogel. El precursor de hidrogel puede autogelular o requerir pasos de procesamiento. La gelificación, al menos parcial, de un precursor de hidrogel de solución de colágeno puede iniciarse ajustando el pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 9,5. El biomaterial puede inyectarse cuando no está gelificado o cuando esté parcialmente gelificado, o implantarse cuando esté al menos parcialmente gelificado. El biomaterial puede hacerse más denso extrayendo al menos un poco de líquido mediante un método de compresión o de consolidación. El biomaterial puede moldearse o conformarse en cualquier forma adecuada, como un bloque, lámina, fibra, tubo, anillo, rodillo, por nombrar algunos.

Ventajosamente, pueden añadirse células, moléculas de fármaco, agentes terapéuticos, partículas o agentes bioactivos al precursor de hidrogel antes de la gelificación o al biomaterial. Ventajosamente, estas sustancias se añaden al precursor de hidrogel antes de la gelificación. Como la gelificación se produce en condiciones fisiológicas, la viabilidad celular puede mantenerse y no hay efectos adversos de la gelificación en las sustancias añadidas.

Preferiblemente, el precursor de hidrogel es una solución de colágeno y la, al menos una, fracción polipeptídica extraída se incorpora en el biomaterial en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50% en peso seco, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 30% en peso seco, más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10% en peso seco, lo más preferiblemente aproximadamente 10% en peso seco. Preferiblemente, el contenido de Cs es menor o igual a aproximadamente 30% en peso seco de Cs en el biomaterial.

El método incluye proporcionar las fracciones de Cs y Cp aisladas y extraídas en cantidades diferentes o iguales. El método también incluye el ajuste de estas cantidades para adaptar las propiedades del biomaterial.

En una realización, la incorporación de los polipéptidos extraídos comprende formar una suspensión de las partículas de polipéptidos extraídos en una solución de material colágeno y dejar que interactúen, antes de la gelificación. El método puede comprender además gelificar la suspensión del material polipéptido-colágeno para formar un gel ajustando el pH de la solución de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 9,5, preferiblemente de pH 6 a 9, para la gelificación tal como mediante la adición de una base. La suspensión también se puede incubar a una temperatura adecuada, como 37°C para la gelificación. Las partículas de polipéptido, el medio de cultivo, la solución de colágeno y una base se pueden agregar en cualquier orden. Sorprendentemente, sin estar vinculado a ninguna teoría, se piensa que los polipéptidos y el material colágeno comienzan a interactuar cuando el pH de la suspensión es más de aproximadamente 3, por la formación de enlaces electrostáticos, por ejemplo. A partir de entonces, durante la gelificación, forman enlaces físicos y químicos. La gelificación se produce en una ventana de tiempo de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 37°C y a un pH de entre aproximadamente 5,5 a aproximadamente 9,5, preferiblemente de aproximadamente 6 a 9.

El método también puede comprender además la densificación del hidrogel, tal como mediante la eliminación de al menos parte del contenido de agua. En una realización, esto se realiza por compresión plástica como se describe en el documento WO2006003442, lo que incluye aplicar una carga de compresión entre 0,1 y 100 kPa, preferiblemente de aprox. 1 kPa, durante un período de 1 a 15 minutos, preferiblemente 5 minutos. Al utilizar el método de producción de colágeno denso, se puede obtener rápidamente un biomaterial de hidrogel de colágeno denso y mineralizable, en términos de horas, en oposición a los métodos alternativos de gelificación y densificación del colágeno que requieren acción celular y pueden tardar semanas con resultados poco fiables.

El método puede incluir además el procesamiento del biomaterial antes o después de la gelificación o densificación usando luz UV, radiaciones, enzimas (por ejemplo, Transglutaminasa, Tirosinasa), agentes de reticulación, sollicitación mecánica, alteraciones de pH, temperatura y presión.

5 También se pueden incluir pasos de métodos alternativos o adicionales para vincular las fracciones de Cp y Cs extraídas con el hidrogel, por ejemplo mediante procesamiento enzimático, químico-físico y mecánico del biomaterial. Por ejemplo, el procesamiento adicional puede incluir la aplicación al hidrogel o al precursor de hidrogel antes, durante o después de su gelificación: luz UV, radiaciones, enzimas (por ejemplo, Transglutaminasa, Tirosinasa), agentes de reticulación (por ejemplo, aldehídos, carbodiimidas, tratamiento deshidrotérmico, productos químicos a base de acil-azida y cianuro), sollicitación mecánica, pH, alteraciones de la temperatura y la presión, para
10 procesar con posterioridad los materiales y aumentar aún más la interacción y los enlaces entre el colágeno y las fracciones polipeptídicas extraídas.

La presente invención también incluye biomateriales hechos usando el método descrito en este documento.

15 Un aspecto adicional de la invención incluye el uso de una fracción polipeptídica aislada y extraída de fibroína para promover la osteoinducción, osteoconducción u osteogénesis (crecimiento óseo), la mineralización o un agente fisiológicamente activo, en el que la fracción polipeptídica se aísla mediante digestión con α -quimotripsina a partir de la fibroína y contiene los aminoácidos Asp, Ser, Glu, Gly, His, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Lys, Ile, Leu y Phe. Esta es la fracción soluble de Cs. Los inventores han demostrado que la fracción de polipéptido Cs aislada y extraída tiene un mayor efecto de mineralización que la fibroína (que comprende fracciones de polipéptidos no aisladas) sola. Por lo tanto, la fracción de Cs aislada y extraída se puede usar dentro o junto con cualquier
20 biomaterial o matriz para mejorar la mineralización. Otros usos son en ortopedia, para aliviar, tratar o rellenar parcialmente un defecto óseo o dental en un mamífero.

25 Un aspecto adicional es el uso de una fracción polipeptídica aislada y extraída de fibroína para mejorar un módulo de compresión mecánica de un material en el que se incorpora o para estabilizar una matriz, en donde la fracción polipeptídica se aísla mediante digestión con α -quimotripsina de la fibroína y contiene los aminoácidos Asp, Ser, Glu, Gly, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Lys, Ile, Leu y Phe. Otros usos incluyen un estabilizador de matriz cuando se incorpora en un material formador de matriz.

En ambos aspectos, la fracción polipeptídica aislada y extraída puede incorporarse en un biomaterial que puede ser un hidrogel o un precursor de hidrogel, o cualquier otro biomaterial adecuado. El biomaterial puede ser un material colágeno.

30 Definiciones:

Las formas singulares "un", "una/o" y "la/el" incluyen las referencias plurales correspondientes a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Tal como se usa en el presente documento, el término "que comprende" pretende significar que la lista de elementos que sigue a la palabra "que comprende" son requeridas u obligatorias, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes. Tal como se usa en el presente
35 documento, la expresión "que consiste en" se entiende que incluye y está limitada a lo que sigue a la frase "que consiste en". Por lo tanto, la frase "que consiste en" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios y que no puede haber otros elementos presentes.

40 Tal como se usa en el presente documento, por "biomaterial" se entiende un material que es biocompatible con un cuerpo humano o animal cuando está en contacto con el cuerpo, tal como por implantación, inyección o cualquier otro contacto. Puede ser en forma líquida, gel o sólida.

Como se usa en el presente documento, por "fibroínas" se entiende uno o más constituyentes de fibra de seda, filamento o banda que pueden ser de diferentes fuentes animales, como el gusano de seda o la araña.

45 Como se usa en este documento, "hidrogel" significa cualquier dispersión de moléculas, fibras o partículas dentro de un líquido (por ejemplo, agua) en la que el sólido (de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 50% de sólido) es la fase discontinua y el líquido es la fase continua. Las moléculas, fibras o partículas están unidas por interacciones físicas y/o químicas. Los hidrogeles pueden incluir colágenos, alginatos, hialurano, quitosano, fibrina, agarosa, poli(acrilamida), PEG (polietilenglicol), PAA (ácido poli(acrílico)), HEMA (metacrilato de hidroxietilo) y similares. Por ejemplo, un hidrogel de colágeno comprende una red tridimensional de fibrillas rodeadas por fluido intersticial.

50 Como se usa en este documento, por "precursor de hidrogel" se entiende la forma del hidrogel antes de la formación de la fase sólida (por ejemplo, antes de la "gelificación" o el "autoensamblaje"). Por ejemplo, un precursor de hidrogel de colágeno es una solución de colágeno en la que las fibrillas aún no se han polimerizado y están en forma de monómero soluble.

55 Como se usa en este documento, "colágeno" significa cualquier material colágeno dominado por moléculas de colágeno capaces de autoensamblarse en fibrillas de colágeno. Incluye colágeno tipo I y tipo II de cualquier fuente. El material colágeno puede estar en forma de líquido o gel.

Breve descripción de los dibujos

Otros aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor con referencia a la descripción en asociación con los siguientes dibujos, en los que:

La figura 1 es un esquema de una realización de un método de la invención para fabricar un biomaterial;

5 La figura 2 es un esquema de otra realización del método de la invención (ejemplo 1);

La Figura 3 es una micrografía SEM de una realización de un biomaterial de la presente invención que muestra una partícula de polipéptido Cp aislada y extraída en un marco de gel de colágeno (Ejemplo 1);

La Figura 4 es una micrografía SEM de una realización de un biomaterial de la presente invención que muestra una partícula polipeptídica Cs aislada y extraída en un marco de gel de colágeno (Ejemplo 1);

10 La Figura 5 es un espectro ATR-FTIR de realizaciones de los biomateriales de la presente invención que incorporan: (i) polipéptidos Cp (DC-Cp), (ii) polipéptidos Cs (DS-Cp), en comparación con un control de colágeno sin polipéptidos extraídos (DC) (Ejemplo 1);

15 La Figura 6 es una micrografía SEM de una realización del biomaterial de la presente invención en el día 7 en fluidos corporales simulados, el biomaterial que incluye 10% en peso seco de partículas de Cp aisladas y extraídas en colágeno (Ejemplo 1);

La Figura 7 es una micrografía SEM de una realización del biomaterial de la presente invención en el día 7 en fluidos corporales simulados, el biomaterial que incluye 10% en peso de polipéptidos Cs aislados y extraídos (Ejemplo 1);

20 La Figura 8 es un difractograma de rayos X de energía dispersiva de una realización del biomaterial de la presente invención en el día 7 en fluidos corporales simulados, el biomaterial que incluye 10% en peso de polipéptidos Cs aislados y extraídos (Ejemplo 1);

La Figura 9 es un espectro ATR-FTIR de realizaciones de los biomateriales de la presente invención en diferentes momentos en fluidos corporales simulados en comparación con un control de colágeno (DC), el biomaterial que incluye los polipéptidos Cs extraídos (DS-Cp) (Ejemplo 1);

25 La Figura 10 es un difractograma de las realizaciones de los biomateriales de la presente invención en los días 3 y 7 en fluidos corporales simulados en comparación con un control de colágeno (DC), el biomaterial que incluye polipéptidos Cp extraídos (DC-Cp) y polipéptidos Cs (DS-Cp) (Ejemplo 1);

La Figura 11 es un gráfico de tensión-deformación de realizaciones de los biomateriales densos de la presente invención (que incluye 10% en peso de polipéptidos Cs o Cp extraídos) en comparación con un control de colágeno denso bajo pruebas mecánicas de compresión no confinadas (Ejemplo 1);

30 La Figura 12 es un gráfico de tensión-deformación de realizaciones de los biomateriales densos de la presente invención (incluido el 10% en peso extraído del polipéptido Cs o Cp) en comparación con un control de colágeno denso bajo pruebas mecánicas de compresión no confinadas en el día 7 en fluido corporal simulado (Ejemplo 1);

35 La Figura 13 es una gráfica que muestra el módulo de compresión del gel de colágeno denso (control) y las realizaciones de los biomateriales de la presente invención (incluido el 10% en peso extraído de Cs o Cp y el 5% en peso de Cs + 5% en peso de Cp en colágeno) tal como se realizó y en los días 3 y 7 en fluido corporal simulado (Ejemplo 3);

La Figura 14 es un espectro ATR-FTIR de realizaciones de los biomateriales de la presente invención que incluyen polipéptidos de Cp y Cs aislados y extraídos en colágeno (DC-Cp-Cs) en diferentes momentos en fluido corporal simulado (Ejemplo 3);

40 La Figura 15 muestra el residuo en peso de las realizaciones de los biomateriales de la invención (incluido el 10% en peso de polipéptido Cs o Cp extraído y el 5% en peso seco Cs + 5% en peso seco de Cp en colágeno) tal como se realizó y en los días 3 y 7 en fluido corporal simulado (Ejemplo 3);

45 La Figura 16 muestra proyecciones microCT y reconstrucciones transversales de gel de colágeno (coll) y de realizaciones de biomateriales de la invención (incluido 10% en peso seco de Cs extraído en colágeno) a las 9 semanas de implantación en defectos de tamaño crítico femoral inducidos en ratas Sprague Dawley® (Ejemplo 4);

La Figura 17 muestra proyecciones microCT y reconstrucciones transversales de gel de colágeno (coll) y de realizaciones de biomateriales de la presente invención (incluyendo 10% en peso seco de Cs extraído en colágeno) a los 7 días de una implantación subcutánea en ratas Sprague Dawley® (Ejemplo 5);

La Figura 18 muestra imágenes microscópicas con láser confocal de células madre mesenquimales de ratón sembradas en gel de colágeno (coll) y en realizaciones de biomateriales de la presente invención (incluyendo 10% en peso de Cs extraído en colágeno) en los días 1, 7, 14 y 21 en medio osteogénico (Ejemplo 6);

5 La Figura 19 muestra la actividad metabólica de células madre mesenquimatosas de ratón (m-MSC) sembradas en gel de colágeno (coll) y en realizaciones de un biomaterial de la presente invención (incluyendo 10% en peso de Cs extraído en colágeno) en términos de (a) reducción de Alamar Blue® en los días 1, 7, 14 y 21 de cultivo en medio osteogénico, y (b) fosfato alcalino (ALP), factor de transcripción relacionado con Runt 2 (Runx2), y expresión de osteopontina (OPN) de m-MSC sembrado en el día 21 del cultivo (Ejemplo 6);

10 La Figura 20 muestra la tinción de Von Kossa para el fosfato de calcio de secciones histológicas representativas de m-MSC sembradas en gel de colágeno (coll) y en realizaciones de un biomaterial de la invención (incluido el 10% en peso de Cs extraído en colágeno) en los días 14 y 21 del cultivo (Ejemplo 6);

La Figura 21 muestra los espectros ATR-FTIR de m-MSC sembrados en gel de colágeno (coll) y en realizaciones de un biomaterial de la invención (incluido el 10% en peso de Cs extraído en colágeno) en los días 7, 14 y 21 del cultivo (Ejemplo 6);

15 La Figura 22 muestra imágenes microscópicas con láser confocal de m-MSC sembrado en gel de colágeno (coll) y de un biomaterial elaborado con 10% en peso seco de Ts y colágeno en los días 1, 7, en medio osteogénico (Ejemplo 7);

La Figura 23a son perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento de fibroína de seda y de fracciones de Cp y Cs aisladas y extraídas que indican su peso molecular (Ejemplo 9);

20 La Figura 23b es un espectro ATR-FTIR de fibroína de seda y de fracciones de Cp y Cs aisladas y extraídas que indican su peso molecular (Ejemplo 9); y

La Figura 24 es un espectro ATR-FTIR de fibroína de seda y Cp y Cs extraídos a las 12 horas en un fluido corporal simulado (Ejemplo 10).

