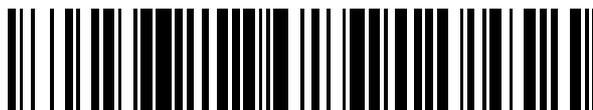


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 061**

51 Int. Cl.:

| | | | |
|-------------------|-----------|-------------------|-----------|
| C12N 5/00 | (2006.01) | C07K 14/75 | (2006.01) |
| A61K 38/17 | (2006.01) | A61L 27/22 | (2006.01) |
| A61K 38/18 | (2006.01) | A61L 27/24 | (2006.01) |
| A61K 38/21 | (2006.01) | A61L 27/52 | (2006.01) |
| A61K 38/39 | (2006.01) | | |
| A61K 38/45 | (2006.01) | | |
| A61L 27/36 | (2006.01) | | |
| A61K 47/48 | (2006.01) | | |
| C07K 14/48 | (2006.01) | | |
| A61L 27/18 | (2006.01) | | |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04806668 .2**
- 96 Fecha de presentación: **15.12.2004**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1722834**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.11.2006**

54 Título: **Matriz que comprende un esqueleto proteico de origen natural reticulado**

30 Prioridad:

22.12.2003 US 530917 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

04.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

04.12.2012

73 Titular/es:

**REGENTIS BIOMATERIALS LTD. (100.0%)
2 Hallan Street North Industry Zone
30600 Or Akiva, IL**

72 Inventor/es:

**SELIKTAR, DROR y
ALMANY, LIORA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 392 061 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

Matriz que comprende un esqueleto proteico de origen natural reticulado

Campo y antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a una matriz compuesta de un esqueleto proteico de origen natural reticulado por polietilenglicol (PEG) y, más particularmente, a procedimientos para generarla y usarla en la regeneración de tejidos.

10 La ingeniería tisular, es decir, la generación *in vitro* de nuevos tejidos vivos, se usa ampliamente para sustituir tejidos enfermos, traumatizados y otros tejidos enfermos. La estrategia clásica de la ingeniería tisular utiliza células vivas y un armazón básico para el cultivo celular (Langer y Vacanti, 1993; Nerem y Seliktar, 2001). Por tanto, la estructura de armazón intenta imitar la estructura natural del tejido que se está sustituyendo y proporcionar un soporte funcional temporal para las células (Griffith LG, 2002).

15 Los armazones para ingeniería tisular se fabrican a partir de materiales biológicos o a partir de polímeros sintéticos. Los polímeros sintéticos tales como polietilenglicol (PEG), hidroxiapatita/policaprolactona (HA/PLC), ácido poliglicólico (PGA), ácido poli-L-láctico (PLLA), polimetil metacrilato (PMMA), polihidroxialcanoato (PHA), poli-4-hidroxibutirato (P4HB), polipropilén fumarato (PPF) polietilenglicol-dimetacrilato (PEG-DMA), fosfato beta-tricálcico (beta-TCP) y politetrafluoroetileno (PTFE) no biodegradable proporcionan un control preciso sobre las propiedades mecánicas del material (Drury y Mooney, 2003).

20 Los procedimientos comunes de fabricación de armazones están basados en espumas de polímeros sintéticos. Sin embargo, la migración celular en el interior de los armazones sintéticos está limitada por la ausencia de oxígeno y de aporte de nutrientes. Para superar tales limitaciones, se han desarrollado nuevas estrategias que utilizan fabricaciones sólidas de forma libre y arquitectura vascular interna (Revisado en Sachlos E y Czernuszka JT, 2003; Eur. Cell Mater. 5: 29-39). De igual modo, también se emplean procedimientos de liofilización para crear estructuras tridimensionales únicas con distinta porosidad y permeabilidad. Sin embargo, la creación de poros en estos materiales es un procedimiento agresivo que implica el uso de reactivos tóxicos que eliminan la posibilidad de moldear previamente construcciones tisulares con células vivas. Por lo tanto, muchos de los materiales prefabricados están sometidos a siembra de células poco uniforme y a poblaciones de células no homogéneas dentro de las construcciones. Además, generalmente los materiales se degradan desigualmente durante el proceso de cultivo tisular, creando un tejido altamente anisotrópico con cinética de crecimiento modificada.

30 La Patente de Estados Unidos N°: 5.863.984 desvela matrices porosas formadas a partir de un biopolímero tal como colágeno, que está conjugado con PEG por medios químicos o por irradiación. La conjugación con PEG reduce la biodegradabilidad de la matriz, conservando de esta manera su estructura porosa.

35 Los armazones constituidos por PEG son altamente biocompatibles (Merrill y Salzman, 1983) y presentan características físicas versátiles en base a su porcentaje en peso, longitud de la cadena molecular y densidad de reticulación (Temenoff JS y col., 2002). Además, los hidrogeles de PEG pueden realizar una transición controlada de líquido a sólido (gelificación) en presencia de suspensión celular (Elbert y Hubbell, 2001). Además, la reacción de gelificación del PEG (es decir, PEGilación) puede realizarse en condiciones no tóxicas en presencia de un fotoiniciador (Elisseff J y col., 2000; Nguyen y West, 2002) o mezclando una solución reactiva de dos partes del PEG funcionalizado y reticulando los constituyentes (Lutolf y Hubbell, 2003).

40 Sin embargo, aunque los polímeros sintéticos mencionados anteriormente permiten un control preciso sobre el material armazón, a menudo ofrecen información biológica inadecuada para el cultivo celular. Como resultado, estos materiales no son adecuados para el cultivo tisular a largo plazo o para la regeneración tisular *in vivo*.

45 Por otro lado, los armazones de origen natural tales como colágeno, fibrina, alginato, ácido hialurónico, gelatina y celulosa bacteriana (CB) proporcionan señales biofuncionales y presentan diversas interacciones celulares. Por ejemplo, la fibrina, un sustrato natural de remodelación tisular (Herrick S., y col., 1999), contiene diversos dominios de señalización celular tales como sustrato de degradación por proteasas (Werb Z, 1999) y dominios de adhesión celular (Herrick S., 1999). Sin embargo, como tales materiales biológicos presentan señales intrínsecas múltiples (por ejemplo, regulación de adhesión celular, proliferación, fenotipo celular, producción de matriz y actividad enzimática), su uso como armazones en la regeneración tisular a menudo produce una regulación anómala de sucesos celulares (Hubbell, 2003). Adicionalmente, los armazones naturales a menudo son mucho más débiles después de la reconstitución en comparación con la resistencia del material biológico original y pueden ejercerse escaso control para mejorar sus propiedades físicas.

55 Por lo tanto, el armazón ideal para la ingeniería tisular debe presentar las características estructurales de los materiales sintéticos con la biofuncionalidad de los materiales naturales (Leach JB, y col., 2004; Leach y Schmidt, 2005). Para este fin, se han propuesto diversos procedimientos de preparación de armazones con biofuncionalidad natural y propiedades físicas de los polímeros sintéticos. Sin embargo, la mayoría de estas estrategias "híbridas", no llegan a producir un biomaterial con amplia biofuncionalidad intrínseca y un amplio intervalo de propiedades físicas; principalmente debido a que solo emplean un único elemento biofuncional en el diseño del material. Por ejemplo, estudios previos describen la preparación de armazones que consisten en elementos biodegradables injertados en

5 el esqueleto de una red de hidrogel sintética. Los hidrogeles se prepararon a partir de PEG sintético que se reticuló con oligopéptidos cortos que contenían sustratos enzimáticos capaces de degradarse proteolíticamente mediante enzimas secretadas por células [Lutolf y col (2003); Gobin y West (2002)]. Adicionalmente, para aumentar la biofuncionalidad de dichos hidrogeles, se injertaron motivos de adhesión sintéticos tales como las secuencias RGD [Lutolf y col (2003)] o VEGF (Seliktar y col; 2004, Zisch AH, y col, 2003; FASEB J. 17: 2260-2. Publicado el 16 de octubre de 2003) en el esqueleto de PEG. Sin embargo, el uso de dichos armazones (en los que el PEG es el componente principal) estaba limitado por la bio-retroalimentación y/o respuestas celulares a largo plazo insuficientes que son esenciales para la estabilidad fenotípica.

10 Otros intentos para aumentar la biofuncionalidad de los armazones incluyen la fabricación de precursores de 100 aminoácidos, de tipo proteico, diseñados por ingeniería genética, que contienen, entre otras cosas, varios sustratos para proteasas y sitios de adhesión (Halstenberg y col. 2002; Biomacromolecules, 3: 710-23). Sin embargo, el tamaño aumentado de los precursores proteicos y la presencia de grupos tiol, necesarios para la reacción de PEGilación, complica la purificación y la solubilización de los precursores durante el proceso de fabricación del armazón. Además, similar a los materiales biosintéticos basados en PEG, los armazones de precursores proteicos
15 diseñados por ingeniería genética no proporcionan la suficiente biofuncionalidad para permitir una estabilidad a largo plazo.

20 Reduciendo la presente invención a la realización práctica, los autores de la presente invención han revelado que los armazones híbridos biosintéticos, compuestos de un esqueleto de fibrinógeno que está reticulado con cadenas laterales de polietilenglicol (PEG) funcional, son armazones excelentes, biodegradables y que tales armazones pueden usarse en aplicaciones de regeneración tisular.

Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona un armazón que comprende una pluralidad de unidades, compuesta cada una por PEG unido a fibrinógeno desnaturalizado.

25 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un hidrogel formado a partir del armazón de la reivindicación 1.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención se proporciona un procedimiento de generación de un armazón que comprende: (a) la unión por covalencia del PEG al fibrinógeno desnaturalizado para obtener de esta manera una molécula precursora de polímero-proteína, y; (b) la reticulación de una pluralidad de moléculas precursoras para generar de esta manera el armazón biodegradable.

30 De acuerdo aún con otro aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para inducir la formación *in vivo* de un tejido, comprendiendo el procedimiento: (a) proporcionar un armazón formado por una pluralidad de unidades compuesta cada una por PEG unido a fibrinógeno desnaturalizado (b) implantar el armazón en un sujeto para inducir así la formación del tejido.

35 De acuerdo con otro aspecto adicional más de la presente invención se proporciona un procedimiento para inducir *in vivo* la formación de un tejido, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto que lo necesite una composición compuesta por PEG unido a fibrinógeno desnaturalizado, pudiendo la composición formar un armazón dentro de un sujeto e induciendo de esta manera la formación del tejido *in vivo*.

40 De acuerdo aún con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un procedimiento para el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno caracterizado por una lesión o pérdida tisular, comprendiendo el procedimiento: (a) proporcionar un armazón formado por una pluralidad de unidades cada una compuesta por PEG unida a fibrinógeno desnaturalizado y (b) implantar el armazón en el sujeto para inducir de esta manera la formación del tejido y tratar el trastorno caracterizado por una lesión o pérdida tisular.

45 De acuerdo con un aspecto adicional más de la presente invención se proporciona un procedimiento para el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno caracterizado por una lesión o pérdida tisular, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una composición compuesta por PEG unido a fibrinógeno desnaturalizado, pudiendo la composición formar un armazón dentro del sujeto e induciendo así una formación de un tejido y tratar el trastorno caracterizado por una lesión o pérdida tisular.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención se proporciona una composición de materia que comprende polietilenglicol (PEG) unido a fibrinógeno desnaturalizado.

50 De acuerdo con características adicionales en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, el armazón comprende adicionalmente una molécula que puede reticularse, uniéndose por covalencia la molécula a las unidades.

De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el armazón es biodegradable.

De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el PEG se selecciona del grupo que consiste en PEG-acrilato (PEG-Ac) y PEG-vinilsulfona (PEG-VS).

5 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el PEG-Ac se selecciona del grupo que consiste en PEG-DA, PEG multi-Acrilato en estrella de 4 brazos y PEG multi-Acrilato en estrella de 8 brazos.

De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el PEG-DA es PEG-DA de 4-kDa, PEG-DA de 6-kDa, PEG-DA de 10-kDa y/o PEG-DA de 20-kDa.

De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el polímero sintético es PEG mientras que la proteína de origen natural es fibrinógeno desnaturalizado.

10 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el PEG se selecciona del grupo que consiste en PEG-DA, PEG multi-Acrilato en estrella de 4 brazos y PEG multi-Acrilato en estrella de 8 brazos.

De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el PEG-DA es PEG-DA de 4-kDa, PEG-DA de 6-kDa, PEG-DA de 10-kDa y/o PEG-DA de 20-kDa.

15 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el fibrinógeno está desnaturalizado.

De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas la proporción molar entre el PEG-DA respecto al fibrinógeno en las unidades es de 2-400 a 1, respectivamente.

20 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas la molécula capaz de reticularse se selecciona del grupo que consiste en PEG-DA, PEG multi-Acrilato y PEG-VS.

De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el fibrinógeno es fibrinógeno completo o fibrinógeno fragmentado.

25 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas la proteína de origen natural es fibrinógeno completo y se considera una concentración de las unidades en el hidrogel seleccionada de un intervalo de 0,5-35%.

De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el fibrinógeno es fibrinógeno fragmentado y se considera una concentración de las unidades en el hidrogel seleccionada de un intervalo de 0,5-35%.

30 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el módulo de elasticidad del hidrogel está en un intervalo de 0,02-0,11 kPa para un 10-20% de polímero.

De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el módulo de elasticidad del hidrogel está en un intervalo de 0,01-0,07 kPa para un 10-20% de polímero.

De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas la reticulación se efectúa usando PEG, PEG-DA, PEG multi-Acrilato y/o PEG-VS.

35 De acuerdo con características adicionales en las realizaciones preferidas descritas la reticulación se efectúa *in vitro*, *ex vivo* y/o *in vivo*.

La presente invención aborda con éxito las limitaciones de las configuraciones hasta ahora conocidas proporcionando un armazón biodegradable, adecuado para aplicaciones de regeneración tisular.

40 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado al comúnmente entendido por un experto habitual en la técnica a la cual pertenece la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

45 En el presente documento la invención se describe, solo como ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos con detalle, se hace hincapié en que las particularidades mostradas son a modo de ejemplo y solo con objeto de ilustrar el análisis de las realizaciones preferidas de la presente invención y se presentan con intención de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácil de entender de los principios y aspectos conceptuales de la presente invención. En este sentido, para un entendimiento fundamental de la invención, no se realizan intentos para mostrar detalles estructurales de la invención con más detalles de los necesarios, la descripción junto con los dibujos pone de manifiesto a los expertos en la técnica como pueden
50 llevarse a cabo las diversas formas de realización de la invención.

En los dibujos:

Las Figuras 1a-b son ilustraciones esquemáticas del ensamblaje del hidrogel de PEG unido a fibrinógeno. La Figura 1a ilustra fragmentos de fibrinógeno PEGilado que contienen un sitio de escisión de proteasa natural (amarillo) y grupos tiol no apareados múltiples (rojo) para la conjugación covalente de PEG funcionalizado mediante la reacción de adición de tipo Michael. En la Figura 1b el ensamblaje del hidrogel de PEG unido a fibrinógeno se consigue por reticulación covalente de PEG-acrilatos que no han reaccionado entre sí, dando como resultado una red de hidrogel de fibrinógeno PEGilado. La reacción de reticulación puede conseguirse por polimerización por radicales libres en presencia de cantidades muy pequeñas de fotoiniciador y luz de baja potencia.

Las Figuras 2a-b son tinciones con azul Coomassie® de geles SDS-PAGE que ilustran fragmentos de fibrinógeno PEGilado y no PEGilado antes y después de la PEGilación con PEG funcionalizado. Figura 2a - electroforesis de fibrinógeno completo PEGilado en SDS-PAGE al 10%. El fibrinógeno se incubó con PEG diacrilato fraccionalizado lineal de 4-kDa (PEG-DA; carriles 1-3) o con PEG-OH (4 kDa, carril 4). Se observa la presencia de cadenas α (63,5-kDa), cadenas β (56-kDa) y cadenas γ (47-kDa) de fibrinógeno en presencia de PEG-OH después de 12 horas de incubación (carril 4) y el retraso progresivo del fragmento de proteína en el gel de acrilamida después de la incubación con PEG lineal funcionalizado de 4-kDa durante una hora (carril 3), 2 horas (carril 2) o una noche (carril 1). Carril 5 - marcador de peso molecular (patrones de peso molecular BIO-RAD SDS-PAGE, Intervalo de anchura: 200.000-6.000 Da); Figura 2b - Electroforesis en SDS-PAGE al 20% de fragmentos de fibrinógeno PEGilado escindidos con bromuro de cianógeno (CNBr). El fibrinógeno se trató con CNBr durante 12 horas como se describe en Materiales y Procedimientos Experimentales del Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos, más adelante, y los fragmentos de fibrinógeno escindidos se incubaron durante 1 hora en presencia (carriles 1 y 2) o en ausencia (carril 3) de PEG-DA lineal fraccionalizado. Se observan las especies de fibrinógeno muy PEGilado (es decir, los fragmentos de alto peso molecular) presentes después de 1 hora de incubación con PEG-DA lineal de 6-kDa (carril 1) y 4-kDa (carril 2). El carril 4 es el marcador de peso molecular.

Las Figuras 3a-b son gráficos que ilustran características de tensión – deformación de hidrogeles basados en PEG. La pendiente de la curva de tensión – deformación representa el módulo del material. La dependencia del módulo [expresadas en unidades de kilo Pascal (kPa)] sobre la longitud del PEG usado se midió usando un sistema de ensayo de material de columna sencillo Instron™ 5544 con el programa informático Merlin (www.instron.com). Figura 3a - comportamiento de hidrogeles PEG-PEG con 20% de polímero (p/v); Figura 3b - comportamiento de hidrogeles PEG-fibrinógeno. Obsérvese que las propiedades del material (módulo) dependen del peso molecular del PEG (Figura 3a). Obsérvese también que mientras que en los hidrogeles de PEG-PEG el módulo del hidrogel es directamente proporcional al peso molecular del PEG (Figura 3a), en los hidrogeles de PEG-fibrinógeno se observaron valores de módulo similares usando el PEG de 4-kDa y el PEG de 6-kDa. Además de esta excepción, el comportamiento de tensión – deformación de los hidrogeles de PEG-fibrinógeno fue idéntico al de los controles solo con PEG.

Las Figuras 4a-c son gráficos que ilustran la capacidad para manipular las propiedades mecánicas de los hidrogeles de PEG-fibrinógeno modificando el porcentaje del polímero usado (Figura 4a), el peso molecular del PEG utilizado (Figura 4b) y la composición polímero/proteína (Figura 4c). La introducción de variaciones en estos parámetros permite la generación de hidrogeles con una amplia gama de posibilidades, incluyendo módulos elásticos diferentes (medido en kPa). La Figura 4a muestra el efecto del aumento del porcentaje de la composición polimérica del fibrinógeno PEGilado de 4-kDa en el módulo elástico de hidrogel; obsérvese que el módulo elástico de los hidrogeles de PEG-fibrinógeno (proteína dividida y completa) aumenta proporcionalmente con el aumento del porcentaje de la composición polimérica (lo que también es cierto para hidrogeles de fibrinógeno PEGilados de 6-kDa y 20-kDa). La Figura 4b demuestra el efecto de aumentar el peso molecular de PEG (usando 20% de polímero) en el módulo elástico de hidrogel; obsérvese que el peso molecular del constituyente de PEG tiene un efecto proporcional directo sobre el módulo elástico de los hidrogeles (lo que también es cierto para hidrogeles con un 10% y un 15% de PEG-fibrinógeno). La Figura 4c muestra el efecto de aumentar la proporción de fibrinógeno PEGilado respecto a PEG-DA adicional en la composición de los hidrogeles (usando 15% de polímero y fibrinógeno completo PEGilado). Obsérvese que la cantidad relativa de fibrinógeno PEGilado y PEG-DA libre, no unido, en la solución precursora repercute directamente en la rigidez del hidrogel después de la polimerización por radicales libres; el gráfico muestra el aumento en la rigidez del hidrogel de PEG-fibrinógeno en función de la adición de PEG-DA libre. Obsérvese que los hidrogeles fabricados solo con PEG-DA (sin fibrinógeno) son siempre más rígidos en comparación con los hidrogeles de fibrinógeno PEGilado. Todas las barras de error muestran desviaciones típicas de la media.

Las Figuras 5a-b son gráficos que ilustran la degradación de hidrogeles de PEG-fibrinógeno mediada por proteasas. La liberación de fragmentos de fibrinógeno colorimétricos de los hidrogeles se usó para evaluar la degradación mediada por proteasas después de 30 minutos de incubación con las proteasas colagenasa o tripsina. La Figura 5a ilustra la degradación mediada por proteasas en presencia de una solución con colagenasa 0,5 mg/ml o tripsina 0,05 mg/ml después de 30 minutos de incubación a 37 °C y agitación suave. Obsérvese que la cantidad de degradación que se produce por la proteólisis mediada por tripsina se ve significativamente afectada por el peso molecular del constituyente de PEG injertado [es decir, más degradación en el caso del PEG de alto peso molecular (20 kDa)], mientras que la cantidad de degradación que se produce por la proteólisis mediada por Colagenasa se ve significativamente afectada por el constituyente de fibrinógeno (es decir, más degradación en el caso de fibrinógeno escindido).

La Figura 5b ilustra la degradación mediada por proteasas en función de la concentración de la proteasa. Los

hidrogeles de PEG-fibrinógeno constituidos por PEG al 15% (peso molecular de 6 kDa) y fibrinógeno completo se sometieron a degradación por Tripsina y Colagenasa como se describe anteriormente en el presente documento. Obsérvese la respuesta dependiente de la dosis de los productos de degradación en función de la concentración de la proteasa. Todos los datos de degradación se normalizan con los valores colorimétricos de los hidrogeles completamente degradados en su solución de proteasa respectiva.