Descripción detallada de la invención

25 Esta invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y disposición de los componentes establecidos en la siguiente descripción o ilustrada en los dibujos. La invención es capaz de otras realizaciones y de ser practicada o llevada a cabo de varias maneras.

30 Un primer aspecto de la invención es un método (Figura 1) para fabricar un biomaterial que comprende proporcionar al menos una fracción polipeptídica aislada y extraída de fibroína, y agregar la, al menos una, fracción polipeptídica extraída a un precursor de hidrogel antes de la gelificación. La, al menos una, fracción polipeptídica aislada y extraída es aislada de manera α -quimotriptica y es una fracción soluble Cs, una fracción precipitada Cp, o una combinación de las fracciones Cs y Cp.

35 En una primera realización del método, el precursor de hidrogel es una solución de colágeno de tipo I y la, al menos una, fracción polipeptídica extraída se deriva de fibroínas de seda de Bombyx mori, aunque son posibles otros precursores de hidrogel y fuentes de fibroína. Los polipéptidos se aíslan mediante la digestión de fibras de seda fibroína por α -quimotripsina, dando como resultado la formación de una fracción precipitada apolar altamente cristalina (Cp) y una fracción soluble amorfa cargada negativamente (Cs), de la manera conocida en la técnica. Específicamente, la fibroína de seda obtenida mediante el desgomado de la seda se disuelve en una solución acuosa saturada de LiBr, a 60°C, durante 3 horas. La solución se filtra, se dializa contra el agua, la solución de α -quimotripsina obtenida disolviendo la enzima en Tris-HCl 10 mM, luego se agrega CaCl₂ 5 mM a la solución de fibroína acuosa (concentración de enzima de 300 μ g/ml). La solución así obtenida se incuba a 37°C durante 24 horas. La fracción de Cp precipitada se extrae por centrifugación de la solución, mientras que Cs se extrae por congelación, una vez que se ha eliminado Cp. Cs también se pueden mantener en solución, aunque de esta forma es más difícil controlar su concentración en el hidrogel.

45 En esta realización, las partículas polipeptídicas extraídas (Cs solo, Cp solo o Cs y Cp juntas) se mezclan con un medio de cultivo, una solución de colágeno y una base antes de la gelificación de la solución de colágeno que incorpora los polipéptidos extraídos dentro del material colágeno. Los polipéptidos extraídos, el medio de cultivo, la solución de colágeno y la base pueden mezclarse en cualquier orden. La suspensión que incluye las partículas polipeptídicas y cualquiera de los otros ingredientes puede someterse a sonicación para una dispersión homogénea de las partículas polipeptídicas. Se cree que la gelificación se produce en aproximadamente media hora después de que se agrega la base (NaOH) y el pH se ajusta de aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente pH 9,5, y la temperatura es de aproximadamente 37°C (condiciones in situ). La velocidad de gelificación puede ser controlada por la temperatura. Los viales de la suspensión de colágeno-polipéptido se pueden mantener refrigerados hasta que se necesiten. Se pueden usar diferentes cantidades de las fracciones de polipéptidos Cp y Cs para adaptar las propiedades del biomaterial resultante.

5 En una segunda realización del método, se realiza un biomaterial implantable basado en colágeno y fracciones de polipéptidos extraídos. Esta realización difiere de la primera realización en que las partículas polipeptídicas aisladas y extraídas en una suspensión de colágeno se gelifican incubando la suspensión en un molde durante aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 24 horas, preferiblemente aproximadamente 25 minutos, a una temperatura de aproximadamente 0 a 37°C, preferiblemente 37°C. El biomaterial gelificado también se puede consolidar para formar una estructura de mesoescala ordenada más densa. Una forma de hacerlo es eliminando la fase líquida, por ejemplo, aplicando una carga de compresión no confinada o cualquier otro método adecuado. Sin embargo, el método no se limita a los geles de colágeno densos y el material colágeno en el biomaterial puede variar entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 40% de densidad fibrilar de colágeno.

10 Desde otro aspecto, se proporciona un biomaterial que comprende al menos una fracción polipeptídica aislada y extraída de fibroína incorporada en un hidrogel o un precursor de hidrogel, en el que la, al menos una, fracción polipeptídica aislada y extraída se aísla de manera quimotriptica y se selecciona de una fracción soluble Cs, una fracción precipitada Cp, o una combinación de las fracciones Cs y Cp.

15 En una realización, los polipéptidos se derivan de fibroínas de seda de Bombyx mori. El hidrogel o precursor de hidrogel es un material colágeno. El biomaterial es implantable y comprende una red de fibrillas de colágeno que incorpora las partículas de Cs, Cp o Cs y Cp aisladas y extraídas. Las partículas de Cs y/o Cp están unidas a las fibrillas de la red de colágeno.

20 En otra realización, el biomaterial es inyectable y tiene una viscosidad adecuada para ser inyectado. El biomaterial inyectable comprende una suspensión de las partículas polipeptídicas aisladas y extraídas, preferiblemente en una solución de colágeno. La variación de las cantidades de Cs y/o Cp incorporadas en el material colágeno varía las propiedades biológicas y mecánicas del biomaterial gelificado resultante.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

25 Ejemplo 1 - Geles de colágeno densos que incorporan partículas de Cs o Cp aisladas y extraídas: Efecto sobre la mineralización y propiedades mecánicas (in vitro).

30 Se fabricaron geles de colágeno densos con diferentes cantidades de fracciones de polipéptidos derivadas de fibroína aisladas y extraídas (FDP) de acuerdo con una realización de la presente invención, como se ilustra en la Figura 2 y se describe a continuación. La FDP se aisló mediante la digestión de fibras de seda fibroína del gusano de seda Bombyx mori usando una α -quimotripsina, lo que dio como resultado la formación de una fracción precipitada (Cp) que comprendía fragmentos apolares altamente cristalinos y una fracción soluble (Cs) que comprendía secuencias de aminoácidos cargados negativamente y amorfas. Específicamente, la fibroína obtenida por desgomado de la seda se disolvió en una solución acuosa saturada de LiBr, a 60°C durante 3 h. La solución se filtró y se dializó frente a agua. Luego se añadió una solución de α -quimotripsina obtenida disolviendo la enzima en Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 5 mM a la solución de fibroína acuosa (concentración de enzima de 300 μ g/ml). La solución así obtenida se incubó a 37°C durante 24 h. La fracción de Cp precipitada se extrajo por centrifugación de la solución, mientras que la fracción de Cs se extrajo por liofilización, una vez que se había eliminado la fracción de Cp. Las fracciones tanto de Cs como de Cp extraídas estaban en forma de polvo/partículas.

40 El 10% en peso seco de Cp y el 10% en peso seco de Cs se añadieron luego a una solución de colágeno antes de la gelificación y la densificación del colágeno para formar el biomaterial. La cantidad requerida de las partículas de FDP extraídas se agregó a un medio de cultivo (DMEM 10x, D 2429, Sigma Aldrich) y se sonicó durante aproximadamente 1 a aproximadamente 10 minutos, preferiblemente aproximadamente 5 minutos. Para un contenido de partículas de FDP al 10% en peso seco, se añadieron 0,88 mg de partículas de FDP extraídas a 4 ml del medio de cultivo. Se añadió la solución de colágeno, una solución de tropocolágeno ácida (precursor de hidrogel de colágeno) (colágeno de tipo I extraído por la cola de rata, 2,05 mg/ml, FirstLink) y la solución se dejó durante 0 minutos a 12 horas, preferiblemente aproximadamente 1 hora, a una temperatura de aproximadamente 0°C a aproximadamente 37°C, preferiblemente a temperatura ambiente, para permitir que el tropocolágeno y las partículas de FDP extraídas interactúen para formar una suspensión de partículas de colágeno - FDP. Con el fin de gelificar, al menos parcialmente, la suspensión de partículas de colágeno FDP, el pH se ajustó de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 9,5 usando una base (por ejemplo, NaOH a pH 7,4). La solución final se incubó en un molde durante aproximadamente 15 minutos a 24 horas, preferiblemente 25 minutos, a una temperatura de aproximadamente 0°C a aproximadamente 37°C, preferiblemente aproximadamente 37°C para permitir la gelificación de las partículas de colágeno-FDP ('auto-ensamblaje'). Se apreciará que la solución de tropocolágeno, el medio de cultivo, el FDP y la base se pueden agregar en cualquier orden para obtener la suspensión final de colágeno-FDP. Además, la etapa de sonicación no es esencial, pero se prefirió para obtener una dispersión homogénea de las partículas de FDP en la suspensión y para evitar o minimizar la formación de agrupaciones. Además, se pueden usar diferentes concentraciones relativas de los ingredientes sin apartarse del alcance de la invención, como será evidente para los expertos en la técnica.

El biomaterial gelificado resultante se sometió luego a una "compresión plástica" para formar un gel denso. La "compresión plástica" se ha descrito completamente en el documento WO2006003442. Brevemente, los geles de colágeno-FDP altamente hidratados se sometieron a un esfuerzo de compresión no confinado (comprimido plásticamente) de 0,1 a 100 kPa, preferiblemente de aproximadamente 1 kPa, durante un período de 1 a 15 minutos, preferiblemente 5 minutos, lo que resultó en la expulsión de aproximadamente el 98% del contenido de líquido y un aumento correspondiente de 40 veces en la densidad fibrilar del colágeno de 0,3 a 14%. Por lo tanto, este paso produce construcciones densas de colágeno o esqueletos con una concentración controlada de proteínas y una estructura de mesoescala, mejorando así las características mecánicas de los hidrogeles de colágeno. La densa hoja de colágeno-FDP se laminó para formar una estructura cilíndrica de "rodillo suizo" para pruebas mecánicas.

Se encontró que el biomaterial resultante estaba en forma de un hidrogel que tenía un marco colágeno hibridado (unido, enlazado, conjugado) con FDP extraídos. Las figuras 3 y 4 ilustran realizaciones del biomaterial de la presente invención que tiene 10% en peso seco de Cp y Cs, respectivamente. En la Figura 3, la interacción y los enlaces entre la proteína de colágeno y las partículas Cp extraídas son evidentes a partir de la interconexión entre las nanofibrillas de colágeno y la partícula Cp. Sorprendentemente, se encontró que las nanofibrillas de colágeno habían extraído partículas de polipéptido Cp en sus extremos, lo que indicaba la formación de enlaces entre los dos, en lugar de solo la interacción electrostática. Las bandas de colágeno típicas muestran que la integración del Cp extraído antes del auto-ensamblaje (gelificación) del colágeno no altera la estructura natural del colágeno, en comparación con los geles de colágeno puro sin FDP extraído presente. Se encontró el mismo resultado para los biomateriales que solo extrajeron las fracciones del polipéptido Cs (Figura 4), donde los polipéptidos submicrométricos (nano)amorfo se encontraron homogéneamente distribuidos en el gel y unidos a las nanofibrillas de colágeno. La caracterización morfológica y química del biomaterial mostró que la hibridación del colágeno con los FDP extraídos se produjo a los 30 minutos de la gelificación del colágeno.

El análisis morfológico se corroboró mediante la espectroscopia ATR-FTIR del biomaterial, incluidas las fracciones de polipéptidos de Cp y Cs aisladas y extraídas, en comparación con un control de solo colágeno (Figura 5). La modificación de la vibración de las tres amidas (amida I a 1643 cm^{-1} , amida II a 1550 cm^{-1} y amida III a 1243 cm^{-1}) y la diferente resonancia de las cadenas laterales de aminoácidos entre 1150 y 800 cm^{-1} eran una indicación de interacción entre las fibrillas de colágeno y el FDP.