Las Figuras 6a-e son imágenes microscópicas de contraste de fase de cultivos celulares vasculares en Hidrogeles basados en PEG. La Figura 6a ilustra una monocapa de células endoteliales aórticas de bovino después de crecer durante 24 horas en una superficie de hidrogel de PEG-fibrinógeno (PEG de 4-kDa, 10% de polímero); las Figuras 6b-c representan células de músculo liso aórtico bovino después de crecer tridimensionalmente durante 24 horas dentro de un hidrogel de PEG-fibrinógeno (PEG de 4-kDa, 10% de polímero). Obsérvese la adhesión y propagación tridimensional de las células en los dos portaobjetos en z distintos del gel (Figura 6 b y c); la Figura 6d ilustra la monocapa de células endoteliales aórticas de bovino como en la Figura 6a después de crecer durante 24 horas sobre un hidrogel de control de PEG-PEG (PEG de 4-kDa, 10% de polímero); la Figura 6e ilustra las células de músculo liso aórtico como en las Figuras 6b-c después de crecer dentro de un hidrogel de PEG-PEG (PEG de 4-kDa, 10% de polímero). Obsérvese la adhesión y propagación de las células endoteliales (Figura 6a), así como de las células de músculo liso (Figuras 6b-c) cuando crecen en los hidrogeles de PEG-fibrinógeno pero no en los hidrogeles de control PEG-PEG (Figura 6d-e). En ausencia de un sustrato proteolítico en los hidrogeles de control de PEG-PEG, obsérvese que las células de músculo liso encapsuladas no tienen extensiones celulares (Figura 6e). Todas las imágenes se adquirieron digitalmente a un aumento de 200 X usando un microscopio de contraste de fase.

Las Figuras 7a-b son secciones histológicas transversales de células similares sembradas hidrogeles basados en PEG representados en la figura 6. Se cultivaron células de músculo liso aórtico bovino durante 48 horas en un hidrogel de PEG-fibrinógeno (PEG de 4 kDa, 10% de polímero, Figura 7a) o un hidrogel de control de PEG-PEG (4 kDa, 10%); los especímenes de hidrogel se cortaron en secciones de 7 μ m de grosor y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) que tiñe el núcleo celular de color tinción púrpura oscuro. Obsérvese la propagación de células dentro de la red gelatinosa en el hidrogel de PEG-fibrinógeno (Figura 7a) comparada con las células encapsuladas mostradas dentro del hidrogel de control de PEG-PEG, que son proteolíticamente no degradables.

Las Figuras 8a-d son fotografías que ilustran la formación del modelo de defecto de tamaño crítico en tibia de rata. La Figura 8a ilustra la inserción de una fijación externa en la tibia de la rata; la Figura 8b ilustra la exposición de la tibia; la Figura 8c ilustra la escisión de una sección de la tibia de 7 mm de anchura; la Figura 8d ilustra la inserción en el sitio del defecto de un cilindro Gelrin™ sólido prefabricado de un diámetro de 3 mm (que está fabricado con el hidrogel de PEG-fibrinógeno de la presente invención).

Las Figuras 9a-b son imágenes por rayos x que representan la formación de nuevo tejido óseo dentro del defecto de tamaño crítico en tibia de rata 5 semanas después de la operación e implantación de Gelrin™. En el animal tratado con Gelrin™ se observa claramente la formación de una callosidad perióstica (Figura 9b, flecha) en comparación con el control, animal no tratado (Figura 9a, flecha señala la pérdida de hueso). Aunque la imagen del animal de control, mostrada por rayos X, se tomó 3 semanas después de la operación, 5 semanas después de la operación se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados).

La Figura 10 es una microfotografía una sección histológica de tibia de rata teñida con hematoxilina-eosina (H&E) que muestra nueva formación de hueso en la región intersticial de la tibia de rata con implante Gelrin™ 5 semanas después de la inducción de un defecto de tamaño crítico. Obsérvese el hueso de tipo compacto aparentemente casi normal, compatible con el córtex usual del hueso de rata, el sistema Haversiano con un pequeño canal central que contiene vasos sanguíneos (flecha pequeña) y las laminillas concéntricamente organizadas. Obsérvese también los osteocitos (OST) normales, una célula en una laguna, de tal manera que no hay muestras de un suceso de remodelación reciente. Incluso a través de una microfotografía polarizada no disponible, el hueso parece tener un modelo laminar en todas las partes.

La Figura 11 es una microfotografía de una sección histológica de tibia de rata teñida con hematoxilina-eosina (H&E) que muestra una cicatrización osteonal con una isla cartilaginosa en la región intersticial de la tibia de rata con implante Gelrin™ 5 semanas después de la inducción de un defecto de tamaño crítico. Obsérvese que aunque el propio cartílago es avascular, se observa un crecimiento interno vascular en los bordes superior e inferior del cartílago (flechas cortas), indicativo de osificación endocondral. Adicionalmente, en el borde superior, el tejido fibrovascular que invade el cartílago está acompañado por osteoblastos (OST) cuboidales, lo que indica que se está produciendo la deposición de hueso primario. Obsérvese también el reborde osteoblástico del hueso (prueba de osteogénesis en curso) que se observa en la parte inferior, parcialmente por osteoblastos (OST) cuboidales y parcialmente por células de la pared del hueso (BLC, Bone Lining Cells). Las características en esta imagen son típicas de una restauración ósea normal; similar a lo que se encuentra en el intersticio de un hueso fracturado que se ha fijado sin contacto estrecho.

La Figura 12 es una microfotografía de una sección histológica de tibia de rata teñida con hematoxilina-eosina (H&E) que muestra un resto de Gelrin™ en la región intersticial de la tibia de rata con implante Gelrin™ 5 semanas después de la inducción de un defecto de tamaño crítico. Esta imagen muestra con más detalle el Gelrin™ degradado (estrella) fibróticamente encapsulado y regiones de unidades básicas multicelulares (UBM) circundantes. Obsérvese las numerosos trabéculas óseas recién formadas (flechas alargadas) y las trabéculas óseas separadas por grandes rastros de tejido fibroso celular (flechas de doble punta). Cabe mencionar que, durante la cicatrización intersticial de una fractura ósea, se encuentran similares características sin contacto de

las aristas óseas.

La Figura 13 es una microfotografía a alto aumento de una sección histológica de tibia de rata teñida con hematoxilina-eosina (H&E) que muestra un resto de Gelrin™ en la región intersticial de la tibia de rata con implante Gelrin™ 5 semanas después de la inducción de un defecto de tamaño crítico. Esta imagen muestra con mas detalle la densa matriz conectiva y la formación de nuevo hueso cerca del Gelrin™ residual de una rata de tibia 5 semanas después del implante. Las flechas cortas indican las regiones de Gelrin™ residual rodeadas por matriz conectiva densa y la formación de nuevo hueso [asterisco (*)]. La arista de corte del hueso con UBM (o la esquina inferior derecha) indica la actividad de remodelación de hueso maduro en la que las UBM preparan el camino para nueva formación de hueso. La aparición de diversas áreas pequeñas de Gelrin™ residual sugiere que esta sección de tejido representa el centro del intersticio. Obsérvese la presencia de tejido fibroso sin respuesta inflamatoria alrededor de los dos grupos redondeados de Gelrin™ descompuesto (flechas cortas), demostrando las características biocompatibles del hidrogel Gelrin™.

La Figura 14 es una microfotografía que representa la formación de hueso nuevo ósea en la región intersticial de un animal tratado con Gelrin™. Se observa una sección histológica de una tibia de rata 5 semanas después de la creación de un defecto de tamaño crítico en tibia y posterior implantación de Gelrin™. La grieta observada con los espacios vacíos alrededor del septo (flechas largas) es en parte un resultado de seccionar el bloque de parafina que contiene dos tejidos diferentes (es decir, tejido óseo y fibroso) presentando diferentes propiedades biomecánicas (es decir, un artefacto de seccionamiento). Obsérvese la presencia de un septo tisular fibroso dentro de la "grieta". Obsérvese también el sistema Haversiano bien formado (flechas cortas) representando parte del córtex preexistente y un hueso compacto.

La Figura 15 es una microfotografía de una sección histológica de tibia de rata que representa una vista característica de hueso primario 5 semanas después de la implantación de Gelrin™ en el sitio del defecto de un defecto de tamaño crítico en la tibia de la rata. Obsérvese la osificación endocondral que sufre el cartílago (abajo en el lado izquierdo de la imagen) como demuestra el crecimiento interno de tejido fibroso vascularizado en la matriz condroide (indicado mediante asteriscos). La característica notable es la presencia de hileras de osteoblastos (OST) cuboidales a lo largo del hueso recién formado. Hay incluso un grupo de osteoblastos dentro del propio cartílago (flecha alargada). El diagnóstico de hueso primario se basa en la presencia de restos condroides (basófilos) dentro del hueso (flechas cortas). La presencia de canales de tipo Haversiano ampliados con las hileras de osteoblastos cuboidales adyacentes al hueso, indica la presencia de osteogénesis aposicional abundante en esta fase después del tratamiento.

La Figura 16 es una microfotografía de una sección histológica que muestra un hueso primitivo - primario en un defecto de tibia de tamaño crítico de rata tratada con Gelrin™ 5 semanas después del implante. Obsérvese la abundancia de haces residuales de cartílago inicialmente presente (asterisco), que en esta fase se ha sustituido por tejido óseo. Hay una red compleja de canales. Obsérvese que los grandes canales de tipo Haversiano en el centro están al menos parcialmente hipervascularizados y que contienen algunos lipocitos (flecha alargada). La mayoría de las interfaces canal-hueso se cubren por osteoblastos cuboidales (flechas pequeñas) indicativo de osteogénesis viva en curso.

La Figura 17 es una microfotografía de baja potencia que muestra una banda de tejido condroide en transición en la región intersticial de un animal tratado con Gerlin™. Obsérvese la banda de cartílago (extremo superior indicada mediante asterisco) en la que se manifiesta una transición de tejido fibroso en tejido condroide (la transición se produce de arriba a abajo, respectivamente). En ambos lados de esta banda, muchas proyecciones tisulares fibrosas vascularizadas (flechas cortas) invaden el cartílago, es decir, inician la osificación endocondral. Aunque el hueso es de un modelo osteonal con numerosos canales Haversianos normales (flechas largas), está estructurado anómalamente de manera que hay varios rastros grandes de tejido fibroso-graso con hileras de osteoblastos cuboidales adyacentes al hueso (indicado por cabezas de flecha).

Las Figuras 18a-e son imágenes microscópicas de contraste de fase de cultivos de células de músculo liso vascular en hidrogeles Gerlin™. Las células de músculo liso distribuidas y dispersadas de manera homogénea se cultivaron durante 48 horas dentro de hidrogeles Gerlin™ (PEG de 10-kDa) y la capacidad de las células para adherirse y propagarse dentro de los hidrogeles se evaluó cualitativamente por microscopía de contraste de fase. La Figura 18a ilustra la adhesión y propagación tridimensional de células de músculo liso dentro de hidrogeles Gerlin™ puros. La adición de diversas cantidades de PEG-DA libre (Figura 18b-e) a la matriz de Gerlin™ reduce la degradabilidad proteolítica de los hidrogeles y hace más difícil que las células individuales se propaguen dentro de la matriz. Figura 18a - matriz de Gerlin™ pura; Figura 18b - matriz de Gerlin™ con PEG-DA libre al 0,5%; Figura 18c - matriz de Gerlin™ con PEG-DA libre al 1%; Figura 18d - matriz de Gerlin™ con de PEG-DA libre al 1,5%; Figura 18e - matriz de Gerlin™ con PEG-DA libre al 2%. Obsérvese que la adhesión y propagación de las células dentro de la matriz se reduce en presencia de concentraciones en aumento de PEG-DA libre (es decir, la molécula reticulante) con respecto a la matriz de Gerlin™ pura.

Las Figuras 19a-l son microfotografías de grupos de células de músculo liso incluidas dentro de un sustrato de Gerlin™. Las figuras representan el efecto de las concentraciones en aumento de PEG-DA en los hidrogeles de Gerlin™ sobre la migración de las células en el Gerlin™. Los hidrogeles de Gerlin™ que consisten en PEG de 6-kDa se prepararon usando hidrogeles de Gerlin™ puros (PEG-fibrinógeno 1,75%; Figuras 19a-d), hidrogeles de Gerlin™ reticulados con PEG-DA libre al 1% (Figuras 19e-h) o hidrogeles de Gerlin™ reticulados con PEG-DA libre al 2% (Figuras 19i-l) y el grado de migración celular de la masa tisular de células (color oscuro) y dentro del Gerlin™ se detectó usando microscopía por contraste de fase después de una (Figuras 19a, e e i), dos (Figuras

19b, f y j), cuatro (Figuras 19c, g y k) o siete (Figuras 19d, h y l) días en cultivo. Obsérvese la migración celular significativa observada en los hidrogeles de Gerlin™ puros y las extensiones celulares relativamente disminuidas observadas en los hidrogeles de Gerlin™ que estaban reticulados en presencia de PEG-DA libre al 2%.

5 **Descripción de las realizaciones preferidas**

La presente descripción se refiere a una matriz compuesta de un esqueleto proteico de origen natural reticulado por polietilenglicol (PEG) que puede usarse en aplicaciones de regeneración tisular. Específicamente, la presente invención se refiere a un almacén de fibrinógeno desnaturalizado PEGilado que puede usarse para tratar trastornos caracterizados por una lesión o pérdida tisular usando almacenes biodegradables.

10 Los principios y el funcionamiento del procedimiento de generación de un almacén biodegradable de acuerdo con la presente invención pueden comprenderse mejor con referencia a los dibujos y a las descripciones que se adjuntan.

15 Las estrategias de ingeniería tisular utilizan almacenes básicos que imitan la estructura natural de los tejidos que sustituyen y proporcionan un soporte funcional temporal para las células sembradas en su interior (Griffith LG, 2002). Los almacenes pueden fabricarse a partir de materiales biológicos o de polímeros sintéticos. Aunque los polímeros sintéticos [por ejemplo, polietilenglicol (PEG) y polimetil metacrilato (PMMA)], proporcionan un control preciso sobre el material del almacén y sus propiedades mecánicas, tales polímeros no tienen las propiedades biofuncionales que permitan la unión y la propagación de las células (Drury y Mooney, 2003), y por lo tanto no son adecuados para el cultivo tisular prolongado o la regeneración tisular *in vivo*.

20 Por otro lado, los almacenes de origen natural tales como colágeno y fibrina proporcionan señales biofuncionales y presentan diversas interacciones celulares. Sin embargo, dado que tales materiales biológicos presentan señales intrínsecas múltiples (por ejemplo, regulación de adhesión celular, proliferación, fenotipo celular, producción de matriz y actividad enzimática), su uso como almacenes para la regeneración tisular a menudo da como resultado una regulación anómala de acontecimientos celulares (Hubbell, 2003). Además, después de la reconstrucción, la resistencia de dichos almacenes es menor que la que caracteriza al material biológico natural (por ejemplo, colágeno).

25 Para superar tales limitaciones se construyeron almacenes “híbridos” injertando elementos biodegradables en esqueletos sintéticos. Por tanto, el esqueleto de PEG sintético se reticuló con oligopéptidos cortos que contenían sustratos enzimáticos, secuencias RGD y/o VEGF [Lutolf y col (2003); Gobin y West (2002); Seliktar y col; 2004, Zisch AH, y col, 2003; FASEB J. 17: 2260-2. Epub. 16 oct 2003], o con precursores de 100 aminoácidos similares a proteínas modificados por ingeniería genética (Halstenberg y col. 2002; Biomacromolecules, 3: 710-23). Sin embargo, tales almacenes, en los que el PEG era el componente principal, no proporcionaban suficiente bio-retroalimentación y/o respuestas celulares prolongadas que son esenciales para la regeneración tisular y estabilidad fenotípica.

30 Reduciendo la presente invención a la realización práctica, los autores de la presente invención han descubierto que los almacenes híbridos biosintéticos compuestos de un esqueleto de fibrinógeno con cadenas laterales de polietilenglicol (PEG) funcional son excelentes almacenes biodegradables y que tales almacenes pueden usarse para aplicaciones de regeneración tisular.

35 Como se muestra en la sección de Ejemplos, más adelante, los autores de la presente invención generaron moléculas precursoras de PEG-fibrinógeno que se usaron adicionalmente para formar almacenes de hidrogel. Los almacenes de PEG-fibrinógeno de la presente invención presentan propiedades materiales y de biodegradabilidad que son superiores a cualquier almacén conocido de la técnica anterior; también presentan mucha flexibilidad y un módulo elástico que puede controlarse (Figuras 3a-b), biodegradabilidad eficaz (Figuras 5a-b), biofuncionalidad y soporte mejorados para la propagación y extensión celular (Figuras 6a-e, 7a-b, 18a-e y Ejemplos 2 y 4). Adicionalmente, como se muestra en las Figuras 9-17 y en el Ejemplo 3 de la sección de Ejemplos, más adelante, los almacenes de PEG-fibrinógeno de la presente invención fueron capaces de regeneración ósea *in vivo* en ratas expuestas a un defecto de tibia de tamaño crítico.

40 Por tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un almacén que comprende una pluralidad de unidades compuestas cada una de un polímero sintético unido a una proteína de origen natural o a una parte de la misma.

45 Como se usa en el presente documento el término “almacén” se refiere a una estructura de soporte bidimensional o tridimensional. El almacén de la presente invención está compuesto de unidades (denominadas indistintamente en el presente documento “moléculas precursoras”) que están unidas directa o indirectamente (por ejemplo, mediante engarce) entre ellas. Tal molécula precursora puede ser, por ejemplo, fibrinógeno PEGilado (véase el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos, más adelante), colágeno PEGilado, fibrinectina PEGilada y similares. Controlando la reticulación, el almacén de la presente invención puede formar una estructura bi- o tri- dimensional de cualquier tamaño, estructura o porosidad. El almacén de la presente invención puede incluirse dentro, o formarse alrededor, de otro almacén o gel o puede unirse a materiales adicionales para formar un almacén híbrido o revestido.

Preferentemente, el armazón de la presente invención puede usarse para servir de soporte al crecimiento, adhesión y propagación de las células y por tanto facilitar el crecimiento celular, la regeneración tisular y/o la reparación tisular.

5 El término "polímero" se refiere a una pluralidad de unidades de repetición que forman una nueva estructura molecular. La expresión "polímero sintético" se refiere a cualquier polímero que esté fabricado de un material sintético, es decir, un material no natural, no celular. Los ejemplos no limitantes para polímeros sintéticos que pueden usarse junto con la presente invención incluyen polietilenglicol (PEG) (Pm promedio 200; P3015, SIGMA), hidroxapatita/policaprolactona (HA/PLC) [Choi, D., y col., 2004, Materials Research Bulletin, 39: 417-432; Azevedo MC, y col., 2003, J. Mater. Sci. Mater. Med. 14(2): 103-7], ácido poliglicólico (PGA) [Nakamura T, y col., 2004, Brain Res. 1027(1-2): 18-29], ácido poli-L-láctico (PLLA) [Ma Z, y col., 2005, Biomaterials. 26(11): 1253-9], polimetil metacrilato (PMMA) [Pm promedio 93.000, Aldrich Cat. N° 370037; Li C, y col., 2004, J. Mater. Sci. Mater. Med. 15(1): 85-9], polihidroxialcanoato (PHA) [Zinn M, y col., 2001, Adv. Drug Deliv. Rev. 53(1): 5-21; Sudesh K., 2004, Med. J. Malaysia. 59 Sup. B: 55-6], poli-4-hidroxitirato (P4HB) [Dvorin EL y col., 2003, Tissue Eng. 9(3): 487-93], polipropileno fumarato (PPF) [Dean D, y col., 2003, Tissue Eng. 9(3): 495-504; He S, y col., 2000, Biomaterials, 21(23): 2389-94], polietilenglicol-dimetacrilato (PEG-DMA) [Oral E y Peppas NA J, 2004, Biomed. Mater. Res. 68A(3): 439-47], fosfato beta-tricálcico (beta-TCP) [Dong J, y col., 2002, Biomaterials, 23(23): 4493-502], y politetrafluoroetileno (PTFE) no biodegradable [Jernigan TW, y col., 2004, Ann. Surg. 239(5): 733-8; discussion 738-40].

20 De acuerdo con realizaciones actualmente preferidas de la presente invención, el polímero sintético usado en la presente invención es PEG. La molécula de PEG usada en la presente invención puede estar linealizada o ramificada (es decir, PEG, de 2 brazos, 4 brazos y 8 brazos) y puede tener cualquier peso molecular, por ejemplo, 4 kDa, 6 kDa y 20 kDa para PEG linealizado o de 2 brazos, 14 kDa y 20 kDa para PEG de 4 brazos y 14 kDa y 20 kDa para PEG de 8 brazos y combinación de los mismos.

25 Como se muestra en las Figuras 1a-b y en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos, más adelante, el extremo OH de la molécula de PEG puede reaccionar con un grupo químico tal como acrilato (Ac) o vinilsulfona (VS) que convierte a la molécula de PEG en PEG funcionalizado, es decir, PEG-Ac o PEG-VS. Preferentemente, la molécula de PEG usada en la presente invención es PEG-Ac.

30 En la técnica se conocen procedimientos para preparar moléculas de PEG funcionalizadas. Por ejemplo, el PEG-VS puede prepararse con argón haciendo reaccionar una solución del PEG-OH en diclorometano (DCM) con NaH y después con di-vinil-sulfona (proporciones molares: OH 1: NaH 5: divinilsulfona 50, a 0,2 gramos de PEG/ml en DCM). El PEG-Ac se prepara con argón haciendo reaccionar una solución del PEG-OH en DCM con cloruro de acrililo y trietilamina (proporciones molares: OH 1: cloruro de acrililo 1,5: trietilamina 2, a 0,2 gramos de PEG/ml en DCM), esencialmente como se describe en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos, más adelante.

35 Se apreciará que dichos grupos químicos pueden unirse a moléculas de PEG de 2 brazos, 4 brazos u 8 brazos linealizadas.

Preferentemente, el PEG-Ac usado en la presente invención es PEG-DA, PEG multi-Acrilato en estrella de 4 brazos y/o PEG multi-Acrilato en estrella de 8 brazos.

40 Como se muestra en las Figuras 2a-b y en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos, más adelante, para preparar moléculas de PEG funcionalizadas, los autores de la presente invención usaron isoformas de PEG-diacrilato (PEG-DA) de 4-kDa, 6-kDa y 20-kDa.

La expresión "proteína de origen natural o una parte de la misma" como se usa en el presente documento se refiere a fibrinógeno desnaturalizado.

45 Dado que el armazón de la presente invención está compuesto de una proteína de origen natural, tal armazón puede configurarse para ser susceptible a degradación por material biológico, tal como enzimas, es decir, para ser biodegradable.

50 Como se usa en el presente documento, el término "biodegradable" se refiere ser capaz de degradarse (es decir, descomponerse) por proteasas biológicas o biomoléculas. La biodegradabilidad depende de la disponibilidad de sustratos de degradación (es decir materiales biológicos o partes de los mismos), de la presencia de materiales biodegradantes (por ejemplo, microorganismos, enzimas, proteínas) y de la disponibilidad de oxígeno (para organismos, microorganismos aerobios o partes de los mismos), dióxido de carbono (para organismos, microorganismos anaerobios o partes de los mismos) y/u otros nutrientes. Además, la biodegradabilidad de un material, tal como el armazón de la presente invención, también depende de la estructura y/o de las propiedades mecánicas del material, es decir, la porosidad, flexibilidad, viscosidad, densidad de reticulación, hidrofobicidad/hidrofiliidad y elasticidad que puede influir en el paso y en la disponibilidad de gases y nutrientes, así como en la adhesión y propagación de las células. Los ejemplos de materiales biodegradables incluyen, pero sin limitación, armazones de geles de colágeno reconstituido, de colas de fibrina y de ácido hialurónico.

Por tanto, el armazón de la presente invención se fabrica por reticulación de copias múltiples de una molécula precursora que está compuesta de un polímero sintético unido a una proteína de origen natural o a una parte de la misma.

5 Por ejemplo, como se muestra en las Figuras 1a-b, 2a-b y en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos, más adelante, los autores de la presente invención fabricaron una molécula precursora de fibrinógeno PEGilado desnaturalizando moléculas de fibrinógeno y haciéndolas reaccionar con PEG-diacrilatos funcionalizados.

Por tanto, de acuerdo con realizaciones preferidas de la presente invención, la molécula precursora de polímero-proteína se fabricada con PEG y fibrinógeno.

10 La proporción molar entre el polímero sintético (por ejemplo, PEG) y la proteína de origen natural (por ejemplo, fibrinógeno) de la presente invención puede influir en el tamaño del poro, resistencia, flexibilidad y elasticidad del armazón de la presente invención. Por tanto, un exceso del polímero sintético conduciría a unir los grupos funcionales del polímero (por ejemplo, PEG-DA) con todos los sitios de unión posibles en la proteína de origen natural y daría como resultado un tamaño de poro más pequeño, más sitios de reticulación, mayor resistencia, menos flexibilidad y rigidez aumentada. Por otro lado, la unión de solo dos moléculas de polímero sintético a cada
15 molécula de la proteína (es decir, una proporción molar de 2:1) daría como resultado un tamaño de poro más grande, menos sitios de reticulación, menor resistencia, mayor flexibilidad y elasticidad aumentada. Se apreciará que la proporción molar entre el polímero sintético y la proteína también puede influir en la biodegradabilidad del armazón. Por tanto, se espera que una mayor proporción molar (es decir, un exceso de polímero) de cómo resultado una menor biodegradabilidad debido a una posible ocultación de sitios de degradación de la proteína. Los expertos
20 en la materia pueden ajustar la proporción molar entre el polímero sintético y la proteína para obtener el armazón deseado con las características físicas y biológicas óptimas.

Por ejemplo, dado que cada molécula de fibrinógeno incluye 29 sitios posibles que pueden unirse al PEG, la molécula precursora de PEG-fibrinógeno puede prepararse usando un amplio intervalo de proporciones molares. Preferentemente, la proporción molar usada en la presente invención es de 2-400 (PEG) con respecto a 1 (fibrinógeno), más preferentemente, la proporción molar es de 30-300 (PEG) con respecto a 1 (fibrinógeno), más preferentemente, la proporción molar es de 100-200 (PEG) con respecto a 1 (fibrinógeno), más preferentemente, la proporción molar es de 130-180 (PEG) con respecto a 1 (fibrinógeno). Como se muestra en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos, más adelante, una proporción molar preferible entre PEG-DA y fibrinógeno es de 145 (PEG) con respecto a 1 (fibrinógeno).

30 El fibrinógeno usado en la presente invención puede ser fibrinógeno completo (es decir, no escindido) o fibrinógeno fragmentado, que puede obtenerse usando, por ejemplo, escisión por CNBr (véase el Ejemplo 1 de la sección Ejemplos, más adelante).

Como se ha mencionado anteriormente, el armazón de la presente invención se forma por reticulación de las moléculas precursoras de polímero-proteína de la presente invención. Tal reticulación puede realizarse *in vitro*, *ex vivo* y/o *in vivo*.
35

La reticulación de acuerdo con este aspecto de la presente invención se realiza sometiendo las moléculas precursoras a una reacción de polimerización por radicales libres (es decir, una reacción de reticulación). Los procedimientos de reticulación de polímeros se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, reticulación mediante fotoiniciación (en presencia de una luz apropiada, por ejemplo, 365 nm), reticulación química [en presencia de un donante de radicales libres] y/o calentamiento [a las temperaturas apropiadas]. Preferentemente, la reticulación de acuerdo con la presente invención se efectúa por fotoiniciación.
40

La fotoiniciación puede tener lugar usando un agente de fotoiniciación (es decir, un fotoiniciador) tal como óxido de bis(2,4,6-trimetilbenzoi) fenilfosfina (BAPO) (Fisher JP y col., 2001; J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 12: 673-87), 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPA) (Witte RP y col., 2004; J. Biomed. Mater. Res. 71A(3): 508-18), camforquinona (CQ), 1-fenil-1,2-propanodiona (PPD) (Park YJ y col., 1999, Dent. Mater. 15(2): 120-7; Gamez E, y col., 2003, Cell Transplant. 12(5): 481-90), el complejo organometálico Cp'Pt(CH₃)(3) (Cp' = eta(5)-C(5)H(4)CH(3)) (Jakubek V y Lees AJ, 2004; Inorg. Chem. 43(22): 6869-71), 2-hidroxi-1-[4-(hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona (Irgacure 2959) (Williams CG, y col., 2005; Biomaterials. 26(11): 1211-8), dimetilaminoetil metacrilato (DMAEMA) (Priyawan R, y col., 1997; J. Mater. Sci. Mater. Med. 8(7): 461-4), 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (Lee YM y col., 1997; J. Mater. Sci. Mater. Med. 8(9): 537-41), benzofenona (BP) (Wang Y y Yang W. 2004; Langmuir. 20(15): 6225-31), flavina (Sun G, y Anderson VE. 2004; Electrophoresis, 25(7-8): 959-65).
45
50

La reacción de fotoiniciación puede realizarse usando una diversidad de longitudes de onda incluyendo longitudes de onda UV (190-365 nm), y luz visible (400-1100 nm) y a diversas intensidades lumínicas. Se apreciará que para las aplicaciones *ex vivo* o *in vivo*, el fotoiniciador y las longitudes de onda utilizadas son preferentemente no tóxicos y/o no peligrosos para la salud.
55

Por ejemplo, como se observa en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos, más adelante, la molécula precursora de PEG-fibrinógeno se reticuló por fotoiniciación en presencia de Irgacure™ 2959 y una iluminación de luz UV no tóxica (por ejemplo, 5 minutos a una longitud de onda de 365 nm, 4-5 mW/cm² de intensidad).

Se apreciará que, aunque las moléculas precursoras de polímero-proteína de la presente invención (por ejemplo fibrinógeno PEGilado) pueden reticularse sin la adición de una molécula reticulante, la reticulación de acuerdo con la presente invención también puede utilizar una molécula que pueda reticular los precursores del polímero-proteína. Dichas moléculas reticulantes pueden ser, por ejemplo, PEG, PEG-DA, PEG multi-Acrilato y/o PEG-VS.

- 5 Por ejemplo, como se muestra en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos más adelante, para potenciar la reacción de reticulación, se usó una molécula de PEG funcionalizado (por ejemplo, PEG-DA).

La concentración de las moléculas reticulantes (por ejemplo, PEG-DA) puede influir en la resistencia, flexibilidad, elasticidad y biodegradabilidad del armazón y la determinación de tal concentración depende de la aplicación del armazón y forma parte de las habilidades de los expertos en la materia. Por ejemplo, se espera que, un exceso de una molécula reticulante de cómo resultado poros más pequeños, más sitios de reticulación y mayor resistencia y menor flexibilidad del armazón. Por otro lado, como se observa en las Figuras 18a-e, 19a-l y en el Ejemplo 4 de la sección de Ejemplos, más adelante, un exceso de PEG-DA (es decir, la molécula reticulante de la presente invención) da como resultado una biodegradabilidad del armazón reducida, como se indica mediante la adhesión y/o propagación celular reducidas. Se apreciará que una biodegradabilidad reducida es probablemente un resultado de ocultar o modificar los sitios de unión de la proteína o las señales que son necesarias para la degradación de la proteína.

De acuerdo con realizaciones preferidas de la presente invención, la reticulación se efectúa de tal manera que las moléculas precursoras de polímero-proteína de la presente invención se disuelven en una solución basada en agua y tales soluciones adicionalmente se someten a reticulación (por ejemplo, usando fotoionización) para formar un armazón de hidrogel.

Como se observa en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos, más adelante, se formó un hidrogel de PEG-fibrinógeno mezclando las moléculas precursoras de fibrinógeno PEGilado con el agente de fotoiniciación (Igracure™2959) en presencia o ausencia de PEG-DA y exponiendo dicha mezcla a luz UV. Brevemente, los precursores de fibrinógeno PEGilado se disolvieron en 1 ml de PBS 50 mM, pH 7,4 y 25 °C para conseguir una concentración final de polímero-proteína de 10, 15 o 20% (p/v). La solución precursora también contenía un constituyente reticulante de PEG-DA a una proporción molar de 1:2 PEG-DA con respecto a grupos funcionales en el fibrinógeno PEGilado. La solución precursora se mezcló con 10 µl de solución del fotoiniciador Igracure™2959 (Ciba Specialty Chemicals, Tarrytown, Nueva York) en etanol al 70% (100 mg/ml) y se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 RPM. Después, la solución se colocó en tubos de Teflón (de 5 min de diámetro y 20 mm de longitud) y se polimerizó con luz UV (365 nm, 4-5 mW/cm²) durante 15 minutos de acuerdo con protocolos publicados (Lum LY y col., 2003).

De acuerdo con realizaciones preferidas de la presente invención el hidrogel puede generarse a partir de fibrinógeno completo PEGilado o fibrinógeno fragmentado PEGilado. Generalmente, el peso molecular y la longitud del PEG injertado influyen en el grado de solubilidad de la proteína PEGilada, es decir, una mayor longitud y/o peso molecular del PEG da como resultado un aumento en la solubilidad de la proteína PEGilada. Se apreciará que la solubilidad de la proteína PEGilada también está influida por la presencia de fibrinógeno completo o escindido. Preferentemente, la concentración de las moléculas precursoras en el hidrogel es entre el 0,5 al 35%, más preferentemente, cuando se usa fibrinógeno completo PEGilado, la concentración de las moléculas precursoras en el hidrogel es entre el 0,5 al 5% (dependiendo del PM y de la longitud del PEG injertado usado para PEGilar la proteína) y cuando se usa fibrinógeno fragmentado PEGilado, la concentración de las moléculas precursoras en el hidrogel es entre el 5 - 35% (dependiendo del PM y de la longitud del PEG usado para PEGilar la proteína).

Los hidrogeles de PEG-fibrinógeno de la presente invención mostraron una flexibilidad superior sobre los hidrogeles de PEG-PEG de la técnica anterior. Por ejemplo, mientras que en el hidrogel de PEG-PEG (usando PEG de 4 kDa) se consiguió una deformación del 30% empleando una tensión de 90 kPa, en el de hidrogel de PEG-fibrinógeno (usando PEG de 4 kDa) se consiguió una deformación similar empleando solo 4 kPa (Figuras 3a-b y Figuras 4a-c).

Preferentemente, el módulo de elasticidad de los hidrogeles fabricados a partir de fibrinógeno completo PEGilado está en un intervalo de 0,02-011 kPa para 10-20% de polímero y el módulo de elasticidad de los hidrogeles fabricados a partir de fibrinógeno fragmentado PEGilado está un intervalo de 0,01-0,07 kPa para 10-20% de polímero.

Además, los armazones de hidrogel de la presente invención presentan alta biodegradabilidad en comparación con los armazones de hidrogel de la técnica anterior [por ejemplo, hidrogeles fabricados con un reticulante oligopeptídico que contiene un sustrato para proteasas (Seliktar y col 2004)]. Por ejemplo, como se muestra en las Figuras 5a-b y en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos, más adelante, se observó una degradación significativa del 45 - 70% o 35 - 85% de los hidrogeles de PEG-fibrinógeno después de 30 minutos de incubación en presencia de tripsina 0,05 mg/ml o colagenasa 0,5 mg/ml, respectivamente. Además, como también se observa en la Figura 5b, mayores concentraciones de tripsina (es decir, 1-2 mg/ml) dieron como resultado una degradación completa del hidrogel después de 30 minutos de incubación.

Por tanto, la biodegradabilidad del armazón de hidrogel de la presente invención puede determinarse sometiendo tales hidrogeles a degradación enzimática usando proteasas tales como plasmina, tripsina, colagenasa, quimiotripsina y similares.

5 Se apreciará que la biodegradabilidad y la biofuncionalidad del armazón del hidrogel de la presente invención también puede aumentarse uniéndose o impregnando una proteína, tal como una proteína de señalización celular, o una (como se describe en el presente documento anteriormente) al hidrogel de la presente invención. La unión de tales proteínas al armazón de hidrogel de la presente invención se realiza preferentemente por inmovilización covalente de una proteína PEGilada a la red del hidrogel de PEG durante la reticulación (Seliktar y col 2004, JBMR).
 10 La inmovilización de tal factor se consigue haciendo reaccionar directamente el PEG funcionalizado con un tiol, que no ha reaccionado, que está presente en un resto de cisteína de la secuencia de la proteína. La impregnación del hidrogel con factores de crecimiento puede realizarse deshidratando el armazón y después sumergiendo los hidrogeles en una solución que contenga los factores de crecimiento y agitando suavemente dichos hidrogeles durante algunas horas hasta que los factores de crecimiento penetren en el armazón durante el proceso de hidratación. Del mismo modo, el hidrogel puede impregnarse con un factor de crecimiento por incubación, durante
 15 una noche, en una solución que contenga el factor hasta que el factor de crecimiento se difunda en la red polimérica del armazón por difusión lenta, pasiva. Esto último está influenciado por el grado de reticulación, la porosidad del armazón y las propiedades estructurales descritas en el presente documento anteriormente.

Además de ser asequible de producir, el armazón de la presente invención es muy reproducible, flexible (puede tensarse o estirarse fácilmente), presenta propiedades estructurales que pueden controlarse, es manejable para
 20 controlar la biodegradación; características que lo hacen suficientemente adecuado para la regeneración *in vivo* o *ex vivo* de tejidos tales como hueso, cartílago, músculo cardíaco, tejido dérmico, vasos sanguíneos y otros tejidos (blandos y duros) en el organismo. Por ejemplo, un armazón de hidrogel de este tipo puede colocarse fácilmente en intersticios dentro de un tejido o un órgano, después de lo cual puede rellenar el espacio vacío e iniciar el proceso de regeneración a medida que el armazón se va degradando.

25 De hecho, como se muestra en las Figuras 8-17 y en el Ejemplo 3 de la sección de Ejemplos, más adelante, la implantación del armazón de la presente invención en un defecto de tibia de tamaño crítico en rata dio como resultado la formación de hueso nuevo.

Por tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para inducir *in vivo* la formación de un tejido.

30 La frase "*in vivo*" se refiere en el interior de un organismo vivo, tal como una planta o un animal, preferentemente en mamíferos, preferentemente en sujetos humanos.

El procedimiento se efectúa implantando el armazón de la presente invención en un sujeto para de esta manera inducir la formación del tejido.

35 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano (hombre o mujer) de cualquier edad.

El armazón de la presente invención puede implantarse en el sujeto usando una herramienta quirúrgica tal como un escalpelo, cuchara, espátula u otro dispositivo quirúrgico.

Se apreciará que la formación *in vivo* de un tejido también puede conseguirse administrando al sujeto las moléculas precursoras del armazón y posteriormente reticulando las moléculas precursoras *in vivo*.

40 Por tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para inducir *in vivo* la formación de un tejido. El procedimiento se efectúa administrando a un sujeto que lo necesite una composición compuesta de un polímero sintético unido a una proteína de origen natural o a una parte de la misma, siendo la composición capaz de formar un armazón en el interior del sujeto y de esta manera inducir la formación del tejido *in vivo*.

45 Como se usa en el presente documento "una composición compuesta de un polímero sintético unido a una proteína de origen natural o a una parte de la misma" se refiere a la molécula precursora de polímero-proteína de la presente invención que se ha descrito anteriormente en el presente documento.

De acuerdo con realizaciones preferidas de la presente invención, el procedimiento de acuerdo con este aspecto comprende adicionalmente una etapa de reticulación después de administrar la composición. La reticulación puede
 50 realizarse como se ha descrito anteriormente en el presente documento usando agentes y/o condiciones no tóxicas, no peligrosas para la salud.

De acuerdo con realizaciones preferidas de la presente invención, el procedimiento de acuerdo con este aspecto comprende adicionalmente administrar al sujeto una molécula capaz de reticular la composición.

La frase "molécula capaz de reticular la composición" se refiere al agente reticulante descrito anteriormente en el presente documento (por ejemplo, PEG-DA).

Se apreciará que el armazón de la presente invención también puede usarse para la formación *ex vivo* de un tejido.

5 Por tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para inducir *ex vivo* la formación de un tejido.

10 El término "tejido" se refiere a parte de un organismo que consiste en un agregado de células que tienen una estructura y función similares. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, tejido cerebral, retina, tejido dérmico, tejido hepático, tejido pancreático, hueso, cartílago, tejido conectivo, tejido sanguíneo, tejido muscular, tejido cardíaco, tejido vascular, tejido renal, tejido pulmonar, tejido gonadal, tejido hematopoyético y tejido graso. Preferentemente, el término "tejido" como se usa en el presente documento también incluye la frase "órgano" que se refiere a una unidad estructural y funcional completamente diferenciada en un animal que está especializado para alguna función particular. Los ejemplos no limitantes de órganos incluyen cabeza, cerebro, ojo, pierna, mano, corazón, hígado, riñón, pulmón, páncreas, ovario, testículo y estómago.

15 Como se usa en el presente documento, la frase "*ex vivo*" se refiere a células vivas que derivan de un organismo y crecen (o se cultivan) fuera del organismo vivo, preferentemente, fuera del cuerpo de un vertebrado, de un mamífero o de un ser humano. Por ejemplo, las células que derivan de un ser humano, tales como células musculares humanas o células endoteliales aórticas humanas y que se cultivan fuera del organismo se denominan células que están cultivadas *ex vivo*.

20 Por tanto, el armazón de la presente invención, que se forma *in vivo*, *ex vitro* o *ex vivo*, puede usarse para inducir la formación y/o regeneración tisular y por tanto para tratar a individuos que padecen una lesión o pérdida tisular.

Por tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para el tratamiento de un sujeto que padece un trastorno caracterizado por una lesión o pérdida tisular.

25 Como se usa en el presente documento la expresión "trastorno caracterizado por una lesión o pérdida tisular" se refiere a cualquier trastorno, enfermedad o afección que presente una lesión tisular (por ejemplo, tejido no funcional, tejido canceroso o pre-canceroso, tejido dañado, tejido fracturado, tejido fibrótico o tejido isquémico) o una pérdida tisular (por ejemplo, después de un traumatismo, una enfermedad infecciosa, una enfermedad genética y similar) que requiere regeneración tisular. Los ejemplos de trastornos o afecciones que requieren regeneración tisular incluyen, pero sin limitación, cirrosis hepática tal como en pacientes con hepatitis C (hígado), diabetes de tipo 1 (páncreas), fibrosis quística (pulmón, hígado, páncreas), cáncer de hueso (hueso), reparación de quemaduras y de heridas (piel), degeneración macular relacionada con la edad (retina), infarto de miocardio, reparación de miocardio, lesiones del SNC (mielina), defectos de cartílago articular (condrocitos), degeneración de vejiga, degeneración intestinal y similares.

30

35 El tratamiento "tratamiento" se refiere a inhibir o a detener el desarrollo de una enfermedad, trastorno o afección y/o producir la reducción, remisión o regresión de una enfermedad, trastorno o afección en un individuo que padece, o al que se le ha diagnosticado, la enfermedad, trastorno o afección. Los expertos en la materia podrán usar diversas metodologías y ensayos para dirigir el desarrollo de una enfermedad, trastorno o afección y de manera similar diversas metodologías y ensayos que pueden usarse para dirigir la reducción, remisión o regresión de una enfermedad, trastorno o afección.

40 El procedimiento se efectúa implantando el armazón de la presente invención solo o después de sembrar tal armazón con células, o administrando al sujeto las unidades del armazón (por ejemplo, las moléculas precursoras de polímero-proteína de la presente invención) para inducir de esta manera la formación del tejido y tratar el trastorno caracterizado por una lesión o pérdida tisular.

Ejemplos

45 A continuación se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una manera no limitante.

50 Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y en los procedimientos de laboratorio utilizados en el presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican a fondo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook y col., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., Ed. (1994); Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson y col., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren y col. (Eds.) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); las metodologías se exponen en las patentes de Estados Unidos Nos: 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., Ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), tercera edición; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., Ed. (1994); Stites y

55

col. (Eds.), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (Eds.), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N°: 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., Ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., Eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., Ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak y col., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todas ellas incorporadas por referencia a medida que se exponen completamente en el presente documento. A lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales. Se piensa que los procedimientos incluidos en ellas se conocen bien en la técnica y se proporcionan por comodidad para el lector

15 Ejemplo 1

GENERACIÓN DE HIDROGELES PEG-FIBRINÓGENO

A partir de PEG y fibrinógeno se generaron armazones por ingeniería tisular con propiedades mecánicas controlables y señales biofuncionales adecuadas. Brevemente, fragmentos de fibrinógeno desnaturalizado se PEGilaron con PEG-diacrilatos, se mezclaron con fotoiniciador y se expusieron a luz UV para formar un material de hidrogel en presencia de una suspensión celular. La degradabilidad del armazón de PEG-fibrinógeno también se sometió a ensayo por proteólisis mediada por enzimas, de la siguiente manera.