El comportamiento de mineralización de los biomateriales se evaluó colocando muestras de los biomateriales comprimidos en fluidos corporales simulados (SBF) hasta el día 7. Se utilizó colágeno puro como control. La diferencia en la cantidad de las fracciones de Cp y Cs extraídas en el biomaterial afectó a la actividad de mineralización de los biomateriales. Los biomateriales con polipéptidos Cp extraídos solo no mostraron diferencias estadísticamente significativas en su mineralización en SBF en comparación con el colágeno puro. Como se puede ver en la micrografía SEM de la Figura 6, las partículas de Cp extraídas permanecieron integradas y unidas al marco de colágeno. Ninguna formación de cristales fue visible.

Para biomateriales con partículas polipeptídicas Cs aisladas y extraídas solamente, se produjo una mineralización tridimensional homogénea en el primer día del acondicionamiento en SBF. El grado de mineralización se incrementó en comparación con el volumen de colágeno puro. La nucleación y el crecimiento de cristales de fosfato de calcio fueron visibles por microscopía SEM, microCT y ATR-FTIR (Figuras 7, 8 y 9). Los polipéptidos Cs ya no estaban visibles en la estructura del colágeno. Sin estar vinculado a ninguna teoría, se pensaba que esto se debía a que estaban involucrados en la nucleación y el crecimiento de cristales de hidroxiapatita carbonatada visibles por SEM. El análisis de EDX confirmó la presencia de cristales de fosfato de calcio en el día 7 en SBF. La mineralización, en forma de formación homogénea de hidroxiapatita carbonatada en el biomaterial, se detectó en los días 3 y 7 en SBF mediante microscopía ATR-FTIR (Figura 9) y XRD (Figura 10). El análisis termogravimétrico reveló que el grado de mineralización era una función del tiempo de acondicionamiento en SBF y que alcanzó un 57% en peso seco en el día 7. Las propiedades químicas del colágeno no fueron alteradas durante el proceso de mineralización.

Las propiedades mecánicas de los nuevos biomateriales en los días 0, 1, 3 y 7 en SBF se evaluaron mediante compresión no limitada del biomaterial laminado (Figuras 11 y 12). Se usó como control un rodillo de colágeno sin partículas de FDP extraídas incluidas. Todas las medidas de la muestra fueron verificadas por análisis microCT. Las muestras realizadas se caracterizaron después de 30 minutos de acondicionamiento previo en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). La caracterización mecánica se logró en cinco muestras repetidas utilizando un instrumento de prueba 5160 ElectroForce® Biodynamic® (Bose Corp., MN, EE.UU.) con una celda de carga de 15 N. El sistema se usó en el control de desplazamiento y se aplicó una tasa de $0,01\text{ mms}^{-1}$. Al considerar válida la aproximación de los tejidos blandos como material incompresible, la resistencia a la compresión se calculó como la relación de la fuerza medida frente al área de resistencia de la muestra cilíndrica. La deformación se calculó como el porcentaje de la altura inicial y el módulo de compresión se calculó como la pendiente de la porción lineal inicial de la curva de tensión-deformación. La relación tensión-deformación mostró propiedades mecánicas mejoradas debido a la incorporación de partículas FDP aisladas y extraídas en un marco de colágeno. La mejora en las propiedades mecánicas fue particularmente evidente en el biomaterial que incluía solo los polipéptidos Cp extraídos (Figura 11). La incorporación de partículas Cp extraídas dio como resultado un módulo de rendimiento más alto y una tensión de rendimiento menor. En la Figura 12, para los biomateriales mineralizados, las curvas de tensión-deformación muestran un comportamiento de transición de tejidos blandos a duros en geles de colágeno hibridados con los polipéptidos Cs extraídos y debido a la formación homogénea de hidroxiapatita carbonatada (CHA) dentro de los

constructos. En la Figura 12, los biomateriales mostraron una mayor mecánica de compresión en comparación con el control. El módulo de compresión de los biomateriales, incluida la fracción de Cp extraída, no se vio afectado por la mineralización, mientras que los biomateriales que incluían la fracción de Cs extraída mostraron un aumento significativo en el módulo de compresión con el tiempo en SBF. Juntos, estos resultados demostraron que variar la cantidad de las fracciones de Cs y Cp extraídas en el nuevo biomaterial puede adaptar las propiedades mecánicas del biomaterial. Cp incrementó la mecánica del biomaterial. Por lo tanto, un biomaterial con un contenido de partículas de Cp extraído sería un candidato ideal para la aplicación de tejidos blandos, por ejemplo, la administración de fármacos no mineralizantes. Los biomateriales con un contenido extraído de partículas de Cs mostraron una gran mineralización, cuando se exponían a un fluido corporal simulado, lo que convierte a este biomaterial en un candidato ideal para la aplicación en tejidos duros.

Ejemplo 2 - Colágeno que incorpora diferentes cantidades totales de los FDP aislados y extraídos: Efecto sobre las propiedades del biomaterial (in vitro).

Para evaluar el intervalo de las fracciones de polipéptidos extraídos soportadas por un material colágeno y retener las propiedades beneficiosas del material colágeno, según las realizaciones de la invención, se agregaron diferentes cantidades (de <0,1 a >50% en peso de FDP) del FDP extraído. (Cs solo, Cp solo y Cp y Cs juntos) a una solución de colágeno antes de la gelificación del colágeno. Se encontró que, a continuación, se extrajo un 0,1% de FDP, la adición de FDP extraído al colágeno fue insignificante en términos de mineralización y efectos mecánicos (como se indica en el Ejemplo 1). Además, la incorporación de FDP extraído por encima del 50% en peso seco se vio obstaculizada por la falta de integración entre colágeno y FDP a una concentración tan alta de polipéptidos en el gel. Se logró una alta integración de los polipéptidos con las nanofibrillas de colágeno, cuando se agregó de un 0,1 a 30% en peso seco de FDP.

Ejemplo 3 - Geles de colágeno densos que incorporan partículas de Cs y Cp aisladas y extraídas: Efecto sobre la mineralización y propiedades mecánicas (in vitro).

El método del Ejemplo 3 difiere del del Ejemplo 1 en que ambas partículas de polipéptido Cp y Cs extraídas se agregaron al medio de cultivo o a la solución de colágeno antes del autoensamblaje del colágeno. Las partículas de Cp y Cs extraídas se agregaron como 5 y 5% en peso seco, respectivamente. Se encontró que la incorporación de 5% en peso seco de Cp y 5% en peso seco de Cs juntos adaptaban aún más las propiedades del gel de colágeno, así como sus propiedades químicas y mecánicas. La investigación mecánica del biomaterial de colágeno denso que incorporaba partículas de Cs y Cp extraídas (DC-Cp-Cs) mostró propiedades entre el biomaterial de colágeno denso que incorporaba solo Cp (DC-Cp -10% en peso de Cp) y el biomaterial de colágeno denso que incorporaba solo Cs (DC-Cs -10% en peso seco de Cs) (Figura 13). DC-Cp-Cs tenía, de hecho, un menor contenido de Cp (que es responsable del aumento de la mecánica debido a su estructura cristalina), con respecto a DC-Cp y un mayor contenido con respecto a DC-Cs. Por el contrario, con el tiempo en el fluido corporal simulado (SBF), la menor cantidad de Cs en el gel de DC-Cp-Cs, con respecto a la de DC-Cs, causó una menor formación de hidroxiapatita carbonatada, lo que resultó en un menor módulo de compresión. Sin embargo, el módulo de compresión de DC-Cp-Cs fue mayor en los días 3 y 7 en SBF en comparación con el biomaterial DC-Cp. Estos resultados fueron corroborados por análisis termogravimétrico (TGA). La formación de minerales en DC-Cp-Cs fue de hecho más alta que DC-Cp pero más baja que DC-Cs. La Figura 14 muestra los cambios en los espectros relacionados con la formación de hidroxiapatita carbonatada dentro del marco de colágeno, ya que era visible por el aumento dependiente del tiempo en la absorbancia de los picos de fosfato entre 1100-900 cm^{-1} y de los picos de carbonato a alrededor de 1420 y 872 cm^{-1} . La figura 15 muestra el análisis termogravimétrico. El residuo en peso representa el grado de hidroxiapatita carbonatada formada en las construcciones.

Ejemplo 4 - Geles de colágeno densos que incorporan partículas de Cs aisladas y extraídas: Efecto sobre la mineralización in vivo en un sitio óseo.

Se produjeron geles híbridos densos de colágeno-Cs en forma de varillas, según una realización de la presente invención, como se describe en el Ejemplo 1 dispersando partículas de Cs extraídas (10% en peso seco) en la solución de colágeno antes del autoensamblaje y luego aplicando una técnica de procesamiento de compresión de plástico. La mineralización de estos biomateriales se evaluó implantando estos biomateriales acelulares (n = 6) en defectos bilaterales de tamaño crítico femoral (l = 6 mm) en ratas Sprague Dawley™ (peso > 350 g) y utilizando geles de colágeno densos y defectos vacíos como controles. Los implantes se extrajeron a las 9 semanas y se analizaron mediante microCT, lo que mostró que el biomaterial experimentó una mineralización en masa homogénea (Figura 16). En contraste, los controles de gel de colágeno presentaron mineralización solo en la capa externa.

Ejemplo 5 - Geles de colágeno densos que incorporan partículas de Cs aisladas y extraídas: Efecto sobre la mineralización in vivo en un sitio no óseo

Se produjeron geles híbridos de colágeno-Cs densos en forma de disco, según una realización de la presente invención, como se describe en el Ejemplo 1 dispersando partículas de Cs extraídas (10% en peso seco) en la solución de colágeno antes del autoensamblaje y luego aplicando una técnica de fabricación por compresión de plásticos. Ratas Sprague Dawley™ (peso > 350 g) recibieron 2 implantes subcutáneos en ambos lados de la columna justo detrás de los omóplatos. Cada rata recibió dos tratamientos: geles de colágeno densos control y geles

densos de colágeno-Cs de acuerdo con una realización de la presente invención. Después de 7 días, se recogió el tejido para su análisis y se observó la formación de hueso a través de mediciones microCT (Figura 17). Las muestras de colágeno control no se mineralizaron, ya que no se distinguían del tejido blando circundante (Figura 17, primera fila). En contraste, los biomateriales de colágeno-Cs se sometieron a mineralización, ya que aparecían con un gris más claro que el tejido blando circundante en la reconstrucción microCT transversal (Figura 17, segunda fila). Los círculos grises muy claros en las reconstrucciones transversales representan las costillas que rodean los implantes.

Ejemplo 6 - Geles de colágeno sembrados con células que incorporan partículas de Cs aisladas y extraídas: Osteogenicidad

Se produjeron geles híbridos de colágeno-Cs densos, según una realización de la presente invención, como se describe en el Ejemplo 1, utilizando un 10% en peso seco de partículas de Cs extraídas. Se encontró que los biomateriales resultantes se pueden sembrar de manera homogénea con diferentes tipos de células (por ejemplo, osteoblastos o células madre como MSC, densidad celular: 0,5 k-1000 k células/ml de solución de colágeno). En este ejemplo, se sembraron células madre mesenquimatosas de ratón (m-MSC) en el punto de autoensamblaje de colágeno (gelificación). El potencial osteogénico del biomaterial de colágeno-Cs de células sembradas se investigó en medio osteogénico. La viabilidad celular se investigó a través de proyecciones de intensidad máxima del citoplasma celular marcado con calceína-AM y la unión del núcleo EtBr-1 en todo el radio de las construcciones en función del tiempo en el cultivo (días 1, 7, 14 y 21). La actividad metabólica celular se evaluó a través del ensayo Alamar Blue®. La diferenciación osteoblástica se evaluó mediante la expresión de genes osteoblásticos como la fosfatasa alcalina (ALP), el factor de transcripción relacionado con runt 2 (Runx2) y la osteopontina (OPN). Cualitativamente, se usó la tinción de Von Kossa de las secciones histológicas de los geles para evaluar la distribución de la formación de minerales. FTIR también se utilizó para evaluar la fase mineral formada.

La columna izquierda de la Figura 18 muestra los resultados obtenidos para los geles de colágeno, utilizados como control. La columna derecha de la Figura 18 muestra los resultados obtenidos para los geles de colágeno-Cs sembrados con células, de acuerdo con una realización de la presente invención. La unión de m-MSC al marco de colágeno se indicó ya en el día 1. Progresivamente, en los días 7, 14 y 21 hubo un aumento en el número de células en ambos ambientes de gel, una indicación de la excelente citocompatibilidad de los polipéptidos Cs extraídos. Además, la actividad metabólica de las m-MSC sembradas en colágeno y colágeno-C no fue estadísticamente diferente ($p > 0,05$) para todo el tiempo de cultivo (21 días), a partir de los resultados de reducción de Alamar Blue (Figura 19a). Sorprendentemente, los colágeno-Cs sembrados con mMSC regularon por incremento la expresión de genes osteoblásticos como ALP, Runx2 y OPN en comparación con el cultivado en los geles de colágeno control, lo que indicó una notable diferenciación osteoblástica acelerada (Figura 19b). Además, hubo un aumento sustancial en la mineralización de los colágenos (Figura 20). La tinción de Von Kossa para fosfato de calcio de secciones histológicas representativas de m-MSC sembradas en colágeno y rollos de biomaterial de colágeno-Cs se tomó en los días 14 y 21 en cultivo. Las manchas marrones representan las células, mientras que las regiones más oscuras representan la matriz mineralizada (Figura 20 a hasta d). Los nódulos de mineralización estaban presentes en el biomaterial de colágeno-Cs, pero no en los geles de colágeno de control en el día 14 en cultivo, lo que indicó una mineralización acelerada de los geles híbridos. Además, mientras que los geles de colágeno y de colágeno-Cs se tiñeron positivamente en el día 21, la mineralización de las estructuras híbridas fue más homogénea y presente en todo el espesor de los geles. En la Figura 21 se presentan los espectros ATR-FTIR de los geles de colágeno y colágeno-Cs sembrados con m-MSCs en los días 14 y 21 en cultivo. Un aumento en la absorbancia de las bandas ν_3 PO_4^{3-} y ν_2 CO_3^{2-} a 1018 y 872 cm^{-1} (flecha negra), respectivamente, sugirió la formación de hidroxiapatita carbonatada. Una mayor absorbancia de la vibración ν_3 PO_4^{3-} en los días 7, 14 y 21 indica una mineralización acelerada de los biomateriales de colágeno-Cs en comparación con los controles de colágeno de células sembradas.

Ejemplo 7 - Geles de colágeno sembrados con células que incorporan partículas Ts aisladas y extraídas: Viabilidad celular

Ts es la fracción soluble de fibroína de seda obtenida a través de la tripsinización de la proteína. La fracción Ts se extrajo siguiendo el mismo procedimiento experimental descrito en el Ejemplo 1 para Cs, pero utilizando tripsina como proteasa en lugar de α -quimotripsina. Se produjeron geles híbridos densos de colágeno-Ts en forma de varillas sembradas mediante la dispersión de m-MSC y se extrajeron partículas de Ts (10% en peso seco) en la solución de colágeno antes del autoensamblaje y luego se aplicó la técnica de fabricación de compresión de plástico como se describe en los Ejemplos 1 y 6. Se usó microscopía láser de barrido confocal para investigar la viabilidad celular en sistemas híbridos de colágeno-Cs y colágeno-Ts a través de proyecciones de intensidad máxima del citoplasma celular marcado con calceína-AM y la unión del núcleo EtBr-1 en todo el radio de las construcciones en los días 1 y 7 en cultivo (Figura 22). La fila superior muestra los rollos híbridos Coll-Cs en los días 1 y 7 en cultivo, y la fila inferior muestra los rollos híbridos Coll-Ts en los días 1 y 7 en cultivo. En el día 1, m-MSC se adhirieron bien al esqueleto de Coll-Cs, mientras que en Coll-Ts m-MSCs mantuvieron la forma redonda, típica del estado no adherente. En el día 7 hubo un aumento en el número de células para los geles Coll-Cs. Por el contrario, los m-MSC cultivados en geles Coll-Ts resultaron en un estado de sufrimiento, ya que no proliferaron y no estaban bien adheridos a la matriz colagenosa. La capacidad de Cs no solo para mantener la viabilidad celular sino también para dirigir el linaje osteoblástico de las células madre se confirmó al comparar Cs con otra fracción polipeptídica derivada

de la fibroína, Ts. Ts pareció afectar negativamente a las m-MSC sembradas en el biomaterial, y puede considerarse citotóxico.

Ejemplo 8 - Geles de colágeno que incorporan partículas de Cs aisladas y extraídas: Inyectable

5 Los geles Coll-Cs sembrados con h-MSC inyectables se prepararon de acuerdo con una realización de la presente invención mezclando 3,2 ml de solución de colágeno tipo I con 0,8 ml de medio de Eagle modificado con Dulbecco
10 10 veces concentrado (10 x DMEM), 30 μ l de NaOH 5 M y h-MSCs (alrededor de 5k-1000k células/ml de solución de colágeno, preferiblemente 2×10^5 células/ml). La solución (4 ml) se colocó luego en una jeringa de vidrio y se ajustó para iniciar la fibrillogénesis a 4°C durante 35 minutos. El biomaterial parcialmente gelificado se inyectó luego a través de una aguja metálica ($\varnothing = 0,05-1,5$ mm) en un sitio in vivo. El biomaterial inyectado continuó su
15 autoensamblaje in vivo. Las células permanecieron viables después de la inyección. Se apreciará que diferentes tipos de células pueden administrarse de esta manera (por ejemplo, osteoblastos o células madre). Al inyectar el biomaterial, se obtiene un procedimiento menos invasivo. Una vez inyectado, el biomaterial puede gelificarse aún más in situ, rellenar formas difíciles y permitir el contacto directo entre las células trasplantadas contenidas en el biomaterial y el tejido del huésped. Se puede usar un intervalo de FDP extraído de <0,1 a >50% en peso seco, con una preferencia por el 10% en peso.

Ejemplo 9 - Caracterización de Cs y Cp aislados y extraídos

Se aislaron las fracciones de Cs y Cp y se extrajeron de la fibroína de seda como se describe en el Ejemplo 1. Específicamente, se preparó un ~1% p/v de fibroína de seda (SF) disolviendo 1,7 g de SF-f con 50 ml de LiBr
20 acuoso saturado, a 60°C, durante 3 horas. Después de la dilución con 50 ml de agua destilada, la solución se filtró y se dializó profundamente contra agua hasta la eliminación completa de la sal. La concentración de SF se determinó espectrofotométricamente a 280 nm ($A_{1\%,1\text{ cm}} = 11,3$).

Preparación de fracciones quimotripticas de SF: Se diluyó 1:1 un SF al 1% p/v con carbonato de amonio acuoso 0,1 M, a lo que se añadió α -quimotripsina, previamente disuelta en un pequeño volumen de HCl 1 mM. La relación de
25 enzima a sustrato fue de 1:100. La solución se incubó a 37°C durante 24 horas, durante las cuales se formó un precipitado gelatinoso. El precipitado (fracción Cp) se recuperó por centrifugación, se lavó dos veces con agua y luego se liofilizó. El sobrenadante se combinó en lavados y se liofilizó para recuperar los péptidos solubles (fracción de Cs).

Análisis de aminoácidos: después de la hidrólisis ácida con HCl 6N, a 105°C durante 24 horas, al vacío, los aminoácidos libres se determinaron mediante HPLC de acuerdo con el Método de AccQ-Tag (Waters). Las muestras
30 fueron analizadas por duplicado. Se utilizó calibración estándar externa (Amino Acid Standard H, Pierce). Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1 - Composición de aminoácidos

Aminoácido (mol %)	Fibroína de seda	Sericina de seda	Fracción Cs	Fracción Cp
Asp	1,6	17,0	4,5	0,4
Ser	11,3	34,8	9,2	11,8
Glu	1,2	4,1	3,1	0,3
Gly	45,9	15,8	36,9	49,1
His	0,3	1,4	0,5	0,0
Arg	0,5	2,5	1,3	0,1
Thr	0,9	6,9	1,9	0,5
Ala	28,6	4,7	24,0	32,0
Pro	0,4	0,7	1,0	0,1
Cys	0,0	0,3	0,0	0,0
Tyr	5,1	3,4	7,5	3,7
Val	2,1	3,2	4,2	1,1
Met	0,1	0,0	0,3	0,0

ES 2 733 289 T3

Lys	0,3	2,7	0,9	0,1
Ile	0,6	0,7	1,6	0,2
Leu	0,5	1,3	1,7	0,1
Phe	0,7	0,4	1,5	0,3

Las características típicas de la composición de aminoácidos de las proteínas de seda son:

5 Fibroína de seda (SF): alto contenido de Gly, Ala y Ser, que suman aproximadamente el 85% en moles; Tyr representa aproximadamente el 5% en moles; los aminoácidos ácidos y básicos suman aproximadamente 2,7 y 1,1% en moles, respectivamente; este patrón característico de aminoácidos resulta de la contribución de al menos tres polipéptidos:

-la cadena pesada (H), 350 kDa (nativa), que contribuye con aproximadamente el 90% del peso total de SF; su secuencia es del tipo poli (Ala-Gly), porque las repeticiones $-(\text{Gly-Ala})_n-$ forman la mayor parte de la estructura primaria;

10 -la cadena ligera (L) y P25, 25 kDa cada una (nativa); estos dos polipéptidos son más heterogéneos en su composición;

-las cadenas H y L están unidas por un puente disulfuro; la relación molar H:L:P25 es 6:6:1;

15 Sericina de seda (SS): el SS nativo está compuesto por 5-6 polipéptidos, que varían ampliamente en peso molecular (40-400 kDa); su estructura primaria se caracteriza por un alto contenido de Ser (de 30 a 40% en moles en los polipéptidos individuales), Asp (16-17% en moles) y Thr (~ 7% en moles). Las SS son proteínas globulares que se adhieren a la superficie del componente fibroso de SF en un estado desnaturalizado debido a las tensiones físicas y mecánicas que ocurren durante el hilado de la seda.

20 Se aislaron péptidos de fibroína de seda sometiendo una solución acuosa de SF a digestión quimotríptica. La especificidad de escisión de la α -quimotripsina es la siguiente: Trp, Tyr, Phe (alta especificidad), Leu, Met, His (baja especificidad). Teniendo en cuenta la estructura primaria de las cadenas H y L de SF (conocida en la literatura), podemos esperar un gran número de sitios de escisión, es decir: cadena H: 317 (hi), 332 (lo) y cadena L: 21 (hi), 47 (lo) (Tabla 2). La digestión quimotríptica de SF da como resultado dos fracciones peptídicas, cada una de las cuales representa aproximadamente un 50% en peso del material de partida. Una fracción es soluble en agua (Cs) y está formada por péptidos SF que pertenecen a las regiones amorfas de la fibra. Su composición de aminoácidos está enriquecida en residuos con cadenas laterales voluminosas y polares, aunque Gly y Ala siguen siendo las más abundantes. El peso molecular de estos péptidos es altamente variable, variando de 2 a 10 kDa. La otra fracción (Cp), que precipita durante la digestión enzimática, está formada por los péptidos más hidrófobos que comprenden principalmente las secuencias repetitivas (Ala-Gly) características de las regiones cristalinas de la fibra.

25

Tabla 2. Escisión enzimática de la cadena pesada de fibroína de seda por α -quimotripsina.

Enzima	Nº de divisiones	Posición de sitios de división
α -Quimotripsina	317	6 15 18 26 30 31 84 115 123 129 135 141 145 171 189 201 213 225 237 249 261 273 311 323 333 341 363 369 385 393 397 405 409 483 491 537 545 553 561 631 639 643 651 678 681 687 693 695 697 701 741 749 753 761 851 859 929 937 941 949 1031 1039 1043 1051 1115 1123 1127 1135 1193 1197 1205 1232 1235 1241 1244 1246 1248 1254 1286 1294 1298 1306 1370 1374 1382 1440 1448 1452 1460 1518 1522 1530 1588 1596 1600 1608 1635 1638 1644 1647 1649 1651 1657 1691 1695 1703 1779 1787 1791 1799 1826 1829 1835 1838 1840 1842 1848 1894 1902 1906 1914 1990 1998 2062 2070 2074 2082 2104 2112 2116 2124 2212 2220 2224 2232 2266 2270 2297 2300 2306 2309 2311 2313 2319 2347 2355 2359 2367 2389 2397 2407 2447 2451 2459 2505 2513 2517 2525 2589 2616 2619 2625 2628 2630 2632 2638 2672 2680 2684 2692 2744 2796 2804 2808 2816 2888 2892 2900 2956 2964 2968 2976 3084 3092 3096 3104 3164 3168 3176 3184 3192 3228 3255 3258 3264 3267 3269 3271 3277 3311 3319 3359 3411 3415 3423 3427 3435 3487 3495 3499 3507 3579 3583 3591 3647 3655 3659 3667 3747 3755 3759 3767 3794 3797 3803 3806 3808 3810 3816 3838 3842 3850 3858 3866 3908 3912 3920 3928 3936 3988 3992 4000 4008 4016 4094 4102 4106 4113 4159 4186 4189 4194 4197 4199 4201 4207 4229 4237 4241 4249 4323 4331 4335 4343 4413 4417 4425 4433 4441 4501 4505 4532 4535 4541 4544 4546 4548 4554 4576 4584 4588 4596 4654 4658 4666 4674 4682 4754 4758 4766 4774 4782 4852 4860 4928 4932 4940 4946 4950 4958 5008 5016 5024 5072 5114 5139 5142 5148 5154 5156 5158 5164 5208 5214 5233 5235 5255

5 La Figura 23 muestra la caracterización fisicoquímica de la fibra de seda y sus fracciones de Cp y Cs extraídas, a) perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento de SF y de Cp y Cs α -quimotriptico de la proteína que indican su peso molecular; b) espectros ATR-FTIR de SF, Cp y Cs. Las entradas izquierda y derecha muestran un primer plano de las resonancias de amida I y III, respectivamente. Los espectros de los fragmentos de SF y Cp confirmaron su estructura de lámina β antiparalela (absorbancia de amida I a 1692 y 1621 cm^{-1}), mientras que el espectro de los fragmentos Cs era compatible con un polipéptido amorfo, con pocas estructuras de lámina β .

Ejemplo 10 - Cs y Cp aislados y extraídos solos: comportamiento de mineralización en SBF

10 Las fracciones de polipéptidos Cs y las fracciones de polipéptidos Cp se aislaron de fibroína de seda y se extrajeron como se describe previamente (Ejemplo 1). Las fracciones de polipéptidos extraídos se colocaron en fluido corporal simulado (SBF) durante 12 horas para evaluar su mineralización. Como se puede ver en los espectros ATR-FTIR de la Figura 24, Cs calculó la formación de apatita carbonatada ya que sus espectros se caracterizaron por absorciones fuertes con carbonato (1440 y 872 cm^{-1}) y fosfato (1078, 1035 y 957 cm^{-1}). La fibroína de seda y la Cp extraída mostraron solo indicaciones menores o nulas en la formación de apatita, respectivamente. Las entradas izquierda y derecha muestran una representación de las resonancias de amida I y III, respectivamente.