Materiales y Procedimientos Experimentales

Síntesis de PEG Diacrilato (PEG-DA) - El PEG-diacrilato (PEG-DA) se preparó a partir de PEG lineal, PM = 4-kDa, 6-kDa y 20-kDa (Fluka, Buchs, Suiza), básicamente como se describe en cualquier parte (Lutolf y Hubbell, 2003; Elbert DL., y col., 2001). Brevemente, la acrilación de PEG-OH se realizó con argón haciendo reaccionar una solución del PEG-OH en diclorometano (DCM) (Aldrich, Sleeze, Alemania) con cloruro de acrililo (Merck, Darmstadt, Alemania) y trietilamina (Fluka) a una proporción molar de 1 de OH con respecto a 1,5 de cloruro de acrililo con respecto a 1,5 de trietilamina (0,2 g de PEG/ml en DCM). El producto final se precipitó en presencia de éter dietílico enfriado con hielo y se secó al vacío durante una noche. El grado de conversión del grupo terminal se confirmó mediante RMN ¹H y se encontró que era del 97-99% (datos no mostrados).

Escisión de fibrinógeno con bromuro de cianógeno - Se disolvió fibrinógeno completo [Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania, Cat N° F8630, N° de Acceso GenBank AAC67562.1. (cadena α ; SEC ID N°: 1); N° de Acceso GenBank CAA23444.1 (cadena β ; SEC ID N°: 2) y N° de Acceso GenBank CAA33562.1 (cadena γ ; SEC ID N°: 3)] en una solución de ácido fórmico al 70% que contenía 17 mg/ml de Bromuro de Cianógeno (CNBr) (Aldrich, Cat. N° C9, 149-2) y se incubó durante una noche en la oscuridad a 25 °C. Los fragmentos de fibrinógeno escindido se dializaron durante 2 días a 4 °C en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 50 mM a un pH de 7,4 con un cambio de dos veces al día de tampón para eliminar de la solución todo el CNBr y el ácido fórmico. Los fragmentos dializados se conservaron en PBS a 4 °C hasta que se sometieron a PEGilación. Dado que la inyectación del PEG tiene un efecto detectable sobre la movilidad de la proteína en geles de acrilamida (Kurfurst MM, 1992; Pomroy NC y Deber CM, 1998), la observación de los fragmentos de fibrinógeno PEGilados se realizó cargando las muestras en una SDS-PAGE (Electroforesis en Gel de Poli(acrilamida-Dodecil Sulfato Sódico) seguido por tinción con azul de Coomassie®.

PEGilación del fibrinógeno - Para PEGilar la proteína de fibrinógeno, a una solución de fibrinógeno de 7 mg/ml en PBS 50 mM con urea 8 M se añadió clorhidrato de tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP·HCl) (Sigma) (proporción molar 68:1 de TCEP con respecto a cisteínas de fibrinógeno) y la solución se dejó con agitación durante 15 min a 25 °C hasta estar completamente disuelta. Después de la disolución del fibrinógeno, se le añadió una solución de PEG-DA (250-300 mg/ml) en PBS 50 mM y urea 8 M y se hizo reaccionar durante una noche en la oscuridad a 25 °C. La proporción molar del PEG con respecto al fibrinógeno fue de 145:1 (PEG-DA lineal, PM 4-kDa, 6-kDa y 20-kDa). El producto proteínico PEGilado final se precipitó durante 20 minutos a temperatura ambiente mientras se agitaba en 5X de acetona en exceso (Frutarom, Haifa, Israel). La solución de proteína precipitada se centrifugó durante 20 minutos a 5000 RPM (rotor Sorvall GSA) y el sedimento se volvió a disolver a una concentración de proteína de 20 mg/ml en PBS que contenía urea 8 M. La solución de proteína PEGilada se dializó después durante 2 días a 4 °C frente a PBS que contenía ácido acético congelado (Frutarom) al 0,1% (v/v) cambiando el PBS dos veces al día (Spectrum, límite nominal de PM de 12-14-kDa). El producto dializado se usó inmediatamente o se liofilizó en una solución de D-(+)-glucosa (Riedel-deHaën, Alemania) al 10% para mejorar la solubilidad después de la redisolución. El producto PEGilado liofilizado se conservó en Argón a -80 °C hasta seis meses.

Foto-polimerización de hidrogeles de PEG - A partir de una solución precursora de fibrinógeno PEGilado (completo o escindido) se prepararon hidrogeles de PEG-fibrinógeno. La solución precursora se preparó disolviendo fibrinógeno PEGilado en 1 ml de PBS 50 mM, pH 7,4 y a 25 °C para conseguir una concentración final de 10, 15 o 20% de polímero (p/v). La solución precursora también contenía un constituyente reticulante de PEG-DA a una

proporción molar de 1:2 de PEG-DA con respecto a grupos funcionales sobre el fibrinógeno PEGilado. El PEG-DA adicional se usó para reticular eficazmente los macrómeros de la proteína PEGilada y para minimizar los impedimentos estéricos que dan como resultado una mala gelificación. La solución precursora se mezcló con 10 μ l de la solución fotoiniciadora Igracure™2959 (Ciba Specialty Chemicals, Tarrytown, Nueva York) en etanol al 70% (100 mg/ml) y se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 RPM. Después, la solución se colocó en tubos de Teflón (de 5 mm de diámetro y 20 de longitud) y se polimerizó con luz UV (365 nm, 4-5 mW/cm²) durante 15 minutos de acuerdo con protocolos publicados (Lum LY y col., 2003). Después de la polimerización, los hidrogeles se cortaron en secciones de 5 mm de longitud para someter a ensayo mecánico. Los hidrogeles de control se prepararon disolviendo 10, 15 o 20 % (p/v) de PEG-DA en 1 ml de PBS 50 mM con Igracure™ y después polimerizando con luz UV como se ha descrito anteriormente.

Ensayo de las propiedades mecánicas - Las propiedades mecánicas de compresión de los hidrogeles acelulares de PEG-fibrinógeno se evaluaron usando un sistema de ensayo de material de una sola columna Instron™ 5544 con el programa informático Merlin. Las características de tensión-deformación de tapones de 5 mm de diámetro (5 mm de longitud) se midieron por estiramiento constante (0,025 mm/seg) entre dos fijaciones (libres) rígidas, no porosas. El material se tensó a una tensión de 30% y se registró la fuerza de desplazamiento. El programa informático Merlin convirtió automáticamente los datos originales en una relación de tensión-deformación que describe el material. El módulo elástico se determinó directamente a partir de los datos de tensión-deformación como la pendiente promedio de la parte inferior de la curva de tensión-deformación (< 15% de deformación).

Ensayo de biodegradación - Para evaluar la tasa de degradación enzimática del hidrogel, se unió colorante Coomassie® azul brillante G-250 (Aldrich) a los hidrogeles de PEG-fibrinógeno y la liberación del colorante Coomassie® se midió espectrofotométricamente. Los hidrogeles se tiñeron en Coomassie® al 0,1% (p/v) durante una noche con agitación suave y se destiñeron durante 1 hora en tampón decolorante. Dado que el colorante Coomassie® se une a proteínas con afinidad muy alta, después de la tinción inicial, los hidrogeles se destiñeron para liberar todo el colorante no unido. Después, los geles se transfirieron a placas multipocillo y se incubaron con concentraciones conocidas de colagenasa (Sigma) o de tripsina (BD Biosciences, Sparks, MD) en PBS. La degradación enzimática por colagenasa y tripsina se correlacionó con la liberación de fibrinógeno unido a Coomassie® de la red de hidrogel después de un periodo de incubación de 24 horas. Las muestras de sobrenadante (350 μ l) se transfirieron a una cubeta de cuarzo y se midieron usando el espectrofotómetro UV/Vis (Hitachi Instruments Inc., Estados Unidos). Todos los datos se normalizaron con las mediciones espectrofotométricas de los hidrogeles completamente degradados por sus enzimas respectivas.

Análisis estadístico - El análisis estadístico se realizó usando las funcionalidades de análisis estadístico de Microsoft Excel. Para cada variable se cuantificaron y analizaron los datos de al menos dos experimentos independientes. Las comparaciones entre tratamientos múltiples se realizaron con análisis de varianza (ANOVA) mientras que las comparaciones entre tratamientos se realizaron usando un ensayo de dos colas de la t de Student considerando un valor de P < 0,05 estadísticamente significativo.

Resultados Experimentales

La PEGilación del fibrinógeno puede realizarse usando PEG-DA de 4-kDa, 6-kDa y/o 20-kDa. - Los hidrogeles de PEG-fibrinógeno se prepararon por unión covalente de fragmentos de proteína a PEG-DA y reticulando mediante fotoiniciación con UV. La Figura 1a ilustra la capacidad potencial del constituyente de fibrinógeno para unirse al PEG fraccionalizado. Se usó una reacción de adición de tipo Michael (Lutolf M y col, 2001, Bioconjugate chem. 12(6):1051-6) para formar un enlace éster entre los grupos tiol libres en las cisteínas del fibrinógeno y los grupos terminales del acrilato en el PEG-DA (es decir, reacción de PEGilación) usando diversos fragmentos de peso molecular de 4-kDa, 6-kDa y 20-kDa de PEG-DA.

Para confirmar adicionalmente la presencia de fragmentos de fibrinógeno PEGilado y determinar las condiciones óptimas para la reacción de PEGilación, los productos de reacción se sometieron a SDS-PAGE seguido por tinción con azul de Coomassie®. Como se muestra en la Figura 2a, después de la incubación del fibrinógeno completo con un fragmento de PEG-DA de 4-kDa, se observó un cambio dependiente del tiempo a fragmentos de mayor peso molecular. Por lo tanto, aunque después de una hora de incubación con el PEG-DA de 4-kDa, muchos de los fragmentos se elevaron por encima de 60 kDa, después de dos horas y/o una noche de incubación la mayoría de los fragmentos fueron mayores de 250 kDa. Además, como se muestra en la Figura 2b, cuando el fibrinógeno escindido con CNBr se incubó con cualquiera de los fragmentos de PEG-DA de 4-kDa o 6-kDa, a la hora de incubación, se observó un cambio considerable a fragmentos de mayor peso molecular.

Estos resultados demuestran claramente que la PEGilación del fibrinógeno es más eficaz en fibrinógeno escindido con CNBr que en fibrinógeno completo. Además, estos resultados muestran que la PEGilación del fibrinógeno es una reacción dependiente del tiempo.

El producto de PEG-fibrinógeno presenta un alto porcentaje de fibrinógeno PEGilado - Después de una reacción de PEGilación durante una noche, el producto de fibrinógeno PEGilado se purificó del exceso de PEG-DA sin reaccionar, usando precipitación con acetona, que precipita selectivamente la proteína (es decir, fibrinógeno PEGilado). Cabe mencionar que la adición de acetona, a temperatura ambiente, a la reacción de PEG-DA [usando

una solución de yoduro como se describe en cualquier parte (24)] no produjo la precipitación de PEG-DA libre, sin reaccionar (datos no mostrados). Se apreciará que el exceso de PEG sin reaccionar puede teóricamente enredarse con cadenas del PEG injertado sobre la proteína PEGilada y por tanto quedar parte de la proteína PEGilada durante la precipitación. Para confirmar la pureza del fibrinógeno PEGilado, se comparó el peso en seco del producto PEGilado total con la cantidad de proteína total, medida usando un ensayo BCA de Pierce en una solución de fibrinógeno PEGilado purificado. El peso en seco de la proteína PEGilada debe ser la suma de los pesos del fibrinógeno y del PEG injertado, suponiendo una PEGilación al 100%. Las fracciones de proteína teóricas para el fibrinógeno PEGilado usando PEG de 4-kDa, 6-kDa y 20-kDa (suponiendo una PEGilación al 100% y una pureza al 100%) son del 59%, 49% y 22%, respectivamente. Los resultados indican una fracción de proteína de $45 \pm 5,0\%$ usando el PEG de 4-kDa, $39 \pm 3,4\%$ usando el PEG de 6-kDa y $36 \pm 1,5\%$ usando el PEG de 20-kDa. La diferencia entre las fracciones de proteína teórica y medida puede atribuirse a diversos factores, incluyendo el exceso de PEG sin reaccionar, la PEGilación parcial y/o el error de las mediciones del ensayo BCA. Cabe mencionar que el exceso de PEG sin reaccionar no fue visible en SDS-PAGE teñido con yodo-acetato (datos no mostrados), confirmando así la observación de que el fibrinógeno está muy PEGilado después de una reacción durante una noche con PEG-DA. Por tanto, estos resultados sugieren que la desviación de las fracciones de proteína esperadas es consecuencia de una PEGilación parcial o de errores en la determinación de las concentraciones de proteína usando el ensayo BCA.

La escisión del fibrinógeno con bromuro de cianógeno facilita la preparación de soluciones de fibrinógeno PEGilado - Dado que la combinación de PEG altamente hidrófilo con el fibrinógeno parcialmente hidrófobo puede dar como resultado un núcleo de proteína altamente hidrófobo, la molécula de fibrinógeno se desnaturizó antes de someterse a la reacción de PEGilación. Dicha desnaturalización minimiza la formación del núcleo hidrófobo después de la PEGilación y mejora la significativamente la solubilidad del producto. La desnaturalización de la molécula de fibrinógeno se consiguió usando CNBr, una molécula proteolítica que escinde químicamente péptidos adyacentes a metionina en la secuencia del fibrinógeno. La escisión con CNBr de fibrinógeno bovino (3 partes de fibrinógeno por 2 partes de CNBr) da como resultado 30 fragmentos (F1-F30) que varían en tamaño de 35-kDa a 0,1-kDa cada uno. Ocho de estos fragmentos contienen dos o más grupos tiol no apareados que pueden contribuir a la estructura de la red de hidrogel (véanse las Tablas 1 y 2, a continuación). La Figura 2a demuestra la presencia de pequeños fragmentos de fibrinógeno antes y después de la PEGilación usando SDS-PAGE. Además, los fragmentos de fibrinógeno PEGilado, escindido con CNBr, presentan la misma eficacia de PEGilación y pureza de proteína que la de la proteína completa PEGilada después de precipitación con acetona (datos no mostrados). Por tanto, usando el procedimiento de la presente invención, se prepararon soluciones de fibrinógeno PEGilado con concentraciones de hasta 300 mg/ml en condiciones no desnaturizantes.

Tabla 1

| Fragmentos de fibrinógeno y cisteínas a partir de fibrinógeno completo | | | | |
|---|-------------|-------------|--------------|--------------|
| Fragmentos | Alfa | beta | gamma | Total |
| P.M. | 65 | 53,3 | 47,6 | 165,9 |
| Cisteínas | 8 | 11 | 10 | 29 |

Tabla 2

| Fragmentos de fibrinógeno y cisteínas a partir de fragmentos multi tiol de fibrinógeno escindido | | | | | | | | | |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|--------------|
| Fragmentos | F1 | F2 | F3 | F4 | F7 | F8 | F15 | F16 | Total |
| P.M. | 32,4 | 24,6 | 12,1 | 10 | 7 | 6,3 | 3,8 | 3,8 | 100 |
| Cisteínas | 2 | 4 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 | 4 | 25 |

Los hidrogeles de PEG-fibrinógeno son muy elásticos - Para confirmar la formación de hidrogeles a partir de precursores de la proteína PEGilada, se midieron las propiedades mecánicas de compresión del material usando el sistema de ensayo de material de una sola columna Instron™ 5544. Estas mediciones confirmaron la formación de hidrogeles acelulares de PEG-fibrinógeno (y controles PEG-PEG) con diversas concentraciones de polímero (10%, 15% y 20% p/v) y diferentes pesos moleculares de PEG (4-kDa y 6-kDa, 20-kDa) así como la formación de hidrogeles constituidos por fibrinógeno completo (completo) o fibrinógeno escindido con CNBr (escindido). Otras mediciones de las características de tensión-deformación de los hidrogeles de PEG demuestran que la característica de tensión-deformación, tanto de hidrogeles de PEG-PEG como de PEG-fibrinógeno, es no lineal y altamente dependiente del peso molecular del precursor de PEG (Figuras 3a y b). Además, como se muestra en los gráficos de tensión-deformación (Figuras 3a-b), el módulo de elasticidad observado en los hidrogeles de PEG-fibrinógeno (en el intervalo de 0,12 - 0,14) fue significativamente menor que el de los hidrogeles de PEG-PEG (en el intervalo de 2,5 - 3,21). Además, se observó que el módulo elástico (determinado a partir de la curva de tensión-deformación) era dependiente del porcentaje del polímero, del peso molecular del precursor de PEG y del esqueleto de fibrinógeno

(Figuras 4a-c). En general, se encontró que, el módulo elástico de los hidrogeles de PEG-PEG (a cualquier porcentaje de concentración de polímero determinado) era significativamente mayor que el de los hidrogeles de PEG-fibrinógeno ($n = 5$, $p < 0,05$). Del mismo modo, se encontró que, el módulo elástico de los hidrogeles de PEG-fibrinógeno preparados con fibrinógeno completo, era significativamente diferente al de los hidrogeles preparados con fibrinógeno escindido ($n = 5$, $p < 0,05$).

La biodegradación de los hidrogeles de PEG-fibrinógeno es dependiente del PM del componente de PEG y del esqueleto proteico - La biodegradación de los hidrogeles se cuantificó sometiendo hidrogeles de PEG-fibrinógeno puros marcados colorimétricamente (PEG-DA al 15% p/v, PM 6-kDa) a diversas concentraciones de proteasas (por ejemplo, colagenasa o tripsina) y evaluando la disolución de los geles. Por tanto, a medida que se disuelve el hidrogel, los fragmentos que se liberan en un tampón de revestimiento se cuantifican usando espectrofotómetro. Como se observa en la Figura 5a, la degradación de los hidrogeles de PEG-fibrinógeno se vio afectada tanto por el PM del PEG injertado como por la estructura molecular del esqueleto proteico del hidrogel. Por tanto, cambiando el PM del PEG de 6-kDa a 20-kDa se produce una degradación acelerada en presencia de 0,05 mg/ml de tripsina ($n = 6$, $p < 0,05$) pero no en presencia de 0,5 mg/ml de colagenasa. Del mismo modo, la degradación de los hidrogeles de fibrinógeno escindido en 0,5 mg/ml de colagenasa fue significativamente mayor que la de los hidrogeles de fibrinógeno completo ($n = 6$, $p < 0,05$). Como se muestra en la Figura 5b, el aumento de concentraciones de tripsina o colagenasa produce un mayor porcentaje de degradación de los hidrogeles. Se obtuvieron resultados similares analizando los hidrogeles de fibrinógeno PEGilado degradado en SDS-PAGE (datos no mostrados).

En su conjunto, estos resultados demuestran la generación de hidrogeles de PEG-fibrinógeno únicos que proporcionan ventajas singulares sobre otros materiales armazón: (i) las propiedades mecánicas de los hidrogeles de PEG son altamente maleables; (ii) la funcionalidad biológica se conserva por el esqueleto proteico de la red polimérica y (iii) el módulo elástico del hidrogel de PEG-fibrinógeno es dependiente del peso molecular del constituyente de PEG y proporcional al porcentaje de la composición polimérica.

Análisis y Discusión

El uso de materiales sintéticos basados en proteínas es una nueva estrategia para diseñar la "próxima generación" de armazones de hidrogel para ingeniería tisular (16, 23, 26-30). Estos materiales pueden promover el crecimiento celular y muestran biodegradabilidad proteolítica mediante sus dominios biológicos proporcionando a la vez exigentes propiedades mecánicas en base a su composición sintética. Normalmente, varios de estos materiales de hidrogel híbrido se usan como matrices de crecimiento interno o como sustratos de cultivo celular que se aprovechan de los oligopéptidos biológicamente activos en el esqueleto del material que imita las propiedades del tejido natural (17, 18). Aunque estos materiales cumplen los criterios generales de biofuncionalidad, los oligopéptidos de pequeño tamaño proporcionan solo una mínima parte de las señales bioactivas presentes en la matriz extracelular natural (ECM). Para superar esta limitación, se han creado algunas estrategias que usan tecnologías de ADN recombinante para crear un esqueleto de diseño de tipo proteico con bioactividad intrínseca (16), mientras que otras estrategias añaden factores de crecimiento bioactivos que se inmovilizan de manera covalente (23, 27, 31) o no covalente (32) en el material.

El material de hidrogel de la presente invención contiene un esqueleto proteico natural sobre el que por covalencia se unen PEG disfuncionales y se reticularan entre sí usando fotopolimerización. El esqueleto proteico comprende fragmentos alfa, beta y gamma de fibrinógeno desnaturalizado. Estos fragmentos de fibrinógeno son intrínsecamente bioactivos con secuencias proteolíticamente sensibles, motivos de adhesión celular y otras secuencias de señalización celular (14). Los grupos tiol libres presentes en restos de cisteína no apareados en el fragmento de fibrinógeno desnaturalizado se conjugan por covalencia, mediante una reacción de adición de tipo Michael, con un doble enlace insaturado en el PEG-DA funcionalizado. El material de hidrogel de la presente invención usa fibrinógeno desnaturalizado ya que este consiste en una gran cantidad de grupos tiol libres (es decir, restos de cisteína no apareados) que pueden reaccionar con PEG-DA. Después de la PEGilación, se usan acrilatos que no han reaccionado en los PEG disfuncionales para reticular el esqueleto de fibrinógeno en una red de hidrogel usando fotopolimerización.