REIVINDICACIONES

1. Un biomaterial que comprende una fracción soluble Cs o una fracción precipitada Cp incorporada en un hidrogel o un precursor de hidrogel, siendo dicha fracción soluble Cs o dicha fracción precipitada Cp una fracción polipeptídica de fibroína aislada y extraída de forma quimotriptica.
- 5 2. Un biomaterial según la reivindicación 1, en el que la fracción polipeptídica aislada y extraída se incorpora en un precursor de hidrogel y el biomaterial puede gelificarse in situ, opcionalmente en el que el precursor de hidrogel es una solución de colágeno.
3. Un biomaterial según la reivindicación 1, en el que la fracción polipeptídica aislada y extraída se incorpora en un hidrogel y el biomaterial es sustancialmente sólido o similar a un gel y es implantable, opcionalmente en el que el hidrogel es un material colágeno, tal como colágeno tipo I.
- 10 4. Un biomaterial según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la fracción de polipéptido aislada y extraída se incorpora en el hidrogel o precursor de hidrogel en el intervalo de 0,1 a 50% en peso seco; de 0,1 a 30% en peso seco o 10% en peso seco, en el que el hidrogel o el precursor de hidrogel es un hidrogel de colágeno o un precursor de hidrogel de colágeno.
- 15 5. Un biomaterial según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la fibroína se origina a partir de un gusano de seda o una araña.
6. Un biomaterial según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el biomaterial comprende además células, moléculas de fármaco, agentes terapéuticos, partículas o agentes bioactivos.
7. Un biomaterial según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la fracción polipeptídica aislada y extraída está en forma de partículas.
- 20 8. Un biomaterial según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el hidrogel se selecciona de uno cualquiera de colágeno, alginato, hialuronano, quitosano, fibrina, agarosa y poliacrilamida.
9. Un biomaterial según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en medicina.
10. Un biomaterial de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso:
 - 25 a) en la construcción, regeneración, reparación, reemplazo o aumento de tejido blando o duro en un cuerpo humano o animal; o
 - b) como un vehículo de liberación de células, moléculas o partículas in vivo.
11. Un biomaterial según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 10 para su uso en la promoción de la mineralización en un cuerpo humano o animal.
- 30 12. Un método para fabricar un biomaterial que comprende:

aislar y extraer una fracción polipeptídica de fibroína por digestión quimotriptica de la fibroína y la separación de una fracción soluble Cs, o una fracción precipitada Cp de la fibroína digerida,

incorporar la fracción soluble Cs o la fracción precipitada Cp en un precursor de hidrogel o un hidrogel; y

opcionalmente además que comprende al menos parcialmente gelificar el precursor de hidrogel y, opcionalmente, en el que el precursor de hidrogel es una solución de colágeno.
- 35 13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el precursor de hidrogel es una solución de colágeno y el pH de la solución de colágeno se ajusta de 5,5 a 9,5, preferiblemente de pH de 6 a 9 para iniciar una gelificación, al menos parcial.
- 40 14. Un método de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13, que comprende además extraer al menos algo de fluido del biomaterial al menos parcialmente gelificado para formar un biomaterial denso, o que comprende además añadir células, moléculas de fármaco, agentes terapéuticos, partículas o agentes bioactivos al precursor de hidrogel o al biomaterial.
- 45 15. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que la, al menos una, fracción de polipéptido extraída se incorpora en el precursor de hidrogel en el intervalo de 0,1 a 50% en peso seco, de 0,1 a 30% en peso seco, o 10% en peso seco; en el que el hidrogel o el precursor de hidrogel es un hidrogel de colágeno o un precursor de hidrogel de colágeno, opcionalmente en el que las fracciones de Cs y Cp aisladas y extraídas se proporcionan en cantidades diferentes o iguales.

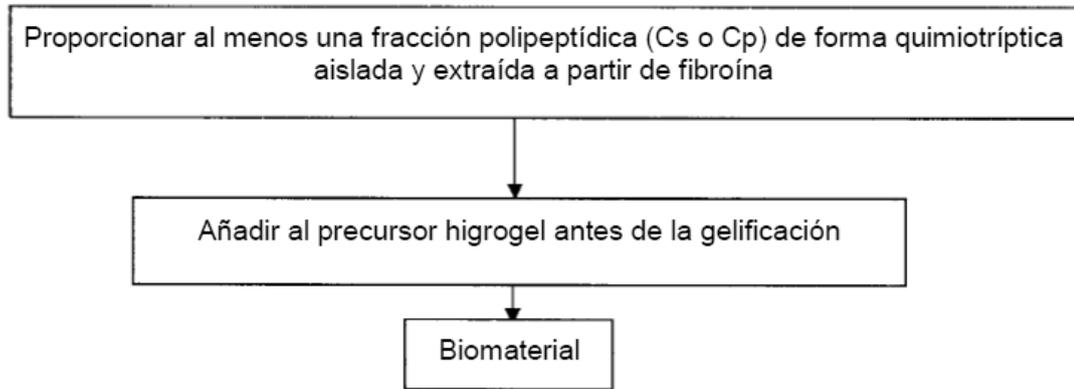


Figura 1

Cp, Cs, Colágeno,
NaOH, DMEM 10x

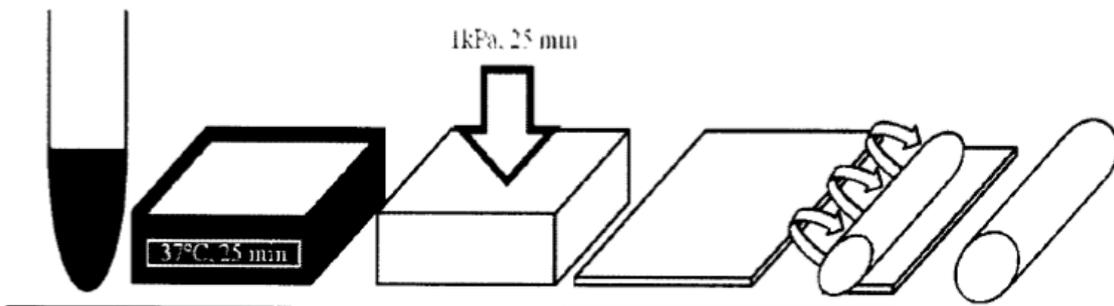


Figura 2



Figura 3

Figura 4

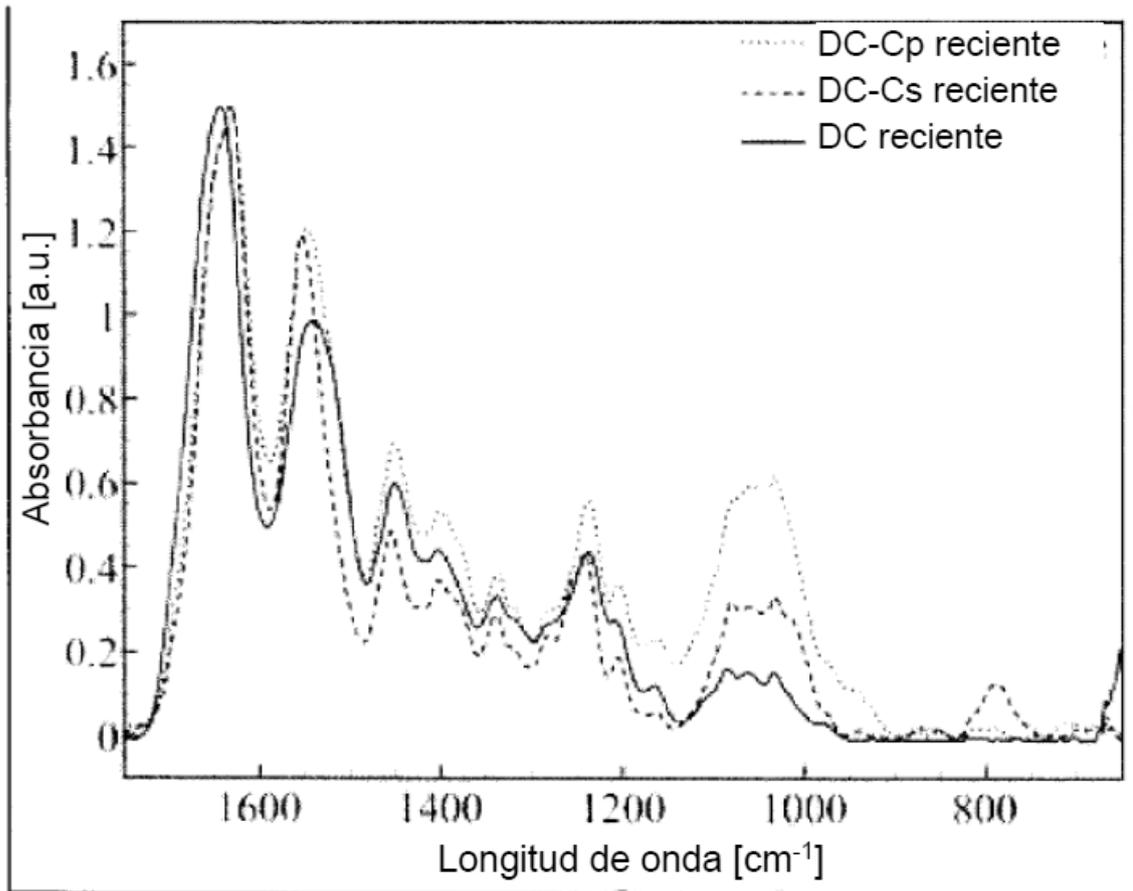


Figura 5

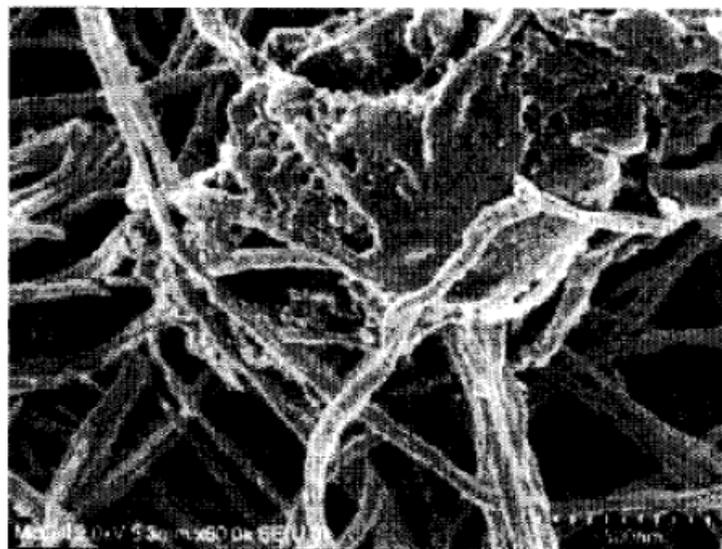


Figura 6

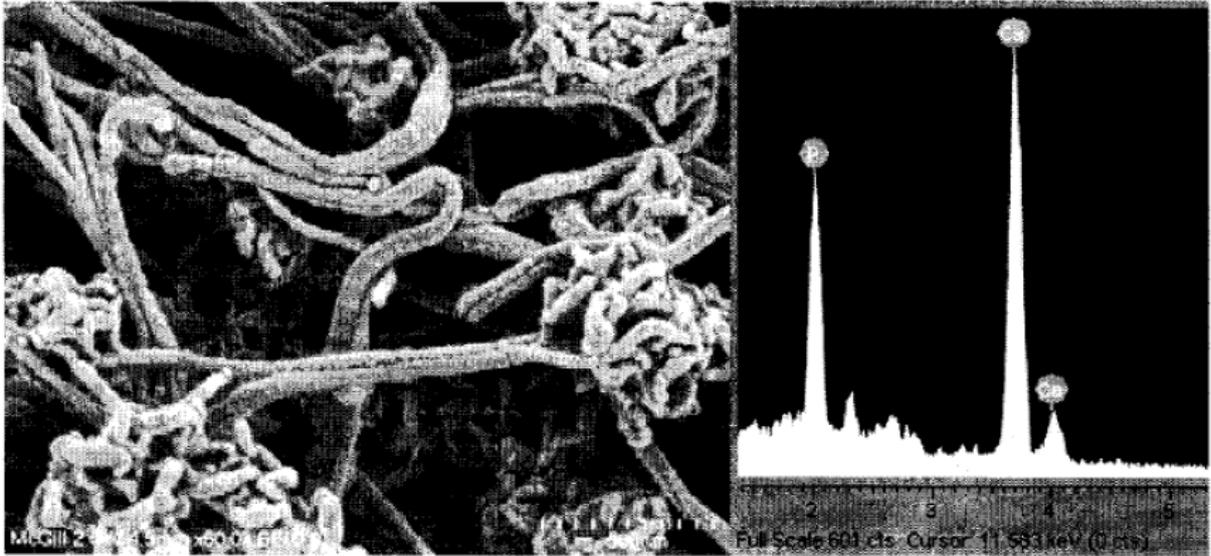


Figura 7

Figura 8

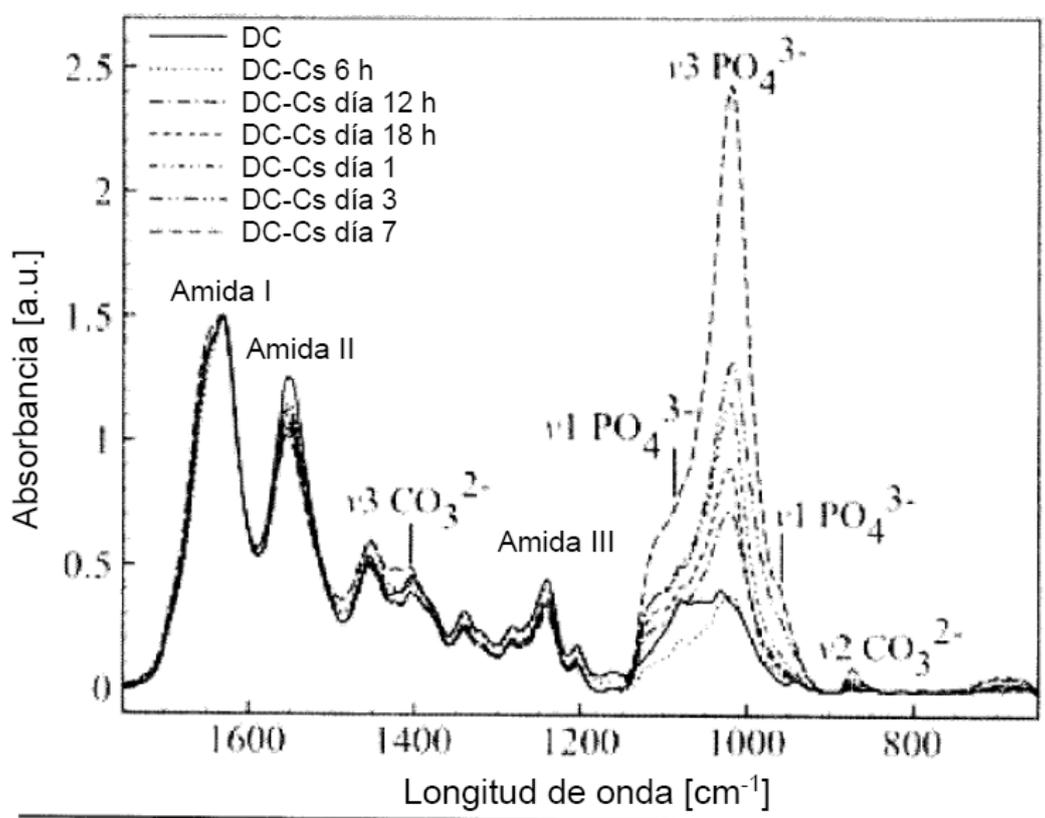


Figura 9