La estructura molecular de los hidrogeles está muy influenciada por el grado de reticulación. Además del porcentaje del polímero, el otro factor crucial determinante de la reticulación del hidrogel es la proporción de grupos terminales de acrilato reactivos en el PEG por PM de proteína (acrilatos por kDa de proteína PEGilada). Suponiendo que cada PEG se une a fibrinógeno con un grupo terminal acrilato, el fibrinógeno completamente PEGilado contiene 29 grupos acrilato para cada molécula de proteína, o aproximadamente 0,1 acrilato/kDa para el fibrinógeno PEGilado de 4 kDa, 0,086 acrilato/kDa para el fibrinógeno PEGilado de 6 kDa y 0,039 acrilato/kDa para el fibrinógeno PEGilado de 20 kDa. Una solución de PEG-DA pura contiene 0,5 acrilatos/kDa para el PEG de 4 kDa, 0,33 acrilatos/kDa para el PEG de 6 kDa y 0,1 acrilatos/kDa para el PEG de 20 kDa. Si la proporción de acrilatos con respecto al PM es demasiado baja, la solución polimérica no formará un hidrogel continuo. Por esta razón, los experimentos realizados en este estudio utilizaron altas concentraciones de fibrinógeno PEGilado ($\geq 10\%$).

El fibrinógeno PEGilado requiere un esfuerzo sustancial para disolverse a estas altas concentraciones. Dado que la solubilidad del fibrinógeno PEGilado está muy influida por el injerto de las cadenas de PEG, presumiblemente debido

a la formación de un complejo de proteína hidrófobo en presencia de un injerto de PEG altamente hidrófilo, la proteína de fibrinógeno usada en la presente invención utiliza una escisión no reversible por CNBr. Por tanto, la PEGilación de fibrinógeno escindido, da como resultado un precursor proteico altamente soluble para la formación del hidrogel.

5 Las propiedades mecánicas de los hidrogeles de PEG-fibrinógeno escindido y completo se definieron usando el comportamiento de tensión-deformación con compresión libre uniaxial en condiciones cuasi-estáticas. El material de PEG-fibrinógeno demuestra las características de tensión-deformación no lineales típicas de un material polimérico, similares a los geles de control de PEG-PEG. El compuesto se comporta como un sólido viscoelástico con histéresis mínima bajo carga cíclica repetitiva (datos no mostrados). La rigidez del material, determinada a partir del módulo de elasticidad, es directamente proporcional al porcentaje de polímero de la composición. Se apreciará que la rigidez del material de los hidrogeles poliméricos puede atribuirse directamente al grado de reticulación. En el polímero de PEG-fibrinógeno, la cantidad de grupos funcionales disponible para la reticulación es proporcional a la concentración polimérica. Por tanto, el módulo del material es directamente proporcional a la cantidad de polímero en el hidrogel.

15 La relación entre el módulo elástico del hidrogel y la longitud de la cadena molecular del constituyente de PEG injertado es ambigua. Mientras que los hidrogeles puros presentan una relación proporcional entre el módulo del material y el PM del PEG, la adición de la proteína en la red de hidrogel puede tener un profundo impacto sobre esta relación, dependiendo del tamaño relativo de los dos polímeros. En el caso de hidrogeles de fibrinógeno completo PEGilado, en los que el PEG es significativamente más pequeño que la proteína, el impacto del PM del PEG sobre el módulo es más pronunciado. Por el contrario, la relación entre el PM del PEG y el módulo de los hidrogeles es menos pronunciada cuando los hidrogeles están constituidos por proteína escindida. En cualquier caso, cuando se compara el módulo elástico, es difícil resolver la diferencia entre el PEG de 4 kDa y el PEG de 6 kDa.

20 Los datos de las propiedades mecánicas demuestran una diferencia significativa en la rigidez de los hidrogeles constituidos por fibrinógeno PEGilado puro frente a hidrogeles de PEG puro. Independientemente del PM del PEG, los hidrogeles de fibrinógeno PEGilado son siempre menos rígidos que los hidrogeles de PEG puro. Esto puede atribuirse al hecho de que los hidrogeles de PEG puro (preparados con similar porcentaje en peso del polímero) contienen casi 5 veces más grupos funcionales disponibles para la reticulación que los hidrogeles PEGilados. La discrepancia en los sitios de reticulación surge debido a que el constituyente de fibrinógeno representa más de la mitad del peso del polímero pero no contiene sitios de reticulación intrínsecos y cada PEG injertado sobre el fibrinógeno PEGilado solo tiene un grupo funcional sencillo disponible para la reticulación, a diferencia de los dos grupos funcionales sobre el PEG-DA libre. Pueden producirse otras limitaciones de reticulación debido a impedimentos estéricos producidos por las voluminosas moléculas de fibrinógeno PEGilado.

25 La adición de PEG-DA libre a los hidrogeles de fibrinógeno PEGilado introduce sitios de reticulación en la red del hidrogel y por consiguiente modifica la rigidez del material. Por lo tanto, el equilibrio entre el fibrinógeno PEGilado y el PEG-DA libre adicional puede usarse para modular la rigidez de los hidrogeles sin comprometer los dominios funcionales del constituyen de fibrinógeno. Es importante destacar que la adición de PEG libre al hidrogel de fibrinógeno PEGilado puede tener un impacto significativo sobre la degradabilidad de los hidrogeles en presencia de proteasas secretadas por células (datos no mostrados).

30 Basándose en estos hallazgos, está claro que la longitud molecular de la cadena y el porcentaje de la composición representan dos parámetros independientes para controlar las propiedades mecánicas del material. Un parámetro adicional que puede modificar las propiedades mecánicas del material es el número de sitios de reticulación sobre cada molécula de PEG injertada. Como se ha indicado anteriormente, el PEG lineal injertado solo contiene un grupo funcional para la reticulación del hidrogel; sin embargo, las moléculas de PEG contienen diversos grupos funcionales tales como los PEG en estrella que también pueden injertarse sobre el fibrinógeno para formar hidrogeles. Aunque no se ha usado PEG en estrella como parte de la presente investigación, futuros estudios apuntan a aumentar la rigidez de los hidrogeles de PEG-fibrinógeno usando precursores de PEG en estrella de 4 brazos y de 8 brazos.

35 El esqueleto de fibrinógeno del material de hidrogel proporciona sensibilidad proteolítica mediante sustratos de origen natural por fibrinólisis. La fibrinólisis es un proceso fisiológico mediante el cual la molécula de fibrina natural se desmantela proteolíticamente por serina proteasas. En teoría, el esqueleto de fibrinógeno se escinde en presencia de proteasas activadas, dando como resultado la disolución completa del hidrogel de PEG-fibrinógeno. Los resultados mostrados en este estudio demuestran que los hidrogeles de PEG-fibrinógeno puro son proteolíticamente degradables mientras que los controles de PEG-PEG no son susceptibles a proteólisis (datos no mostrados).

40 Los datos de degradación revelan diversos otros modelos interesantes en lo que respecta a la degradación proteolítica de los hidrogeles de fibrinógeno escindido y completo en presencia de tripsina o colagenasa después de 30 minutos. El fibrinógeno escindido presenta menos sustrato para la degradación aumentando de esta manera la disolución del hidrogel normalizada en Colagenasa ($n = 5$, $p < 0,05$). En tripsina, los hidrogeles de fibrinógeno escindido y completo se degradan casi idénticamente. Probablemente esto se explica por la observación de que 0,05 mg/ml de tripsina se saturan con sustrato mientras que 0,5 mg/ml de colagenasa no se saturan con sustrato. Es evidente que el PM del constituyente de PEG también influye en los resultados de degradación. En tripsina, los hidrogeles de PEG de 20 kDa están significativamente más degradados que los hidrogeles de PEG de 6 kDa

después de 30 minutos, mientras que en colagenasa no hay diferencias significativas en la degradación entre las dos condiciones ($n = 6$, $p < 0,05$). Los hidrogeles de PEG de 20 kDa comprenden menos fibrinógeno lo que da como resultado una disolución más rápida del hidrogel. Esto también puede explicarse por la observación de que 0,05 mg/ml de tripsina se saturan con enzima y no puede degradar tan rápido los hidrogeles de fibrinógeno PEGilado de 20 kDa. Futuros estudios examinarán más aspectos de degradabilidad proteolítica del material de PEG-fibrinógeno, incluyendo la cinética de degradación y la fibrinólisis en presencia de plasmina.

Ejemplo 2

Los hidrogeles de PEG-fibrinógeno dan soporte a la propagación y extensión celular

Para someter a ensayo la capacidad de los hidrogeles de PEG-fibrinógeno para promover la expansión y diferenciación de cultivos celulares, se cultivaron células endoteliales aórticas y células de músculo liso de bovino en diversos hidrogeles basados en PEG, de la siguiente manera.

Materiales y procedimientos experimentales

Estudios de cultivo celular in vitro – Se aislaron células de músculo liso aórtico de bovino (BSMC, *Bovine aortic Smooth Muscle Cells*) de donantes jóvenes y cultivaron de acuerdo con un protocolo modificado de Oakes y col., 1982. Las BSMC se cultivaron hasta el 6º pase en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco, Reino Unido) que contenía suero bovino fetal al 10% (FBS) (Biological Industries, Israel), penicilina-estreptomicina al 1% (Biological Industries) y L-glutamina al 1% (Gibco). Los hidrogeles de PEG que contenían las BSMC se prepararon mezclando una suspensión celular con PBS y solución de precursor de fibrinógeno PEGilado que contenía el fotoiniciador Igracure™ para constituir una solución al 10% (p/v) con $1,5 \times 10^6$ células/ml. Se añadieron alícuotas de 100 μ l de la suspensión en los pocillos en una placa de 96 pocillos de fondo plano y se pusieron bajo luz ultravioleta (4-5 mW/cm²) durante 5 minutos en una campana de flujo laminar. Inmediatamente, a los hidrogeles polimerizados se añadió medio de cultivo DMEM (que contenía FBS al 10%) y se cambió diariamente (100 μ l/pocillo).

Estudios de viabilidad de células después de exposición a luz ultravioleta – Para verificar que la exposición a luz ultravioleta no dañaba a las células en el hidrogel, se aislaron células endoteliales aórticas de bovino (BAEC, *Bovine Aortic Endothelial Cells*) y se cultivaron hasta el 6º pase de acuerdo con protocolos publicados (Remuzzi A., y col., 1984). Las células BAEC se sembraron y cultivaron en la parte superior de hidrogeles de PEG de 1 mm de espesor en placas de 24 pocillos como se describe en cualquier parte (Seliktar D., y col., 2004). La densidad de la siembra de las células BAEC fue de 30.000 células/cm². Las células BAEC y BSMC se observaron diariamente usando un microscopio de contraste de fase Nikon TE2000 y se tomaron fotos digitales con una cámara CCD digital (Jenoptik, Alemania).

Evaluaciones histológicas – Los hidrogeles de PEG-fibrinógeno con células se congelaron en 2-metilbutano enfriado con nitrógeno líquido (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) y se cortaron en secciones de 7 μ m de espesor usando un criostato. Las secciones se fijaron con acetona enfriada con hielo en portaobjetos de vidrio para observar al microscopio y se tiñeron con Hematosilina y Eosina (H&E) para visualizar la morfología celular. La morfología celular se documentó usando un microscopio de luz Nikon (TS-100) conectado a una estación de trabajo de formación de imágenes digitales (Sony Corporation, Japón).

Resultados experimentales

Los hidrogeles de PEG-fibrinógeno dan soporte a la propagación y a la adhesión celular – Para someter a ensayo la capacidad de los hidrogeles de PEG-fibrinógeno de dar soporte tridimensional a la propagación y a la adhesión, se cultivaron células endoteliales (BAEC) o de músculo liso (BSMC) sobre la superficie, o dentro, de los hidrogeles de PEG. Las células BAEC se sembraron sobre la superficie de los hidrogeles a una concentración de 30.000 células/cm² y 24 horas después de la siembra celular se evaluó el grado de adhesión y la propagación celular usando microscopía por contraste de fase. Como se muestra en las Figuras 6a y d, mientras que las células BAEC que crecían sobre hidrogeles de PEG-fibrinógeno presentaban adhesión y propagación celular significativa (Figura 6a), las células BAEC que crecían sobre hidrogeles de PEG-PEG eran redondeadas y no se observaba propagación (Figura 6d). Estos resultados demuestran una mayor capacidad de los hidrogeles de PEG-fibrinógeno para dar soporte a la adhesión o propagación celular sobre los de PEG-PEG. La capacidad de los hidrogeles de PEG-fibrinógeno para dar soporte tridimensional a la propagación y adhesión celular también se sometió a ensayo dispersando células BSMC en la solución precursora ($1,5 \times 10^6$ células/ml, PEG de 4 kDa, 10% de polímero) antes de la fotopolimerización. Después del ensamblaje, la red de hidrogel contenía células BSMC con morfología redonda distribuidas homogéneamente. Sin embargo, después de 24 horas de cultivo, las BSMC cultivadas dentro de los hidrogeles de PEG-fibrinógeno formaron adhesiones, procesos y extensiones celulares estables (Figuras 6b-c). Además, los hidrogeles de fibrinógeno PEGilado constituidos por fibrinógeno escindido también dieron soporte a la adhesión y extensión de las células BSMC dentro de los hidrogeles PEGilados (datos no mostrados). Por otro lado, las células BSMC cultivadas dentro de hidrogeles de PEG-PEG eran redondeadas y no se observaba ninguna extensión celular visible (Figura 6e). En una evaluación histológica adicional de las células BSMC cultivadas dentro de los hidrogeles de PEG se confirmó la observación de que las BSMC se extendían dentro de la red de hidrogel de PEG-fibrinógeno (Figura 7a), pero no dentro de los hidrogeles de control de PEG-PEG (Figura 7b).

Análisis y discusión

El armazón de hidrogel de PEG sin el esqueleto de fibrinógeno carece por completo de dominios biofuncionales para el cultivo celular. El esqueleto de fibrinógeno proporciona al material de hidrogel al menos dos características biofuncionales: sensibilidad proteolítica y adhesividad celular. Con respecto a lo último, los hidrogeles de PEG-fibrinógeno dan soporte a la adhesión y propagación de células endoteliales en presencia de proteínas séricas mientras que los controles de PEG-PEG no pueden dar soporte a la adhesión celular. Por lo tanto, las moléculas de adhesión a la superficie de células endoteliales pueden unirse directamente a dominios de adhesión sobre el esqueleto de fibrinógeno o a otras proteínas séricas que interactúan no específicamente con el fibrinógeno. Una vez unidas, las células pueden tunelizarse proteolíticamente a través de la red de hidrogel con la ayuda de enzimas secretadas por células tales como colagenasa. Esto se ilustra mejor con células del músculo liso que quedan atrapadas tridimensionalmente dentro del material de hidrogel después de la fotopolimerización y que comienzan a formar grupos de células después de 24 horas de cultivo. Las microfotografías de contraste de fase y cortes transversales histológicos confirman que las BSMC forman extensiones similares a flagelos que permiten su migración dentro de la red de hidrogel. En este sentido, no se observan diferencias entre los armazones de hidrogel de fibrinógeno completo y escindido. En cambio, las BSMC permanecieron redondeadas y homogéneamente dispersas y no se observaron extensiones celulares en los controles de PEG-PEG no degradables.

Por tanto, los dominios biológicos en el esqueleto de fibrinógeno proporcionan motivos de unión para la adhesión de células endoteliales y células de músculo liso así como sensibilidad proteolítica para la biodegradación. Las células de músculo liso demuestran la capacidad de penetrar proteolíticamente a través del material del hidrogel y formar redes de células interconectadas. Por tanto, los armazones de la presente invención son novedosos, biodegradables y altamente adecuados para el cultivo de células en un entorno 3-D para terapias de regeneración tisular.

Ejemplo 3

Regeneración in vivo de hueso usando el armazón Gelrin™ de PEG-FIBRINÓGENO

Para someter a ensayo el potencial del material del armazón de PEG-fibrinógeno para facilitar la regeneración tisular, se introdujo un defecto de tibia de tamaño crítico en ratas y se implantó el armazón Gelrin™ en el sitio de cirugía (diáfisis tibial).

Materiales y procedimientos experimentales

Animales – Cinco días antes del experimento, ratas hembra Sprague-Dawley (de 3-4 meses de vida) se adaptaron a vivir en una jaula para animales. El peso de los animales se controló durante este periodo para garantizar una estabilidad y adaptación correctas. Los animales tuvieron alimento y agua a diario sin restricciones.

Introducción de un defecto de tibia de tamaño crítico – Los animales se anestesiaron con una combinación de Quetamina (120 mg/kg) y Xilacina (17 mg/kg). Durante el procedimiento quirúrgico los animales se colocaron en una placa térmica para mantener la temperatura corporal (y evitar la hipotermia). La tibia derecha se rasuró y se frotó con una solución de tinción de polidina. La parte media de la tibia derecha se expuso desde el lado medio anterior por incisión longitudinal (Figura 8a). Se colocó un fijador externo proximal y distal a la sección media de la tibia (Figura 8b). Se perforaron dos agujas en la tibia proximal (21G) y tibia distal (23G) y conectaron dos fijadores externos (tornillos) para formar una fijación estable del hueso. Se cortó una abertura de 10 mm usando una sierra de disco en la parte entre las agujas proximal y distal de los fijadores (Figura 8c). La fíbula no se osteotomizó.

Implantación de un armazón de PEG-fibrinógeno (Gelrin™) – Se insertó un tapón de PEG-fibrinógeno (5 mm de diámetro y 10 mm de longitud) en el sitio del defecto y se envolvió con tejido conectivo circundante para asegurar el tapón en el sitio (Figura 8d). La herida incisional se saturó usando hilo quirúrgico de nylon. A los animales se les administró antibióticos profilácticos (ampicilina 0,1 gramos/100 gramos). Inmediatamente después de la cirugía, los animales se sometieron a rayos X y se evaluaron posteriormente por exploración de rayos X semanal. Los animales se movían con libertad en la jaula durante todo el periodo de seguimiento post- operatorio. Al final de un periodo de evaluación de 2 meses, los animales se sacrificaron con CO₂ y la tibia derecha se recogió para someter a ensayo histológico y mecánico.

Resultados experimentales

Se sabe que, la introducción de un defecto de tibia de tamaño crítico en rata produce una mortalidad de hasta un 20%. Se introdujo un defecto de tibia de tamaño crítico en rata en 25 ratas (Figuras 8a-d), de las cuales 17 ratas se sometieron posteriormente a implante de armazón usando los hidrogeles de PEG-fibrinógeno o de PEG-PEG (véase la Tabla 3, más adelante, para ratas representativas). De cuatro a siete semanas después de someter a las ratas a defectos de tibia de tamaño crítico estas se sacrificaron y se evaluaron las tibias para determinar la presencia, grado y localización de crecimiento interno tisular y formación de hueso nuevo. Como se observa en las Figuras 9a-b, cinco semanas después de la cirugía en la tibias de rata con implante Gelrin™ (Figura 9b) puede observarse un hueso nuevo pero no en las ratas de control (Figura 9a).

Tabla 3

| Implantación de armazón en defecto de tibia de tamaño crítico en rata | | | | |
|--|----------------------------|-------------|---|-------------------------------------|
| Nº de Rata | Fecha de la cirugía | Pata | Composición de Hidrogel | Días después de la operación |
| 5 | 24/5/04 | Izquierda | PEG-fibrinógeno (escindido, 4-kDa) 15% P/V total; PEG-fibrinógeno 10% y PEG-DA 5% | 42 |
| 6 | 24/5/04 | Derecha | PEG-fibrinógeno (escindido, 4-kDa) 15% P/V total; PEG-fibrinógeno 10% y PEG-DA 5% | 35 |
| 7 | 16/8/04 | Derecha | PEG-fibrinógeno (completo, 10 kDa) 1,75 % PEG-fibrinógeno (Gelrin™) y 3 % PEG-DA | 49 |
| 8 | 16/8/04 | Derecha | PEG-fibrinógeno (completo, 10 kDa) 1,75 % PEG-fibrinógeno (Gelrin™) y 3 % PEG-DA | |
| 9 | 16/8/04 | Derecha | PEG-fibrinógeno (completo, 10 kDa) 1,75 % PEG-fibrinógeno (Gelrin™) y 3 % PEG-DA | 35 |
| 11 | 27/7/04 | Derecha | Solo PEG (4-kDa) 10% P/V | 41 |
| 12 | 27/7/04 | Derecha | Solo PEG (4-kDa) 10% P/V | 41 |
| 13 | 27/7/04 | Derecha | Solo PEG (6-kDa) 15% WN | 41 |
| 14 | 27/7/04 | Derecha | Solo PEG (6-kDa) 15% P/V | 41 |
| 15 | 27/7/04 | Derecha | Sin hidrogel - control | 41 |
| 16 | 27/7/04 | Derecha | Sin hidrogel - control | 41 |
| 21 | 13/7/04 | Derecha | PEG-fibrinógeno (completo, 10 kDa) 1,75 % PEG-fibrinógeno (Gelrin™) y 3 % PEG-DA | |
| 22 | 13/7/04 | Derecha | PEG-fibrinógeno (completo, 10 kDa) 1,75 % PEG-fibrinógeno (Gelrin™) y 3 % PEG-DA | |
| 23 | 27/9/04 | Derecha | PEG-fibrinógeno (completo, 10 kDa) 1,75 % PEG-fibrinógeno (Gelrin™) y 3 % PEG-DA | |
| 24 | 27/9/04 | Derecha | PEG-fibrinógeno (completo, 10 kDa) 1,75 % PEG-fibrinógeno (Gelrin™) y 3 % PEG-DA | |

Tabla 3: Experimentos representativos *in vivo* realizados después de la introducción del defecto de tibia de tamaño crítico en rata. A las ratas se les implantaron hidrogeles de PEG-PEG (solo PEG) o de PEG-fibrinógeno. Los hidrogeles de PEG-fibrinógeno se prepararon a partir de precursores de PEG-fibrinógeno y reticulantes de PEG-DA. Los precursores de PEG-fibrinógeno se prepararon a partir de fibrinógeno completo (Gelrin™) o de fibrinógeno escindido con CNBr.