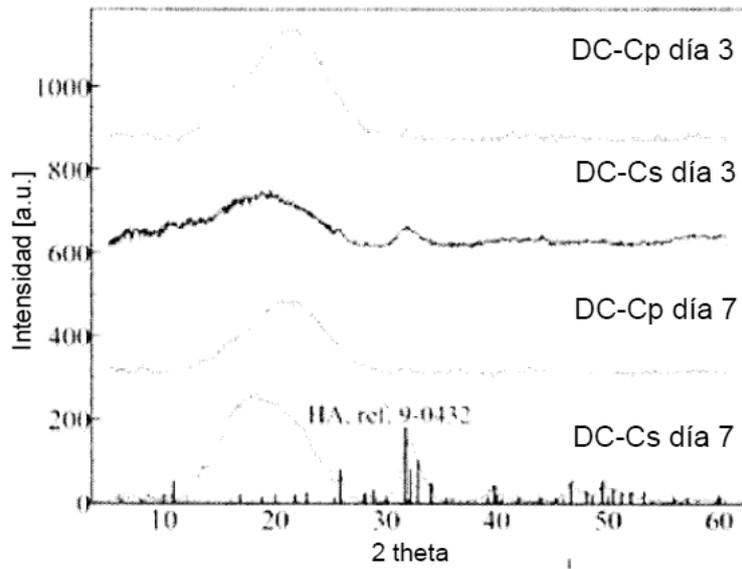


Figura 10

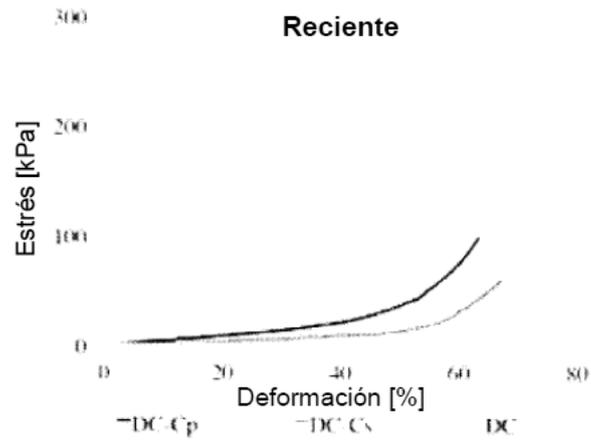


Figura 11

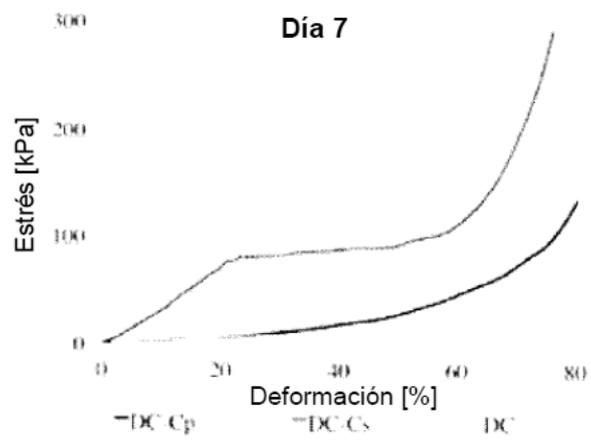


Figura 12

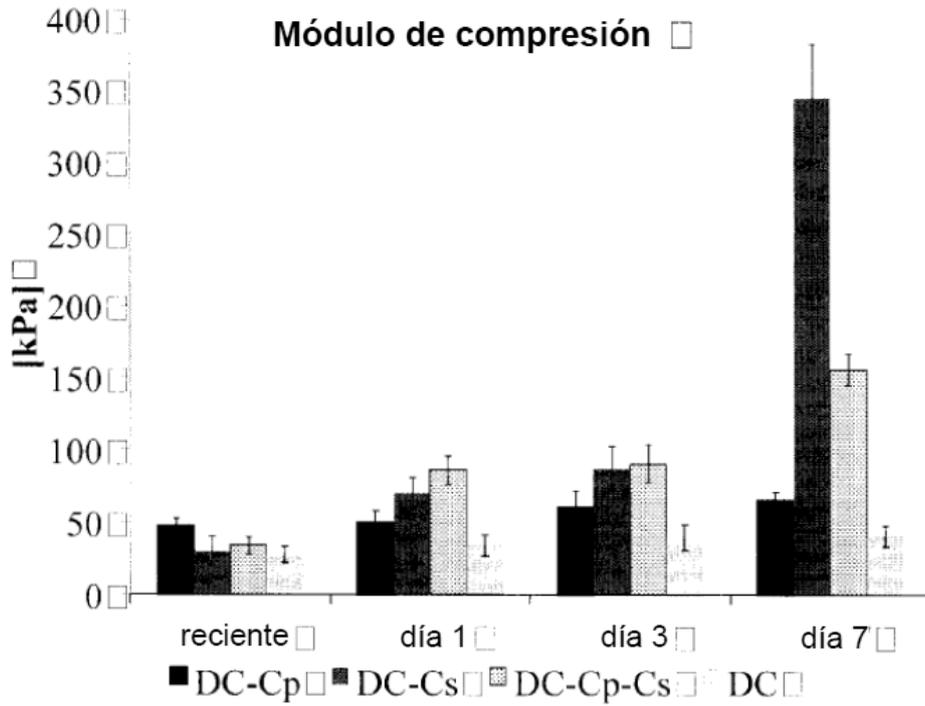


Figura 13

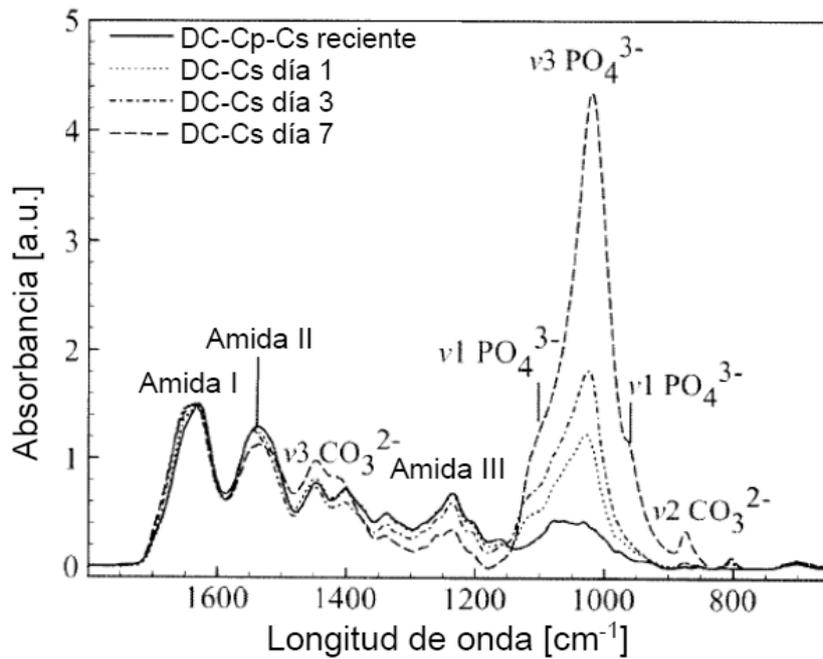


Figura 14

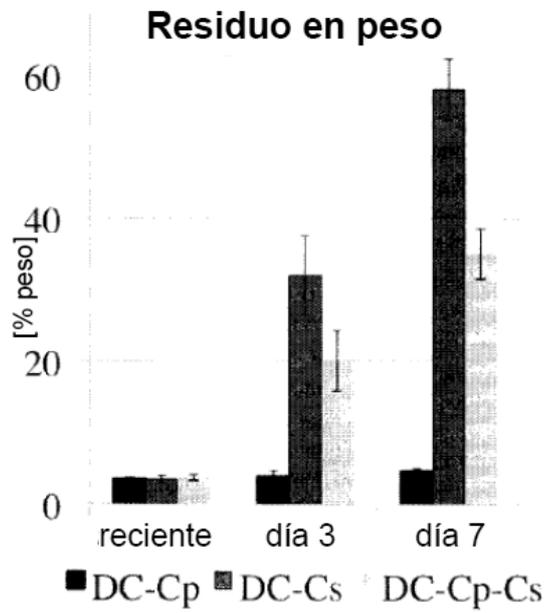
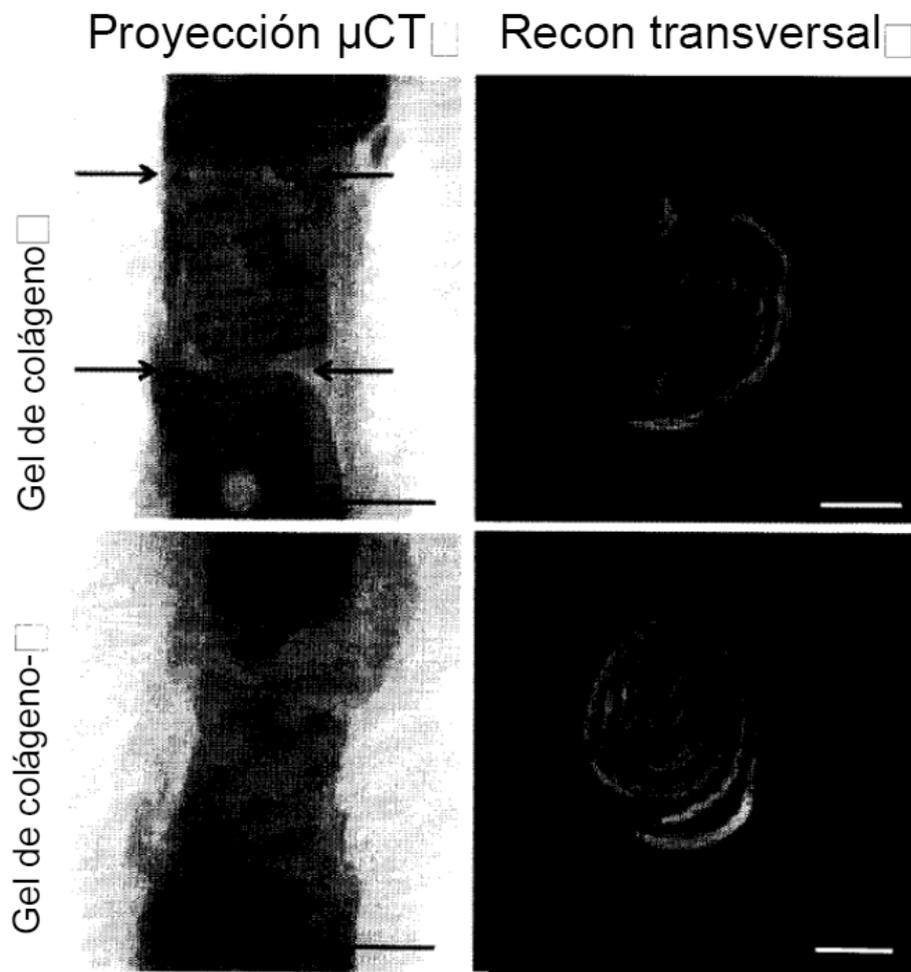
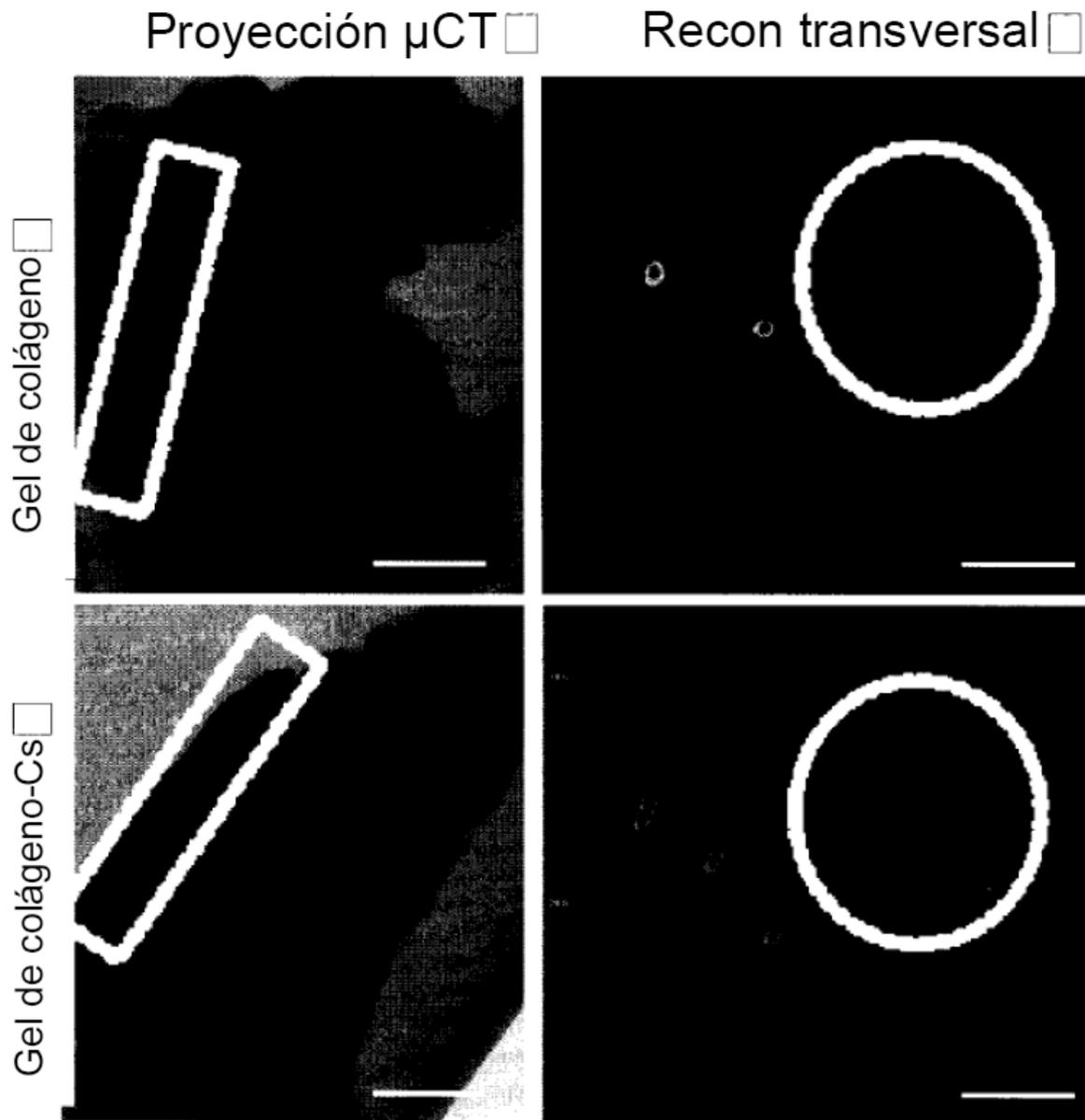


Figura 15



Barras de escala = 10 mm

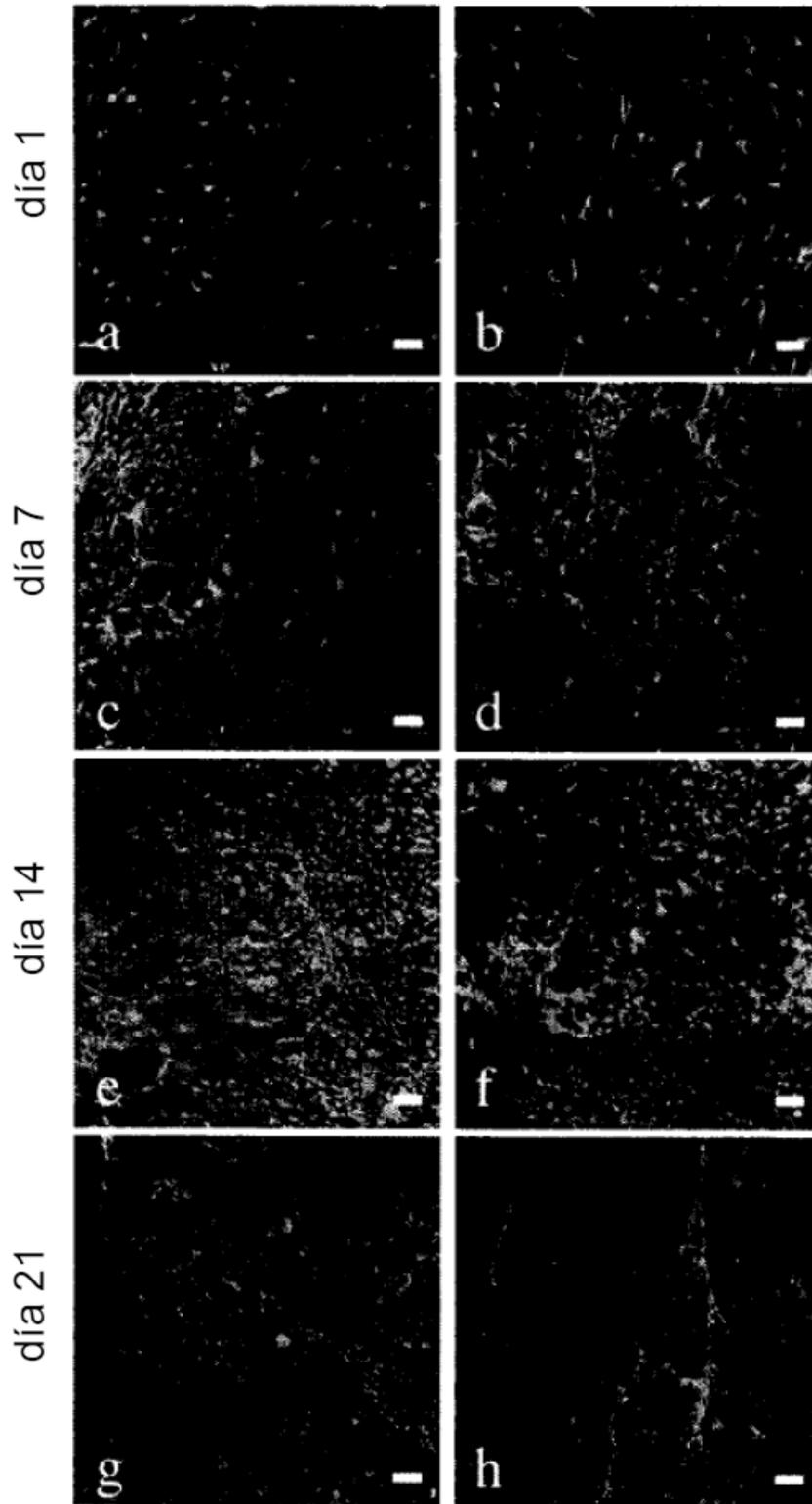
Figura 16



Barras de escala = 10 mm

Figura 17

Gel de colágeno Gel de colágeno-Cs



Barras de escala = 100 micras

Figura 18

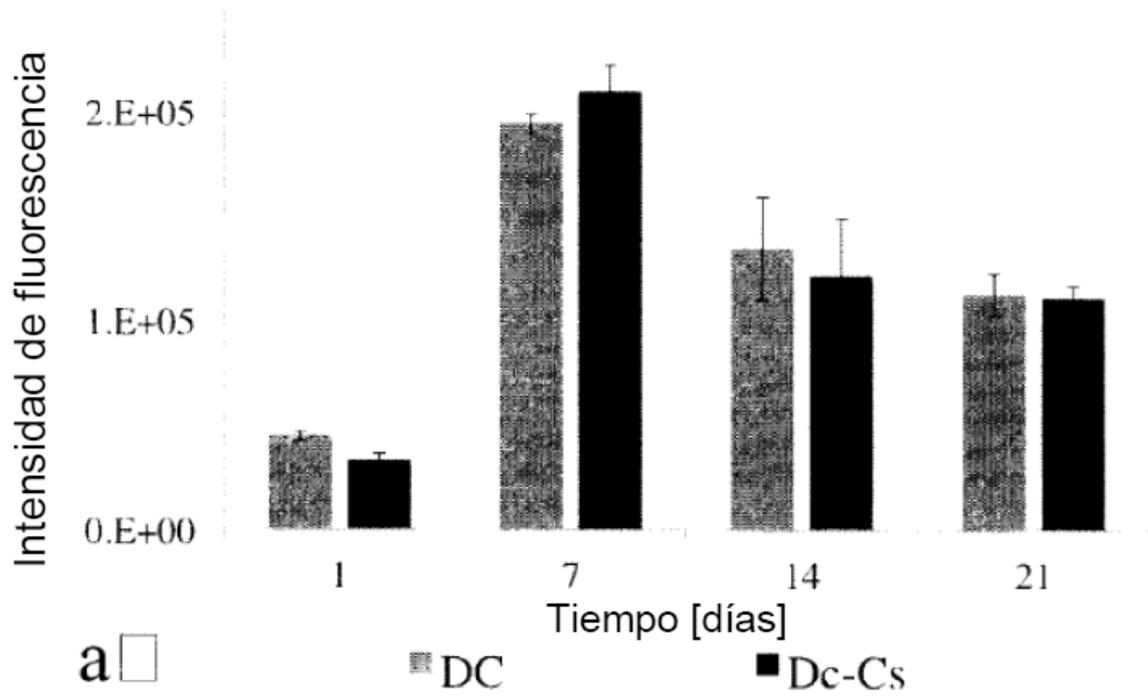


Figura 19a

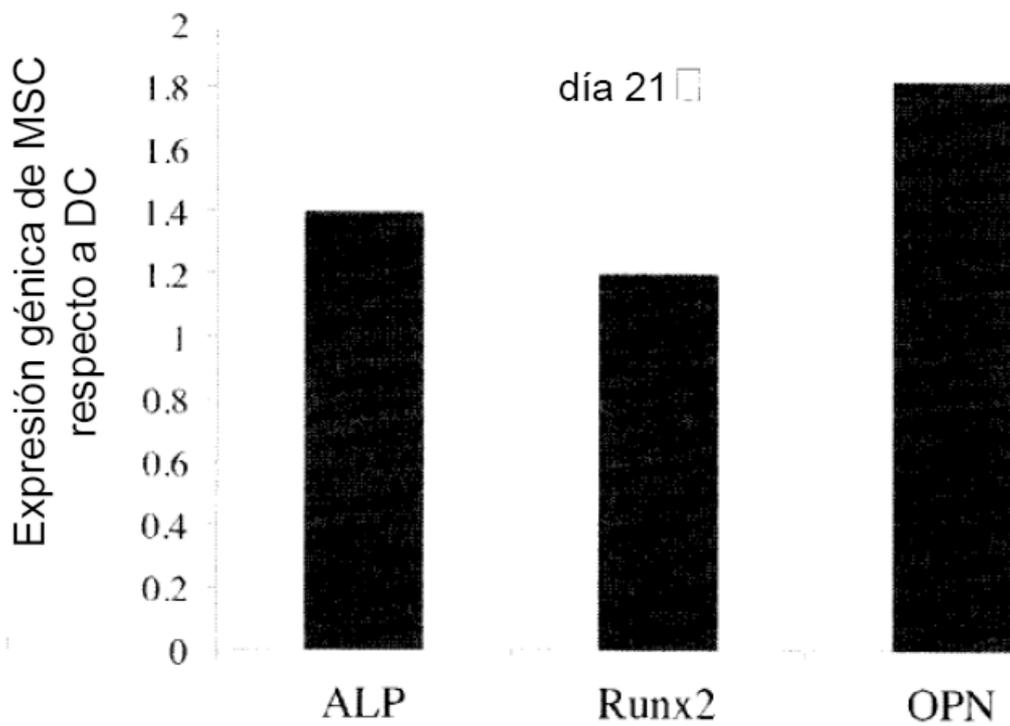


Figura 19b

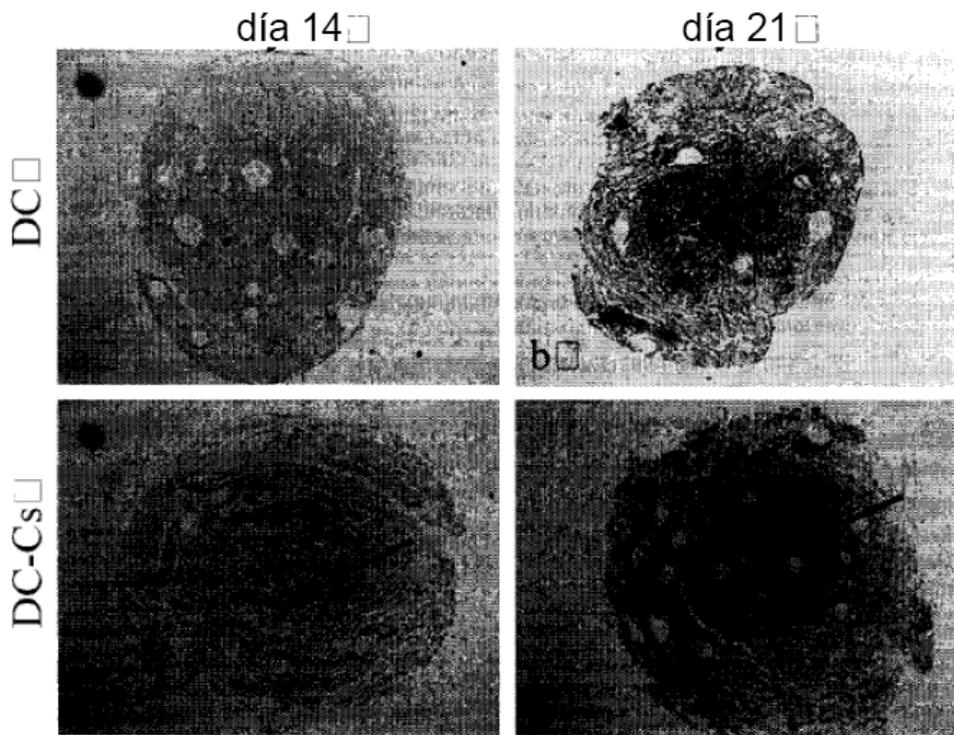


Figura 20

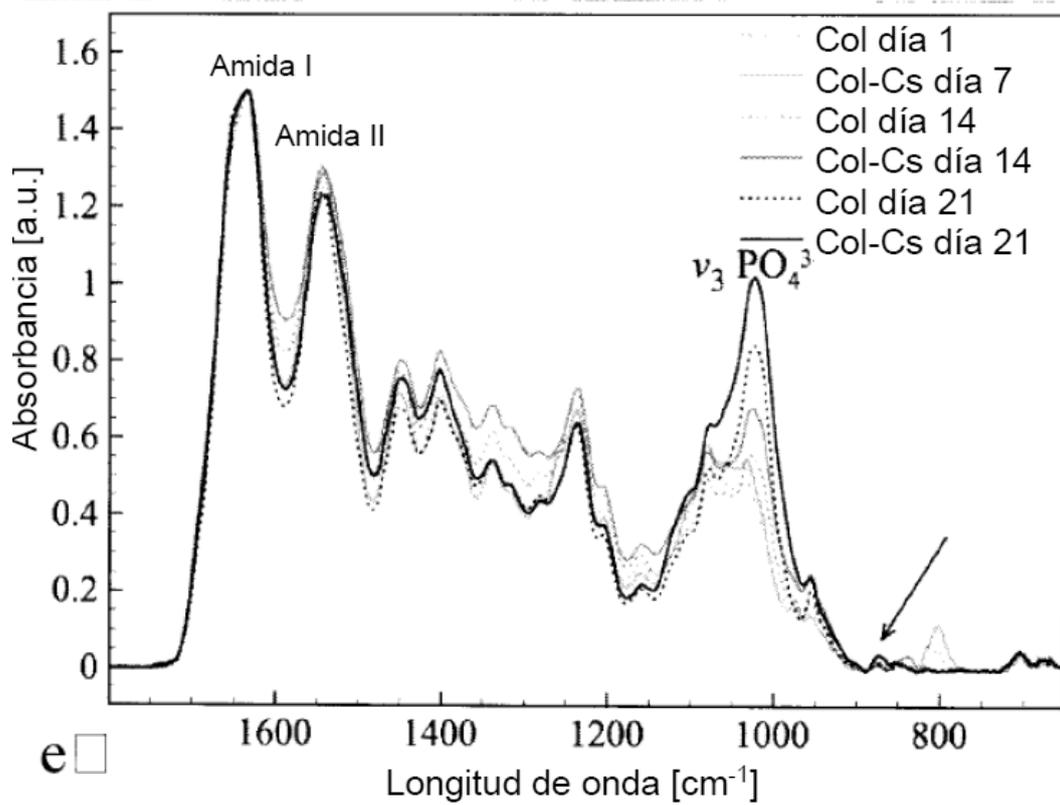


Figura 21

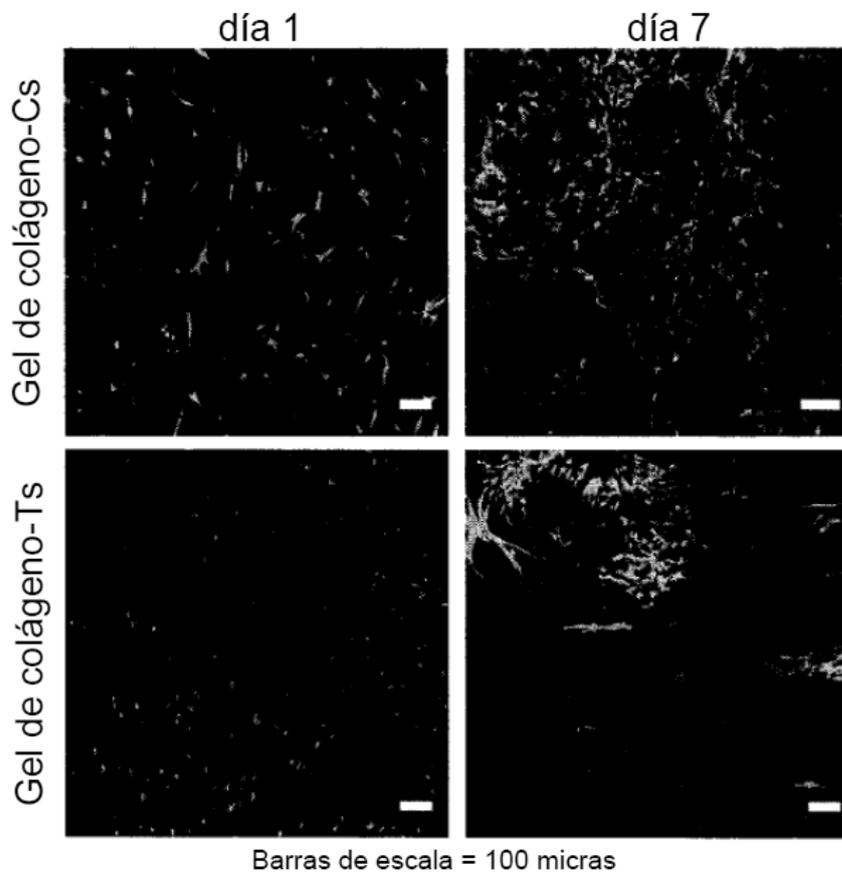


Figura 22

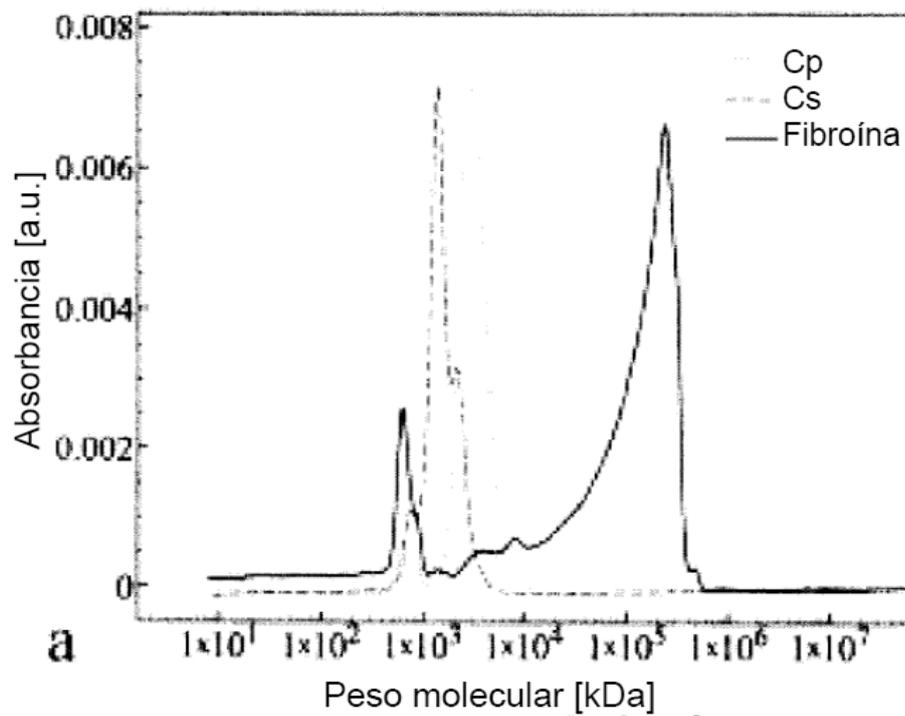


Figura 23a

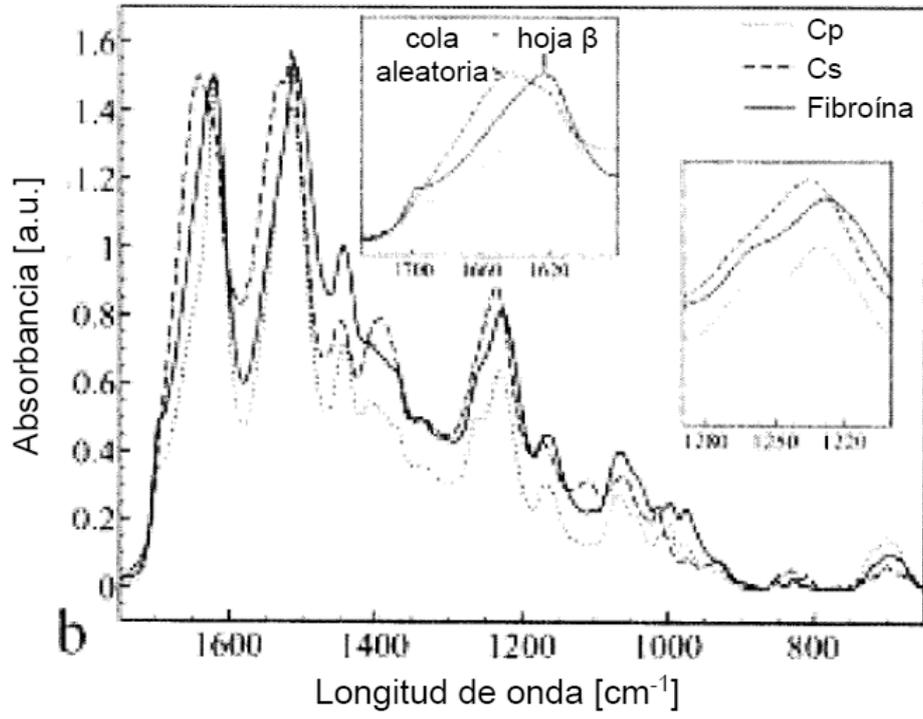


Figura 23b

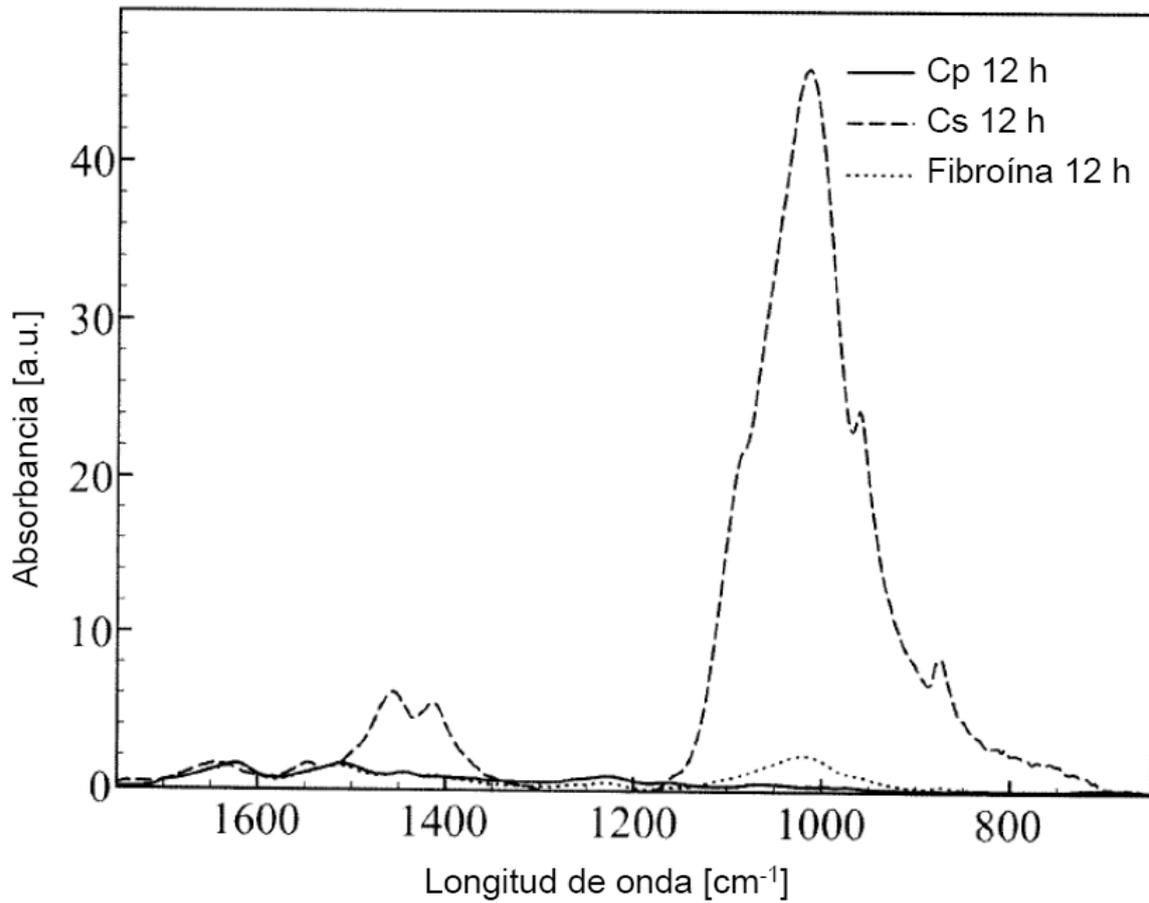


Figura 24