Las Figuras 10-17 demuestran la presencia de tejido óseo y cartilaginoso normal cinco semanas después de la introducción de un defecto de tibia de tamaño crítico e implantación de Gelrin™. Por tanto, las tibias de ratas tratadas con Gelrin™ mostraron tejido fibroso bien vascularizado, orientado y densamente texturizado (Figura 13), cicatrización osteonal (Figura 11) y sistemas Haversianos con canales centrales pequeños que contenían vasos sanguíneos (Figura 10).

Ejemplo 4

El constituyente de PEG sintético puede controlar la biodegradabilidad de los hidrogeles de PEG-fibrinógeno

La biodegradabilidad de los hidrogeles de PEG-fibrinógeno se reduce añadiendo PEG-DA libre a los hidrogeles – Para definir adicionalmente el efecto de la concentración de la molécula reticulante de la presente invención [es decir PEG-DA (PEG libre)] sobre la biodegradabilidad del hidrogel, se sembraron 1×10^6 células de musculo liso por ml dentro de hidrogeles Gelrin™ (1,75% PEG-fibrinógeno, PEG 10-kDa) que contenían diversas concentraciones de PEG-DA. Los hidrogeles sembrados se cultivaron durante 48 horas, después de lo cual, usando un microscopio invertido, se evaluó la capacidad de las células para adherirse y propagarse dentro de los hidrogeles.

Como se observa en las Figuras 18a-e, mientras que las células cultivadas en la matriz pura de Gelrin™ (en ausencia de PEG-DA libre) mostraron extensiones celulares y propagación significativa, las células cultivadas en hidrogeles fabricados con concentraciones en aumento de PEG libre (*es decir* 0,5-2%) carecían de extensiones celulares y eran más redondeadas. Estos resultados demuestran que el exceso de una molécula reticulante (PEG-DA) en la matriz de Gelrin™ reduce la degradabilidad mediada por células y la penetración celular a través del hidrogel.

La biodegradabilidad y la extensión celular disminuyen en hidrogeles Gelrin™ constituidos por más del 1% de una molécula reticulante (PEG-DA) – Para ensayar adicionalmente el efecto de la molécula reticulante (*es decir*, PEG-DA funcionalizado) sobre la propagación celular a través del armazón de PEG-fibrinógeno de la presente invención, se prepararon matrices Gelrin™ (1,75 % PEG-fibrinógeno, PEG 10-kDa) como hidrogeles puros (en ausencia de reticulante PEG-DA libre) o en presencia de 1 o 2% de PEG-DA libre y grupos de células constituidos por células del músculo liso muy compactas dentro de una matriz gelatinosa de colágeno (grupo de 5×10^5 células en un mg de colágeno). Los grupos se sembraron en el centro de cada hidrogel colocando la masa celular en la matriz Gelrin™ antes de la polimerización y formando el armazón alrededor del tejido de manera que encapsule la masa de tejido desde todos los lados. El grado de extensión celular se controló después de 1, 2, 4 y 7 días de cultivo usando microscopía de contraste de fase. Como se muestra en las Figuras 19a-1, en hidrogeles puros Gelrin™ se observaron extensiones celulares significativas comenzando después de un día de cultivo. En cambio, las extensiones celulares disminuyeron relativamente en grupos de células de músculo liso cultivadas dentro de hidrogeles Gelrin™ fabricados en presencia 2% de PEG-DA.

En conjunto, estos resultados demuestran que la biodegradabilidad y propagación celular a través de los armazones depende del grado de reticulación del hidrogel; mayores concentraciones de una molécula reticulante (PEG-DA) se correlacionan inversamente con la biodegradabilidad del hidrogel del armazón de la presente invención.

Se aprecia que determinadas características de la invención, que por aclaración se describen en el contexto de realizaciones distintas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. Por el contrario, diversas características de la invención que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

Aunque la invención se ha descrito junto con sus realizaciones específicas, es evidente que para los expertos en la materia serán obvias muchas alternativas, modificaciones y variaciones. Por consiguiente, todas estas alternativas, modificaciones y variaciones pretenden incluirse dentro del espíritu y amplio alcance de las reivindicaciones adjuntas. Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan en la misma en su totalidad por referencia, al mismo grado como si cada publicación, patente o solicitud de patente individual se especificase e individualmente se indicase como incorporada en el presente documento por referencia. Además, las citas o identificaciones de cualquier referencia en esta solicitud no deben interpretarse como una admisión de que tal referencia esté disponible como técnica anterior a la presente invención.

Referencias citadas

(En el texto se citan referencias adicionales)

1. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260(5110): 920-6.
2. Nerem RM, Seliktar D. Vascular tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng* 2001; 3: 225-43.
3. Griffith LG. Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 961: 83-95.
4. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 2003; 24(24): 4337-51.
5. Hubbell JA. Materials as morphogenetic guides in tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol* 2003; 14(5): 551-8.
6. Leach JB, Bivens KA, Collins CN, Schmidt CE. Development of photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol-peptide composite hydrogels for soft tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2004; 70A(1): 74-82.
7. Leach JB, Schmidt CE. Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 2005; 26(2): 125-135.
8. Merrill EA, Salzman EW. Polyethylene oxide as a biomaterial. *ASAIO J* 1983; 6: 60-4.
9. Temenoff JS, Athanasiou KA, LeBaron RG, Mikos AG. Effect of poly(ethylene glycol) molecular weight on tensile and swelling properties of oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2002; 59(3): 429-37.
10. Elbert DL, Hubbell JA. Conjugate addition reactions combined with free-radical cross-linking for the design of materials for tissue engineering. *Biomacromolecules* 2001; 2(2): 430-41.
11. Elisseeff J, McIntosh W, Anseth K, Riley S, Ragan P, Langer R. Photoencapsulation of chondrocytes in poly(ethylene oxide)-based semi-interpenetrating networks. *J Biomed Mater Res* 2000; 51(2): 164-71.
12. Nguyen KT, West JL. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2002; 23 (22): 4307-14.
13. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthesis and Physicochemical Characterization of End-Linked Poly(ethylene glycol)-

- co-peptide Hydrogels Formed by Michael-Type Addition. *Biomacromolecules* 2003; 4(3): 713-22.
14. Herrick S, Blanc-Brude O, Gray A, Laurent G. Fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31(7): 741-6.
15. Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 1997; 91(4): 439-42.
- 5 16. Halstenberg S, Panitch A, Rizzi S, Hall H, Hubbell JA. Biologically engineered protein-graft-poly(ethylene glycol) hydrogels: a cell adhesive and plasmin-degradable biosynthetic material for tissue repair. *Biomacromolecules* 2002; 3(4): 710-23.
17. Lutolf MP, Lauer-Fields JL, Schmoekel HG, Metters AT, Weber FE, Fields GB, y col. Synthetic matrix metallo-proteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(9): 5413-8.
- 10 18. Gobin AS, West JL. Cell migration through defined, synthetic ECM analogs. *Faseb J* 2002; 16(7): 751-3.
19. Elbert DL, Pratt AB, Lutolf MP, Halstenberg S, Hubbell JA. Protein delivery from materials formed by self-selective conjugate addition reactions. *J Control Release* 2001; 76(1-2): 11-25.
20. Lum LY, Cher NL, Williams CG, Elisseeff JH. An extracellular matrix extract for tissue-engineered cartilage. *IEEE Eng Med Biol Mag* 2003; 22(5): 71-6.
- 15 21. Oakes BW, Batty AC, Handley CJ, Sandberg LB. The synthesis of elastin, collagen, and glycosaminoglycans by high density primary cultures of neonatal rat aortic smooth muscle. An ultrastructural and biochemical study. *Eur J Cell Biol* 1982; 27(1): 34-46.
22. Remuzzi A, Dewey CF, Jr., Davies PF, Gimbrone MA, Jr. Orientation of endothelial cells in shear fields in vitro. *Biorheology* 1984; 21(4): 617-30.
- 20 23. Seliktar D, Zisch AH, Lutolf MP, Wrana JL, Hubbell JA. MMP-2 sensitive, VEGF-bearing bioactive hydrogels for promotion of vascular healing. *J Biomed Mater Res* 2004; 68A(4): 704-16.
24. Kurfurst MM. Detection and molecular weight determination of polyethylene glycol-modified hirudin by staining after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 1992; 200(2): 244-8.
- 25 25. Pomroy NC, Deber CM. Solubilization of hydrophobic peptides by reversible cysteine PEGylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245(2): 618-21.
26. Midha R, Munro CA, Dalton PD, Tator CH, Shoichet MS. Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *J Neurosurg* 2003; 99(3): 555-65.
27. Zisch AH, Lutolf MP, Ehrbar M, Djonov V, Bezuidenhout D, Davies N, y col. Cell-demanded Release of VEGF from Synthetic, Biointeractive Cell-ingrowth Matrices for Vascularized Tissue Growth. *FASEB Journal* 2003.
- 30 28. Lutolf MP, Weber FE, Schmoekel HG, Schense JC, Kohler T, Muller R, y col. Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nat Biotechnol* 2003; 21(5): 513-8.
29. Mann BK, Gobin AS, Tsai AT, Schmedlen RH, West JL. Smooth muscle cell growth in photopolymerized hydrogels with cell adhesive and proteolytically degradable domains: synthetic ECM analogs for tissue engineering. *Biomaterials* 2001; 22(22): 3045-51.
- 35 30. Holmes TC. Novel peptide-based biomaterial scaffolds for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2002; 20(1): 16-21.
31. Mann BK, Schmedlen RH, West JL. Tethered-TGF-beta increases extracellular matrix production of vascular smooth muscle cells. *Biomaterials* 2001; 22(5): 439-44.
- 40 32. Blom EJ, Klein-Nulend J, Klein CP, Kurashina K, van Waas MA, Burger EH. Transforming growth factor-beta1 incorporated during setting in calcium phosphate cement stimulates bone cell differentiation in vitro. *J Biomed Mater Res* 2000; 50(1): 67-74.

Listado de secuencias

- <110> Regentis Biomaterials Ltd.
- 45 <120> MATRIZ COMPUESTA DE UN ESQUELETO PROTEICO DE ORIGEN NATURAL RETICULADO POR POLIETILENGLICOL Y PROCEDIMIENTOS DE GENERACIÓN Y USO DE LA MISMA
- <130> F-13242/EP-SS
- <140> 04806668.2
- <141> 15-diciembre-2004
- 50 <150> US 60/530.917
- <151> 22-diciembre-2003
- <161> 6
- <170> Patent In version 3.2
- <210> 1
- 55 <211> 391
- <212> PRT
- <213> Bos Taurus

ES 2 392 061 T3

<400> 1

Val Asp Ile Asp Ile Lys Ile Arg Ser Cys Lys Gly Ser Cys Ser Lys
 1 5 10 15

Ala Leu Glu His Lys Val Asp Leu Glu Asp Tyr Lys Asn Gln Gln Lys
 20 25 30

Gln Leu Glu Gln Val Ile Ala Ile Asn Leu Leu Pro Ser Arg Asp Ile
 35 40 45

Gln Tyr Leu Pro Leu Ile Lys Met Ser Thr Ile Thr Gly Pro Val Pro
 50 55 60

Lys Lys Phe Lys Ser Gln Leu Gln Glu Ala Pro Leu Glu Trp Lys Ala
 65 70 75 80

Leu Leu Glu Met Gln Gln Thr Lys Met Val Leu Glu Thr Phe Gly Gly
 85 90 95

Asp Gly His Ala Arg Gly Asp Ser Val Ser Gln Gly Thr Gly Leu Ala
 100 105 110

Pro Gly Ser Pro Arg Lys Pro Gly Thr Ser Ser Ile Gly Asn Val Asn
 115 120 125

Pro Gly Ser Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Gly Thr Trp Asn Pro Gly Arg
 130 135 140

Pro Glu Pro Gly Ser Ala Gly Thr Trp Asn Pro Gly Arg Pro Glu Pro
 145 150 155 160

Gly Ser Ala Gly Thr Trp Asn Pro Gly Arg Pro Glu Pro Gly Ser Ala
 165 170 175

Gly Thr Trp Asn Pro Gly Arg Pro Glu Pro Gly Ser Gly Gly Thr Trp

ES 2 392 061 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 180 | | | | | | 185 | | | | | 190 | |
| Asn | Thr | Gly | Ser | Ser | Gly | Ser | Ser | Ser | Phe | Arg | Pro | Asp | Ser | Ser | Gly |
| | | 195 | | | | | | 200 | | | | 205 | | | |
| His | Gly | Asn | Ile | Arg | Pro | Ser | Ser | Pro | Asp | Trp | Gly | Thr | Phe | Arg | Glu |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Glu | Gly | Ser | Val | Ser | Ser | Gly | Thr | Lys | Gln | Glu | Phe | His | Thr | Gly | Lys |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Leu | Val | Thr | Thr | Lys | Gly | Asp | Lys | Glu | Leu | Leu | Ile | Asp | Asn | Glu | Lys |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| Val | Thr | Ser | Gly | His | Thr | Thr | Thr | Thr | Arg | Arg | Ser | Cys | Ser | Lys | Val |
| | | | 260 | | | | | | 265 | | | | | 270 | |
| Ile | Thr | Lys | Thr | Val | Thr | Asn | Ala | Asp | Gly | Arg | Thr | Glu | Thr | Thr | Lys |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | |
| Glu | Val | Val | Lys | Ser | Glu | Asp | Gly | Ser | Asp | Cys | Gly | Asp | Ala | Asp | Phe |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | |
| Asp | Trp | His | His | Thr | Phe | Pro | Ser | Arg | Gly | Asn | Leu | Asp | Asp | Phe | Phe |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 |
| His | Arg | Asp | Lys | Asp | Asp | Phe | Phe | Thr | Arg | Ser | Ser | His | Glu | Phe | Asp |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | |
| Gly | Arg | Thr | Gly | Leu | Ala | Pro | Glu | Phe | Ala | Ala | Leu | Gly | Glu | Ser | Gly |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | | 350 | |
| Ser | Ser | Ser | Ser | Lys | Thr | Ser | Thr | His | Ser | Lys | Gln | Phe | Val | Ser | Ser |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | |
| Ser | Thr | Thr | Val | Asn | Arg | Gly | Gly | Ser | Ala | Ile | Glu | Ser | Lys | His | Phe |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | |
| Lys | Met | Glu | Asp | Glu | Ala | Glu | | | | | | | | | |
| 385 | | | | | 390 | | | | | | | | | | |

<210> 2
 <211> 425
 <212> PRT
 5 <213> Bos Taurus
 <400> 2

ES 2 392 061 T3

Ser Gly Gly Gly Tyr Arg Ala Arg Pro Ala Thr Ala Thr Val Gly Gln
1 5 10 15

Lys Lys Val Glu Arg Lys Pro Pro Asp Ala Asp Gly Cys Leu His Ala
 20 25 30

Asp Pro Asp Leu Gly Val Leu Cys Pro Thr Gly Cys Lys Leu Gln Asp
 35 40 45

ES 2 392 061 T3

Thr Leu Val Arg Gln Glu Arg Pro Ile Arg Lys Ser Ile Glu Asp Leu
50 55 60

Arg Asn Thr Val Asp Ser Val Ser Arg Thr Ser Ser Ser Thr Phe Gln
65 70 75 80

Tyr Ile Thr Leu Leu Lys Asn Met Trp Lys Gly Arg Gln Asn Gln Val
85 90 95

Gln Asp Asn Glu Asn Val Val Asn Glu Tyr Ser Ser His Leu Glu Lys
100 105 110

His Gln Leu Tyr Ile Asp Glu Thr Val Lys Asn Asn Ile Pro Thr Lys
115 120 125

Leu Arg Val Leu Arg Ser Ile Leu Glu Asn Leu Arg Ser Lys Ile Gln
130 135 140

Lys Leu Glu Ser Asp Val Ser Thr Gln Met Glu Tyr Cys Arg Thr Pro
145 150 155 160

Cys Thr Val Thr Cys Asn Ile Pro Val Val Ser Gly Lys Glu Cys Glu
165 170 175

Lys Ile Ile Arg Asn Glu Gly Glu Thr Ser Glu Met Tyr Leu Ile Gln
180 185 190

Pro Glu Asp Ser Ser Lys Pro Tyr Arg Val Tyr Cys Asp Met Lys Thr
195 200 205

Glu Lys Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln Asn Arg Gln Asp Gly Ser Val
210 215 220

Asp Phe Gly Arg Lys Trp Asp Pro Tyr Lys Gln Gly Phe Gly Asn Ile
225 230 235 240

Ala Thr Asn Ala Glu Gly Lys Lys Tyr Cys Gly Val Pro Gly Glu Tyr
245 250 255

Trp Leu Gly Asn Asp Arg Ile Ser Gln Leu Thr Asn Met Gly Pro Thr
260 265 270

Lys Leu Leu Ile Glu Met Glu Asp Trp Lys Gly Asp Lys Val Thr Ala
275 280 285

Leu Tyr Glu Gly Phe Thr Val Gln Asn Glu Ala Asn Lys Tyr Gln Leu
290 295 300

Ser Val Ser Lys Tyr Lys Gly Thr Ala Gly Asn Ala Leu Ile Glu Gly
305 310 315 320

Ala Ser Gln Leu Val Gly Glu Asn Arg Thr Met Thr Ile His Asn Ser
325 330 335

Met Phe Phe Ser Thr Tyr Asp Arg Asp Asn Asp Gly Trp Lys Thr Thr
340 345 350

ES 2 392 061 T3

Asp Pro Arg Lys Gln Cys Ser Lys Glu Asp Gly Gly Gly Trp Trp Tyr
355 360 365

Asn Arg Cys His Ala Ala Asn Pro Asn Gly Arg Tyr Tyr Trp Gly Gly
370 375 380

Ala Tyr Thr Trp Asp Met Ala Lys His Gly Thr Asp Asp Gly Val Val
385 390 395 400

Trp Met Asn Trp Gln Gly Ser Trp Tyr Ser Met Lys Lys Met Ser Met
405 410 415

Lys Ile Arg Pro Tyr Phe Pro Glu Gln
420 425

<210> 3

<211> 444

<212> PRT

5 <213> Bos Taurus

<400> 3

ES 2 392 061 T3

Met Ser Trp Ser Ser His Pro Pro Ser Val Ile Phe Tyr Ile Leu Ser
 1 5 10 15

Leu Leu Ser Ser Ala Cys Leu Ala Tyr Val Ala Thr Arg Asp Asn Cys
 20 25 30

Cys Ile Leu Asp Glu Arg Phe Gly Ser Tyr Cys Pro Thr Thr Cys Gly
 35 40 45

Ile Ala Asp Phe Leu Asn Asn Tyr Gln Thr Ser Val Asp Lys Asp Leu
 50 55 60

Arg Thr Leu Glu Gly Ile Leu Tyr Gln Val Glu Asn Lys Thr Ser Glu
 65 70 75 80

Ala Arg Glu Leu Val Lys Ala Ile Gln Ile Ser Tyr Asn Pro Asp Gln
 85 90 95

Pro Ser Lys Pro Asn Asn Ile Glu Ser Ala Thr Lys Asn Ser Lys Ser
 100 105 110

Met Met Glu Glu Ile Met Lys Tyr Glu Thr Leu Ile Ser Thr His Glu
 115 120 125

Ser Thr Ile Arg Phe Leu Gln Glu Val Tyr Asn Ser Asn Ser Gln Lys
 130 135 140

Ile Val Asn Leu Arg Asp Lys Val Val Gln Leu Glu Ala Asn Cys Gln
 145 150 155 160

Glu Pro Cys Gln Asp Thr Val Lys Ile His Asp Val Thr Gly Arg Asp
 165 170 175

Cys Gln Asp Val Ala Asn Lys Gly Ala Lys Glu Ser Gly Leu Tyr Phe

ES 2 392 061 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 180 | | | | | | 185 | | | | | 190 | |
| Ile | Arg | Pro | Leu | Lys | Ala | Lys | Gln | Phe | Leu | Val | Tyr | Cys | Glu | Ile | Asp |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| Gly | Ser | Gly | Asn | Gly | Trp | Thr | Val | Phe | Gln | Lys | Arg | Leu | Asp | Gly | Ser |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Leu | Asp | Phe | Lys | Lys | Asn | Trp | Ile | Gln | Tyr | Lys | Glu | Gly | Phe | Gly | His |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Leu | Ser | Pro | Thr | Gly | Thr | Gly | Asn | Thr | Glu | Phe | Trp | Leu | Gly | Asn | Glu |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | | 255 |
| Lys | Ile | His | Leu | Ile | Ser | Thr | Gln | Ser | Ser | Ile | Pro | Tyr | Val | Leu | Arg |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | | | 270 |
| Ile | Gln | Leu | Glu | Asp | Trp | Asn | Gly | Arg | Thr | Ser | Thr | Ala | Asp | Tyr | Ala |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | | 285 | | |
| Ser | Phe | Lys | Val | Thr | Gly | Glu | Asn | Asp | Lys | Tyr | Arg | Leu | Thr | Tyr | Ala |
| | | 290 | | | | | 295 | | | | 300 | | | | |
| Tyr | Phe | Ile | Gly | Gly | Asp | Ala | Gly | Asp | Ala | Phe | Asp | Gly | Tyr | Asp | Phe |
| 305 | | | | | 310 | | | | | | 315 | | | | 320 |
| Gly | Asp | Asp | Ser | Ser | Asp | Lys | Phe | Phe | Thr | Ser | His | Asn | Gly | Met | Gln |
| | | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 |
| Phe | Ser | Thr | Trp | Asp | Ser | Asp | Asn | Asp | Lys | Tyr | Asp | Gly | Asn | Cys | Ala |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | | | 350 |
| Glu | Gln | Val | Gly | Ile | Gly | Trp | Trp | Met | Asn | Lys | Cys | His | Ala | Gly | His |
| | | 355 | | | | | | 360 | | | | | | | 365 |
| Leu | Asn | Gly | Val | Tyr | Tyr | Gln | Gly | Gly | Thr | Tyr | Ser | Lys | Thr | Ser | Thr |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | | 380 | | | |
| Pro | Asn | Gly | Tyr | Asp | Asn | Gly | Ile | Ile | Trp | Ala | Thr | Trp | Lys | Ser | Arg |
| 385 | | | | | 390 | | | | | | 395 | | | | 400 |
| Trp | Tyr | Ser | Met | Lys | Lys | Thr | Thr | Met | Lys | Ile | Ile | Pro | Leu | Asn | Arg |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | | 415 |
| Leu | Ala | Ile | Gly | Glu | Gly | Gln | Gln | His | Gln | Leu | Gly | Gly | Ala | Lys | Gln |
| | | | 420 | | | | | 425 | | | | | | | 430 |
| Val | Gly | Val | Glu | His | His | Val | Glu | Ile | Glu | Tyr | Asp | | | | |
| | | 435 | | | | | 440 | | | | | | | | |

<210> 4
 <211> 644
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 4

ES 2 392 061 T3

Met Phe Ser Met Arg Ile Val Cys Leu Val Leu Ser Val Val Gly Thr
 1 5 10 15
 Ala Trp Thr Ala Asp Ser Gly Glu Gly Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly
 20 25 30
 Gly Val Arg Gly Pro Arg Val Val Glu Arg His Gln Ser Ala Cys Lys
 35 40 45
 Asp Ser Asp Trp Pro Phe Cys Ser Asp Glu Asp Trp Asn Tyr Lys Cys
 50 55 60
 Pro Ser Gly Cys Arg Met Lys Gly Leu Ile Asp Glu Val Asn Gln Asp
 65 70 75 80
 Phe Thr Asn Arg Ile Asn Lys Leu Lys Asn Ser Leu Phe Glu Tyr Gln
 85 90 95
 Lys Asn Asn Lys Asp Ser His Ser Leu Thr Thr Asn Ile Met Glu Ile
 100 105 110
 Leu Arg Gly Asp Phe Ser Ser Ala Asn Asn Arg Asp Asn Thr Tyr Asn
 115 120 125
 Arg Val Ser Glu Asp Leu Arg Ser Arg Ile Glu Val Leu Lys Arg Lys
 130 135 140
 Val Ile Glu Lys Val Gln His Ile Gln Leu Leu Gln Lys Asn Val Arg
 145 150 155 160
 Ala Gln Leu Val Asp Met Lys Arg Leu Glu Val Asp Ile Asp Ile Lys
 165 170 175
 Ile Arg Ser Cys Arg Gly Ser Cys Ser Arg Ala Leu Ala Arg Glu Val
 180 185 190
 Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Asp Gln Gln Lys Gln Leu Glu Gln Val Ile
 195 200 205
 Ala Lys Asp Leu Leu Pro Ser Arg Asp Arg Gln His Leu Pro Leu Ile
 210 215 220
 Lys Met Lys Pro Val Pro Asp Leu Val Pro Gly Asn Phe Lys Ser Gln
 225 230 235 240
 Leu Gln Lys Val Pro Pro Glu Trp Lys Ala Leu Thr Asp Met Pro Gln
 245 250 255
 Met Arg Met Glu Leu Glu Arg Pro Gly Gly Asn Glu Ile Thr Arg Gly
 260 265 270
 Gly Ser Thr Ser Tyr Gly Thr Gly Ser Glu Thr Glu Ser Pro Arg Asn
 275 280 285
 Pro Ser Ser Ala Gly Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ser Gly Pro Gly Ser
 290 295 300

ES 2 392 061 T3

Thr Gly Asn Arg Asn Pro Gly Ser Ser Gly Thr Gly Gly Thr Ala Thr
305 310 315 320

Trp Lys Pro Gly Ser Ser Gly Pro Gly Ser Thr Gly Ser Trp Asn Ser
325 330 335

Gly Ser Ser Gly Thr Gly Ser Thr Gly Asn Gln Asn Pro Gly Ser Pro
340 345 350

Arg Pro Gly Ser Thr Gly Thr Trp Asn Pro Gly Ser Ser Glu Arg Gly
355 360 365

Ser Ala Gly His Trp Thr Ser Glu Ser Ser Val Ser Gly Ser Thr Gly
370 375 380

Gln Trp His Ser Glu Ser Gly Ser Phe Arg Pro Asp Ser Pro Gly Ser
385 390 395 400

Gly Asn Ala Arg Pro Asn Asn Pro Asp Trp Gly Thr Phe Glu Glu Val
405 410 415

Ser Gly Asn Val Ser Pro Gly Thr Arg Arg Glu Tyr His Thr Glu Lys
420 425 430

Leu Val Thr Ser Lys Gly Asp Lys Glu Leu Arg Thr Gly Lys Glu Lys
435 440 445

Val Thr Ser Gly Ser Thr Thr Thr Thr Arg Arg Ser Cys Ser Lys Thr
450 455 460

Val Thr Lys Thr Val Ile Gly Pro Asp Gly His Lys Glu Val Thr Lys
465 470 475 480

Glu Val Val Thr Ser Glu Asp Gly Ser Asp Cys Pro Glu Ala Met Asp
485 490 495

Leu Gly Thr Leu Ser Gly Ile Gly Thr Leu Asp Gly Phe Arg His Arg
500 505 510

His Pro Asp Glu Ala Ala Phe Phe Asp Thr Ala Ser Thr Gly Lys Thr
515 520 525

Phe Pro Gly Phe Phe Ser Pro Met Leu Gly Glu Phe Val Ser Glu Thr
530 535 540

Glu Ser Arg Gly Ser Glu Ser Gly Ile Phe Thr Asn Thr Lys Glu Ser
545 550 555 560

Ser Ser His His Pro Gly Ile Ala Glu Phe Pro Ser Arg Gly Lys Ser
565 570 575

Ser Ser Tyr Ser Lys Gln Phe Thr Ser Ser Thr Ser Tyr Asn Arg Gly
580 585 590

ES 2 392 061 T3

Asp Ser Thr Phe Glu Ser Lys Ser Tyr Lys Met Ala Asp Glu Ala Gly
 595 600 605

Ser Glu Ala Asp His Glu Gly Thr His Ser Thr Lys Arg Gly His Ala
 610 615 620

Lys Ser Arg Pro Val Arg Gly Ile His Thr Ser Pro Leu Gly Lys Pro
 625 630 635 640

Ser Leu Ser Pro

<210> 5
 <211> 491
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 5

Met Lys Arg Met Val Ser Trp Ser Phe His Lys Leu Lys Thr Met Lys
 1 5 10 15

His Leu Leu Leu Leu Leu Leu Cys Val Phe Leu Val Lys Ser Gln Gly
 20 25 30

Val Asn Asp Asn Glu Glu Gly Phe Phe Ser Ala Arg Gly His Arg Pro
 35 40 45

Leu Asp Lys Lys Arg Glu Glu Ala Pro Ser Leu Arg Pro Ala Pro Pro
 50 55 60

Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Arg Ala Arg Pro Ala Lys Ala Ala Ala
 65 70 75 80

Thr Gln Lys Lys Val Glu Arg Lys Ala Pro Asp Ala Gly Gly Cys Leu
 85 90 95

His Ala Asp Pro Asp Leu Gly Val Leu Cys Pro Thr Gly Cys Gln Leu
 100 105 110

Gln Glu Ala Leu Leu Gln Gln Glu Arg Pro Ile Arg Asn Ser Val Asp
 115 120 125

Glu Leu Asn Asn Asn Val Glu Ala Val Ser Gln Thr Ser Ser Ser Ser
 130 135 140

Phe Gln Tyr Met Tyr Leu Leu Lys Asp Leu Trp Gln Lys Arg Gln Lys
 145 150 155 160

Gln Val Lys Asp Asn Glu Asn Val Val Asn Glu Tyr Ser Ser Glu Leu
 165 170 175

Glu Lys His Gln Leu Tyr Ile Asp Glu Thr Val Asn Ser Asn Ile Pro
 180 185 190

Thr Asn Leu Arg Val Leu Arg Ser Ile Leu Glu Asn Leu Arg Ser Lys
 195 200 205

ES 2 392 061 T3

Ile Gln Lys Leu Glu Ser Asp Val Ser Ala Gln Met Glu Tyr Cys Arg
 210 215 220

Thr Pro Cys Thr Val Ser Cys Asn Ile Pro Val Val Ser Gly Lys Glu
 225 230 235 240

Cys Glu Glu Ile Ile Arg Lys Gly Gly Glu Thr Ser Glu Met Tyr Leu
 245 250 255

Ile Gln Pro Asp Ser Ser Val Lys Pro Tyr Arg Val Tyr Cys Asp Met
 260 265 270

Asn Thr Glu Asn Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln Asn Arg Gln Asp Gly
 275 280 285

Ser Val Asp Phe Gly Arg Lys Trp Asp Pro Tyr Lys Gln Gly Phe Gly
 290 295 300

Asn Val Ala Thr Asn Thr Asp Gly Lys Asn Tyr Cys Gly Leu Pro Gly
 305 310 315 320

Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Asp Lys Ile Ser Gln Leu Thr Arg Met Gly
 325 330 335

Pro Thr Glu Leu Leu Ile Glu Met Glu Asp Trp Lys Gly Asp Lys Val
 340 345 350

Lys Ala His Tyr Gly Gly Phe Thr Val Gln Asn Glu Ala Asn Lys Tyr
 355 360 365

Gln Ile Ser Val Asn Lys Tyr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Ala Leu Met
 370 375 380

Asp Gly Ala Ser Gln Leu Met Gly Glu Asn Arg Thr Met Thr Ile His
 385 390 395 400

Asn Gly Met Phe Phe Ser Thr Tyr Asp Arg Asp Asn Asp Gly Trp Leu
 405 410 415

Thr Ser Asp Pro Arg Lys Gln Cys Ser Lys Glu Asp Gly Gly Gly Trp
 420 425 430

Trp Tyr Asn Arg Cys His Ala Ala Asn Pro Asn Gly Arg Tyr Tyr Trp
 435 440 445

Gly Gly Gln Tyr Thr Trp Asp Met Ala Lys His Gly Thr Asp Asp Gly
 450 455 460

Val Val Trp Met Asn Trp Lys Gly Ser Trp Tyr Ser Met Arg Lys Met
 465 470 475 480

Ser Met Lys Ile Arg Pro Phe Phe Pro Gln Gln
 485 490

<210> 6
<211> 453
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 6

ES 2 392 061 T3

Met Ser Trp Ser Leu His Pro Arg Asn Leu Ile Leu Tyr Phe Tyr Ala
1 5 10 15

Leu Leu Phe Leu Ser Ser Thr Cys Val Ala Tyr Val Ala Thr Arg Asp
20 25 30

Asn Cys Cys Ile Leu Asp Glu Arg Phe Gly Ser Tyr Cys Pro Thr Thr
35 40 45

Cys Gly Ile Ala Asp Phe Leu Ser Thr Tyr Gln Thr Lys Val Asp Lys
50 55 60

Asp Leu Gln Ser Leu Glu Asp Ile Leu His Gln Val Glu Asn Lys Thr
65 70 75 80

Ser Glu Val Lys Gln Leu Ile Lys Ala Ile Gln Leu Thr Tyr Asn Pro
85 90 95

Asp Glu Ser Ser Lys Pro Asn Met Ile Asp Ala Ala Thr Leu Lys Ser
100 105 110

Arg Lys Met Leu Glu Glu Ile Met Lys Tyr Glu Ala Ser Ile Leu Thr
115 120 125

His Asp Ser Ser Ile Arg Tyr Leu Gln Glu Ile Tyr Asn Ser Asn Asn
130 135 140

Gln Lys Ile Val Asn Leu Lys Glu Lys Val Ala Gln Leu Glu Ala Gln
145 150 155 160

Cys Gln Glu Pro Cys Lys Asp Thr Val Gln Ile His Asp Ile Thr Gly
165 170 175

Lys Asp Cys Gln Asp Ile Ala Asn Lys Gly Ala Lys Gln Ser Gly Leu
180 185 190

Tyr Phe Ile Lys Pro Leu Lys Ala Asn Gln Gln Phe Leu Val Tyr Cys
195 200 205

Glu Ile Asp Gly Ser Gly Asn Gly Trp Thr Val Phe Gln Lys Arg Leu
210 215 220

Asp Gly Ser Val Asp Phe Lys Lys Asn Trp Ile Gln Tyr Lys Glu Gly
225 230 235 240

Phe Gly His Leu Ser Pro Thr Gly Thr Thr Glu Phe Trp Leu Gly Asn
245 250 255

Glu Lys Ile His Leu Ile Ser Thr Gln Ser Ala Ile Pro Tyr Ala Leu
260 265 270

ES 2 392 061 T3

Arg Val Glu Leu Glu Asp Trp Asn Gly Arg Thr Ser Thr Ala Asp Tyr
 275 280 285

Ala Met Phe Lys Val Gly Pro Glu Ala Asp Lys Tyr Arg Leu Thr Tyr
 290 295 300

Ala Tyr Phe Ala Gly Gly Asp Ala Gly Asp Ala Phe Asp Gly Phe Asp
 305 310 315 320

Phe Gly Asp Asp Pro Ser Asp Lys Phe Phe Thr Ser His Asn Gly Met
 325 330 335

Gln Phe Ser Thr Trp Asp Asn Asp Asn Asp Lys Phe Glu Gly Asn Cys
 340 345 350

Ala Glu Gln Asp Gly Ser Gly Trp Trp Met Asn Lys Cys His Ala Gly
 355 360 365

His Leu Asn Gly Val Tyr Tyr Gln Gly Gly Thr Tyr Ser Lys Ala Ser
 370 375 380

Thr Pro Asn Gly Tyr Asp Asn Gly Ile Ile Trp Ala Thr Trp Lys Thr
 385 390 395 400

Arg Trp Tyr Ser Met Lys Lys Thr Thr Met Lys Ile Ile Pro Phe Asn
 405 410 415

Arg Leu Thr Ile Gly Glu Gly Gln Gln His His Leu Gly Gly Ala Lys
 420 425 430

Gln Val Arg Pro Glu His Pro Ala Glu Thr Glu Tyr Asp Ser Leu Tyr
 435 440 445

Pro Glu Asp Asp Leu
 450

REIVINDICACIONES

1. Un almacén que comprende una pluralidad de unidades, cada una compuesta de un polímero sintético unido a una proteína de origen natural o una parte de la misma, en el que dicho polímero sintético es PEG y en el que dicha proteína de origen natural es fibrinógeno desnaturalizado.
2. Un procedimiento de generación un almacén que comprende:
- (a) la unión por covalencia de un polímero sintético a una proteína de origen natural o a una parte de la misma para obtener de esta manera una molécula precursora de polímero-proteína, y
 - (b) la reticulación de una pluralidad de dichas moléculas precursoras para generar de esta manera el almacén biodegradable, en el que dicho polímero sintético es PEG y en el que dicha proteína de origen natural es fibrinógeno desnaturalizado.
3. El almacén de la reivindicación 1, que adicionalmente comprende una molécula que puede reticularse, uniendo por covalencia dicha molécula dichas unidades.
4. El almacén o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho fibrinógeno es fibrinógeno completo o fibrinógeno fragmentado.
5. El almacén o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho PEG se selecciona del grupo que consiste en PEG-DA, PEG multi-acrilato en estrella de 4 brazos y PEG multi-acrilato en estrella de 8 brazos.
6. El almacén o el procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho PEG-DA es un PEG-DA de 4-kDa, PEG-DA de 6-kDa, PEG-DA de 10-kDa y/o PEG-DA de 20-kDa.
7. El almacén o el procedimiento de la reivindicación 6, en el que una proporción molar entre dicho PEG-DA y dicho fibrinógeno en dichas unidades es de 2-400 a 1, respectivamente.
8. Un hidrogel formado a partir del almacén de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 7 o formado a partir del almacén producido por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4 a 7.
9. El hidrogel de la reivindicación 8, en el que dicha proteína de origen natural es fibrinógeno completo y en el que una concentración de dichas unidades en dicho hidrogel se selecciona de un intervalo de 0,5-35%.
10. El hidrogel de la reivindicación 8, en el que dicho fibrinógeno es fibrinógeno fragmentado y en el que una concentración de dichas unidades en dicho hidrogel se selecciona de un intervalo de 0,5-35%.
11. El hidrogel de la reivindicación 9, en el que el módulo de elasticidad de dicho hidrogel está en un intervalo de 0,02-0,11 kPa para un 10-20% de polímero.
12. El hidrogel de la reivindicación 10, en el que el módulo de elasticidad de dicho hidrogel está en un intervalo de 0,01-0,07 kPa para un 10-20% de polímero.
13. Una composición compuesta de un polímero sintético unido a una proteína de origen natural o a una parte de la misma, en el que dicho polímero sintético es PEG y en el que dicha proteína de origen natural es fibrinógeno desnaturalizado para su uso en
- (a) la inducción de la formación *in vivo* de un tejido, en el que, dicha composición puede formar un almacén en un sujeto, induciendo así la formación de tejido *in vivo*, o
 - (b) el tratamiento de un sujeto que padece un trastorno **caracterizado por una** lesión o pérdida tisular, en el que dicha composición puede formar un almacén en el sujeto, induciendo así la formación de un tejido y tratando el trastorno **caracterizado por una** lesión o pérdida tisular.
14. La composición de la reivindicación 13 para su uso, en la que adicionalmente al sujeto se le debe administrar una molécula que puede reticular dicha composición.
15. La composición de la reivindicación 13 para su uso, en la que dicho PEG se selecciona del grupo que consiste en PEG-acrilato (PEG-Ac) y PEG-vinilsulfona (PEG-VS).
16. La composición de la reivindicación 15 para uso, en la que dicho PEG-Ac se selecciona del grupo que consiste en PEG-DA, PEG multi-acrilato en estrella de 4 brazos y PEG multi-acrilato en estrella de 8 brazos.
17. La composición de la reivindicación 16 para su uso, en la que dicho PEG-DA es un PEG-DA de 4-kDa, PEG-DA de 6-kDa, PEG-DA de 10-kDa y/o PEG-DA de 20-kDa.
18. La composición de la reivindicación 17 para su uso, en la que una proporción molar entre dicho PEG-DA y dicho fibrinógeno en dicha composición es de 2-400 a 1, respectivamente.

19. La composición de la reivindicación 13 para su uso, en la que dicho fibrinógeno es fibrinógeno completo o fibrinógeno fragmentado.
20. La composición de la reivindicación 14 para su uso, en la que dicha molécula capaz de reticulación se selecciona del grupo que consiste en PEG-DA, PEG multi-acrilato y PEG-VS.
- 5 21. La composición de la reivindicación 13 para su uso, en la que dicho armazón es biodegradable.
22. La composición de la reivindicación 13(b) para su uso, en la que dicha lesión tisular está asociada a un trastorno seleccionado del grupo que consiste en cirrosis hepática, diabetes de Tipo 1, fibrosis quística, cáncer de hueso, reparación de quemaduras y de heridas, degeneración macular relacionada con la edad, infarto de miocardio, reparación de miocardio, lesiones del SNC, defecto de cartílago reticular, degeneración de la vejiga y degeneración intestinal.
- 10 23. Una composición de material que comprende polietilenglicol (PEG) unido a fibrinógeno desnaturalizado, en el que dicha composición de material puede formar un armazón.
24. La composición de material de la reivindicación 23, en la que dicho PEG se selecciona del grupo que consiste en PEG-acrilato (PEG-Ac) y PEG-vinilsulfona (PEG- VS).
- 15 25. La composición de material de la reivindicación 24, en la que dicho PEG-Ac se selecciona del grupo que consiste en PEG-DA, PEG multiacrilato en estrella de 4 brazos y PEG multiacrilato en estrella de 8 brazos.
26. La composición de material de la reivindicación 25, en la que dicho PEG-DA es un PEG-DA de 4-kDa, PEG-DA de 6-kDa, PEG-DA de 10-kDa y/o PEG-DA de 20-kDa.
- 20 27. La composición de material de la reivindicación 25, en la que una proporción molar entre dicho PEG-DA y dicho fibrinógeno es de 2-400 a 1, respectivamente.
28. La composición de material de la reivindicación 22, en la que dicho fibrinógeno es fibrinógeno completo o fibrinógeno fragmentado.

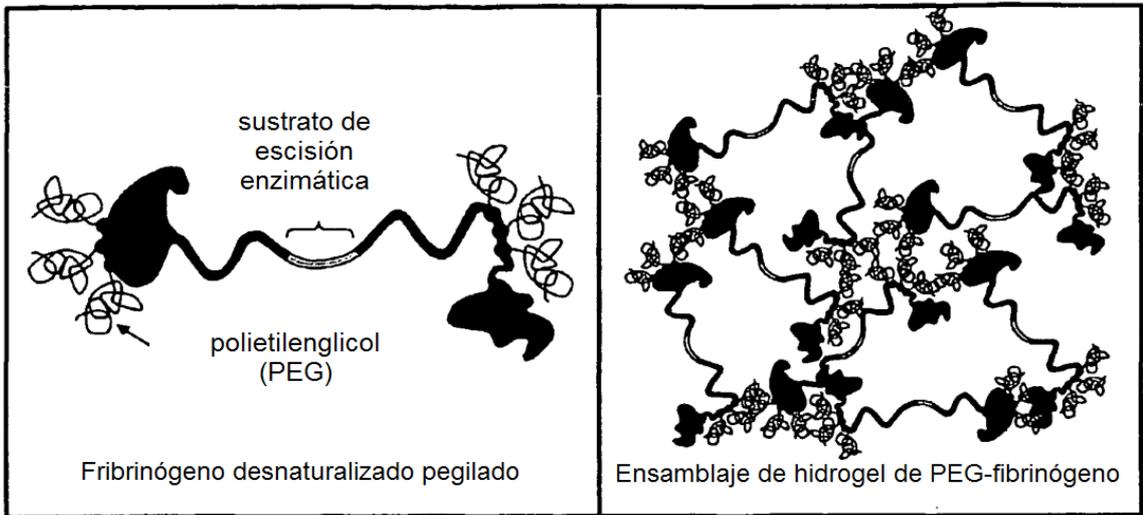


Fig. 1a

Fig. 1b

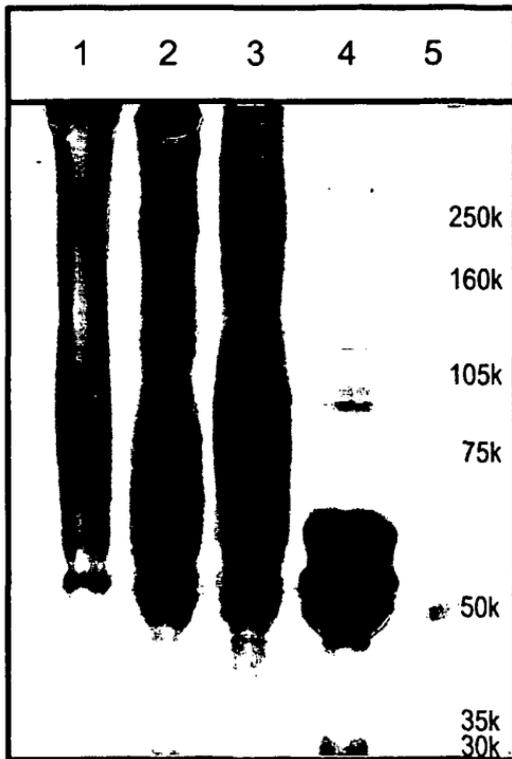


Fig. 2a

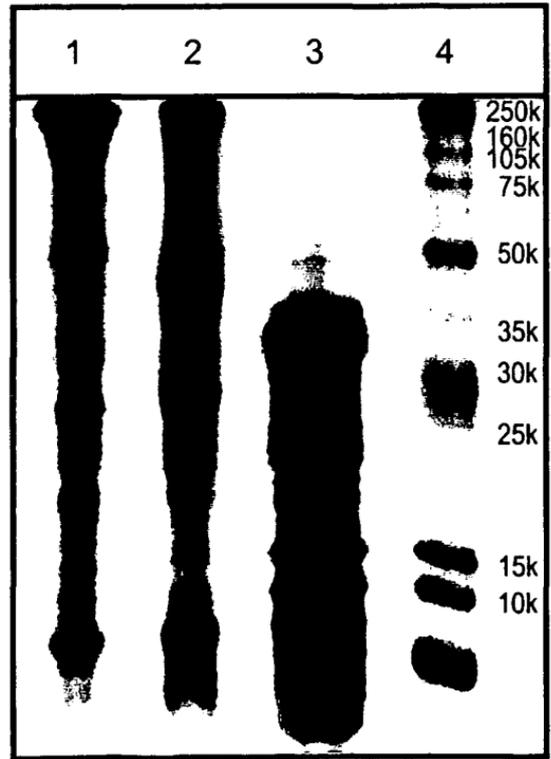


Fig. 2b

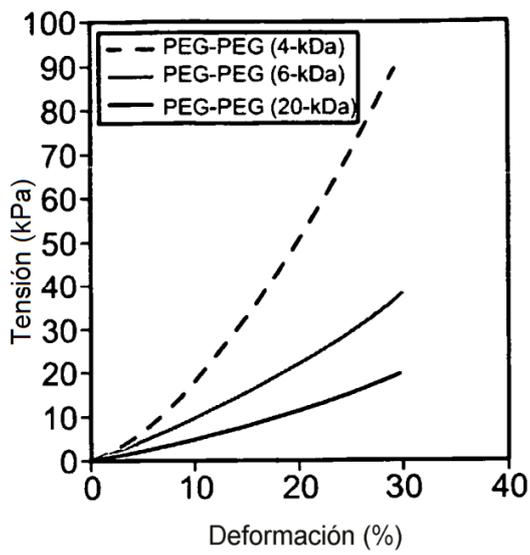


Fig. 3a

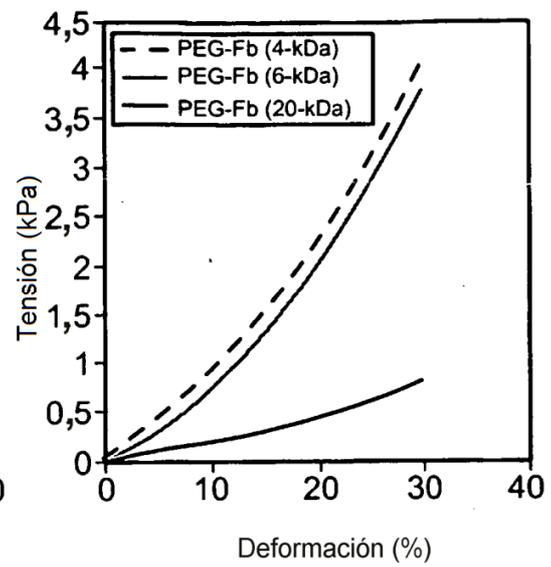


Fig. 3b

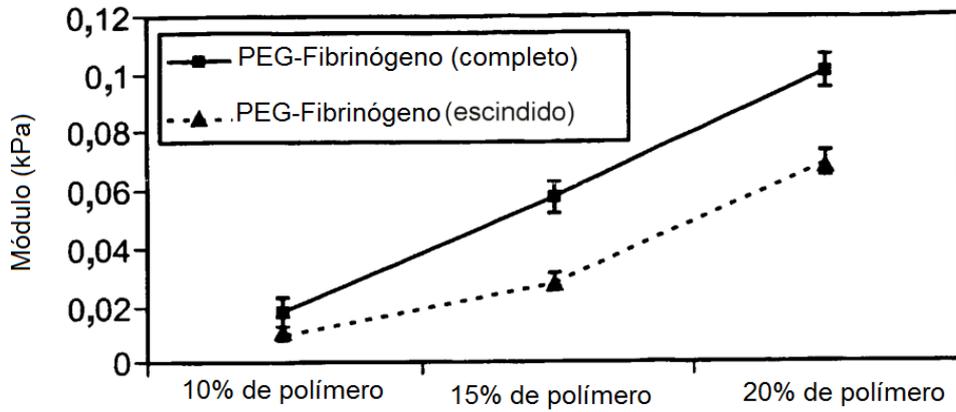


Fig. 4a

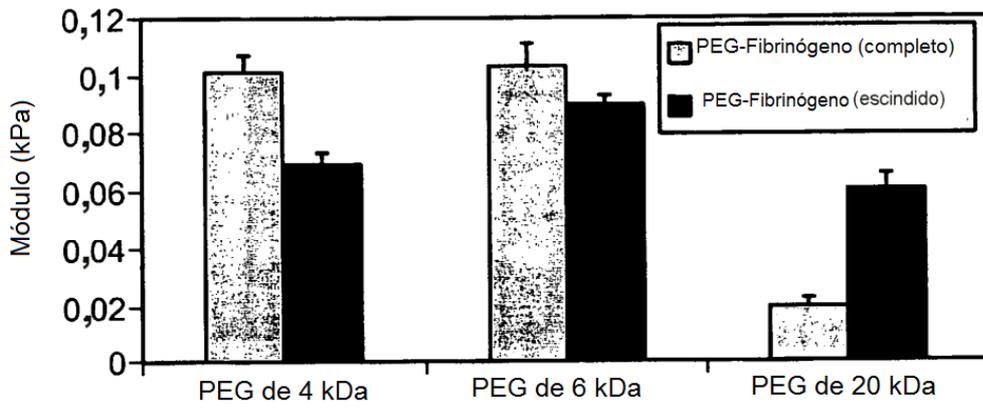


Fig. 4b

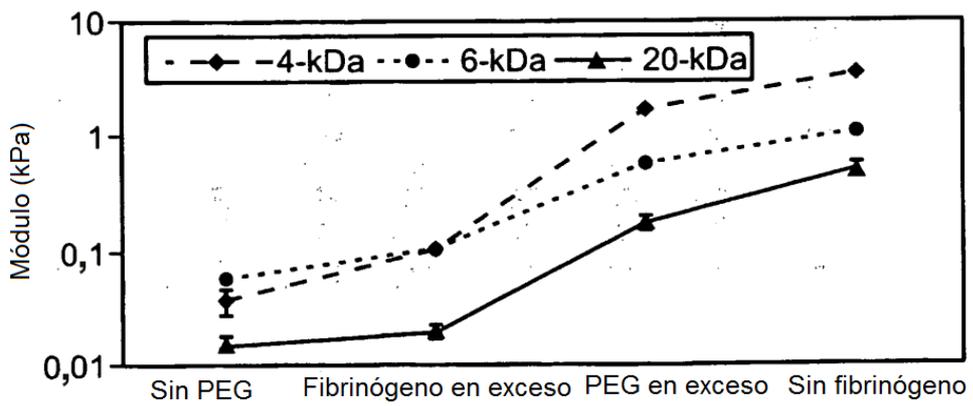


Fig. 4c

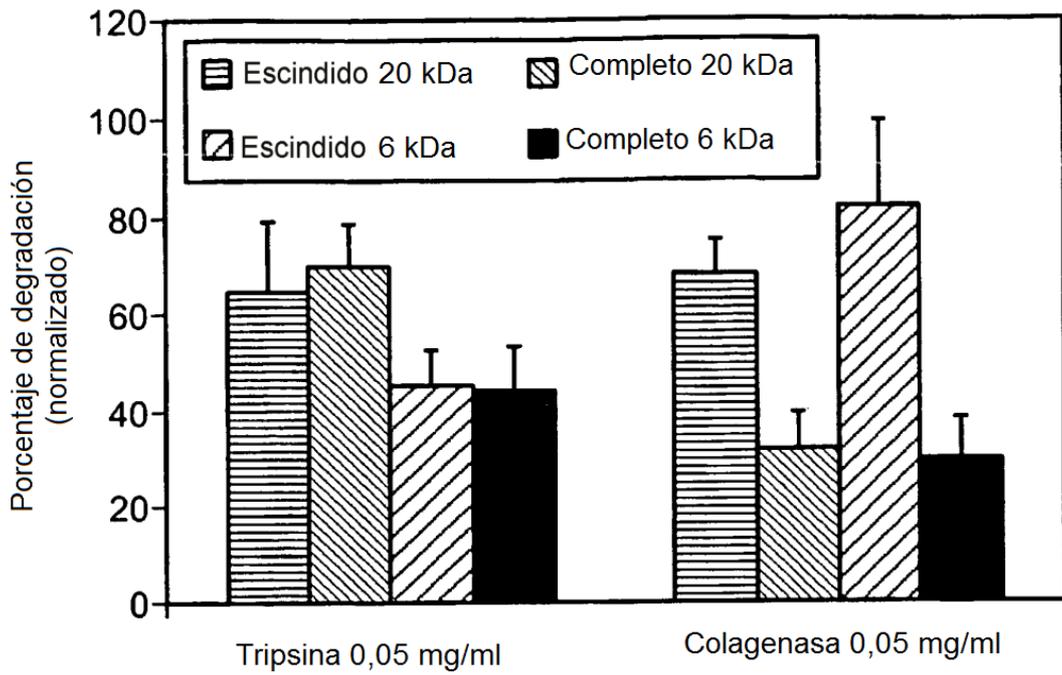


Fig. 5a

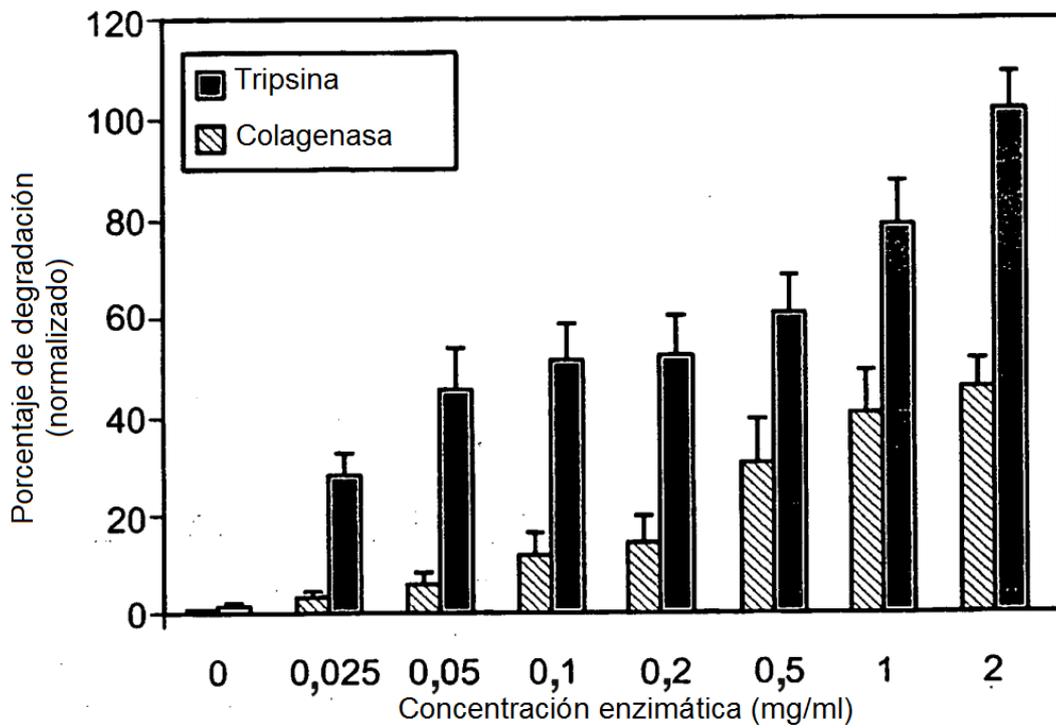


Fig. 5b



Fig. 6a

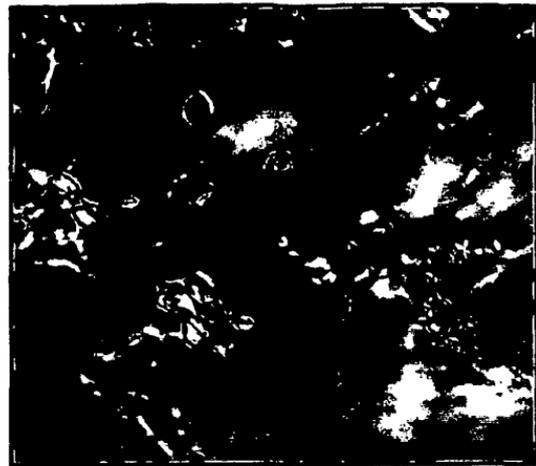


Fig. 6b

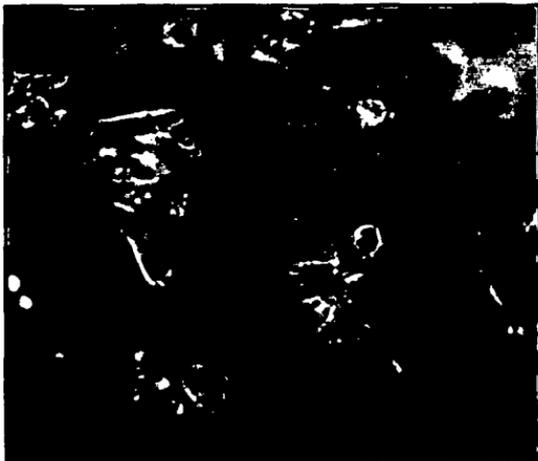


Fig. 6c

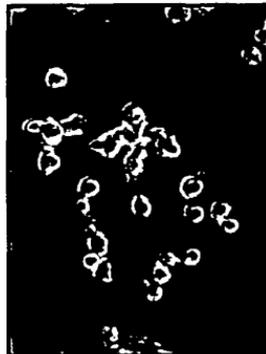


Fig. 6d



Fig. 6e



Fig. 7a

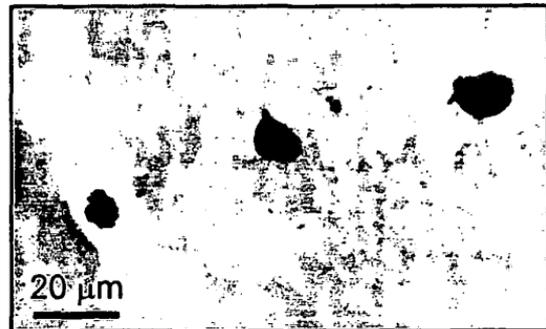


Fig. 7b

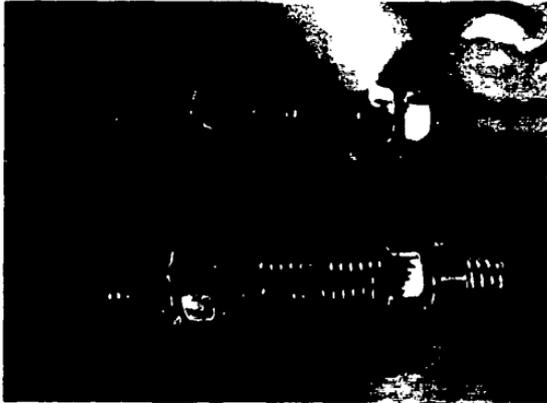


Fig. 8a

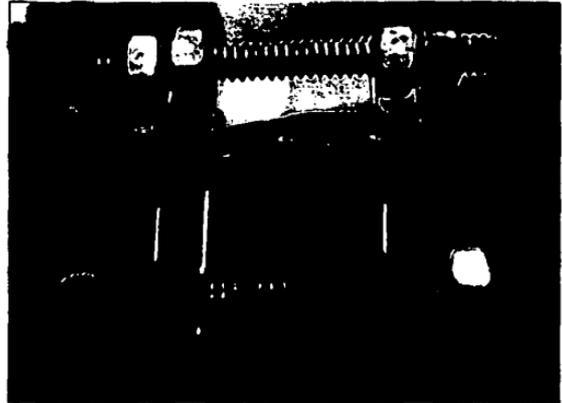


Fig. 8b

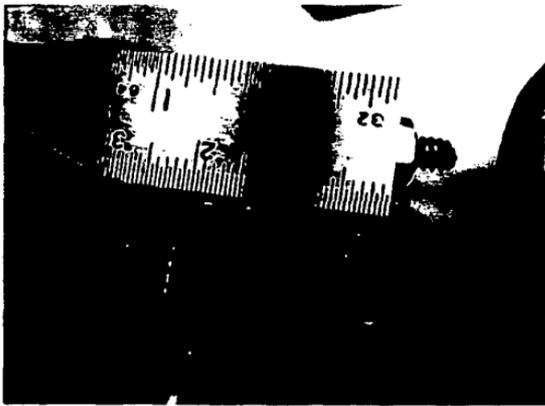


Fig. 8c



Fig. 8d

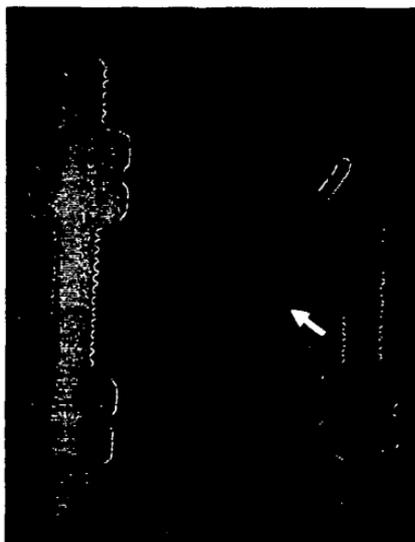


Fig. 9a

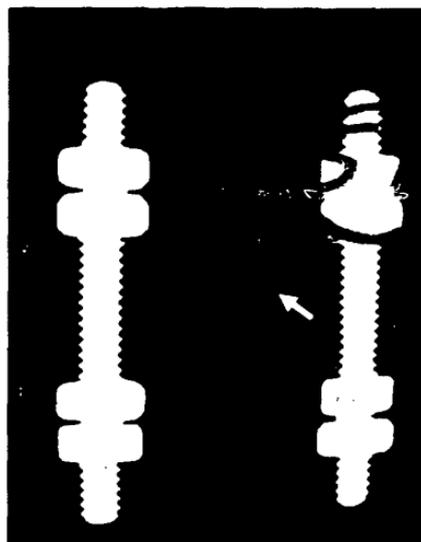


Fig. 9b

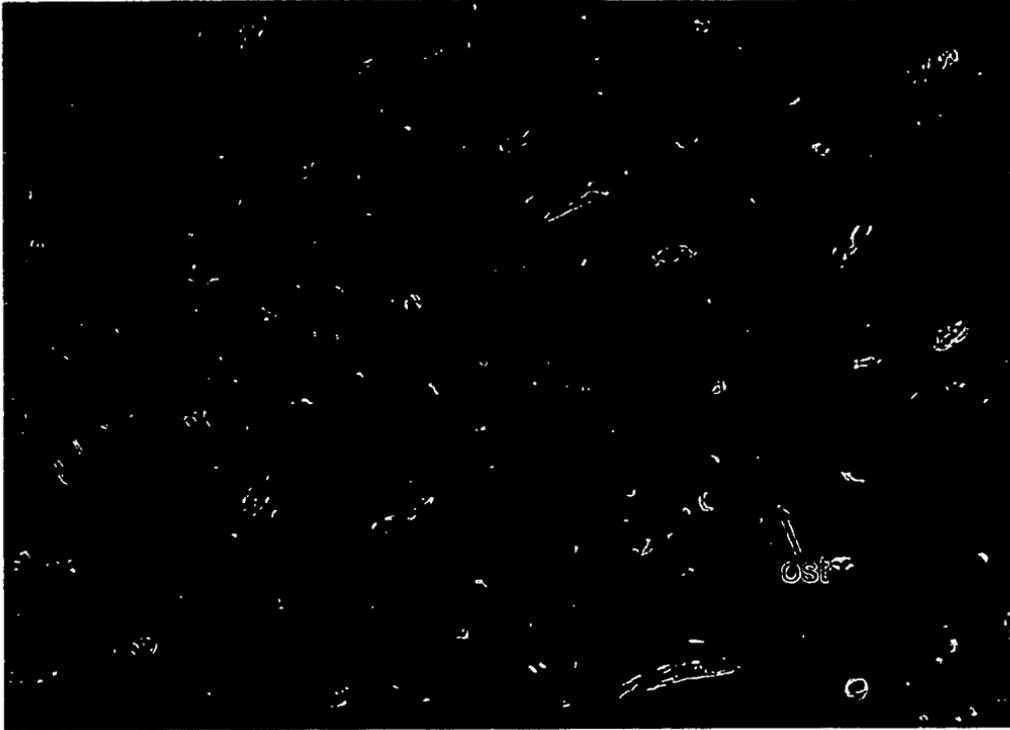


Fig. 10

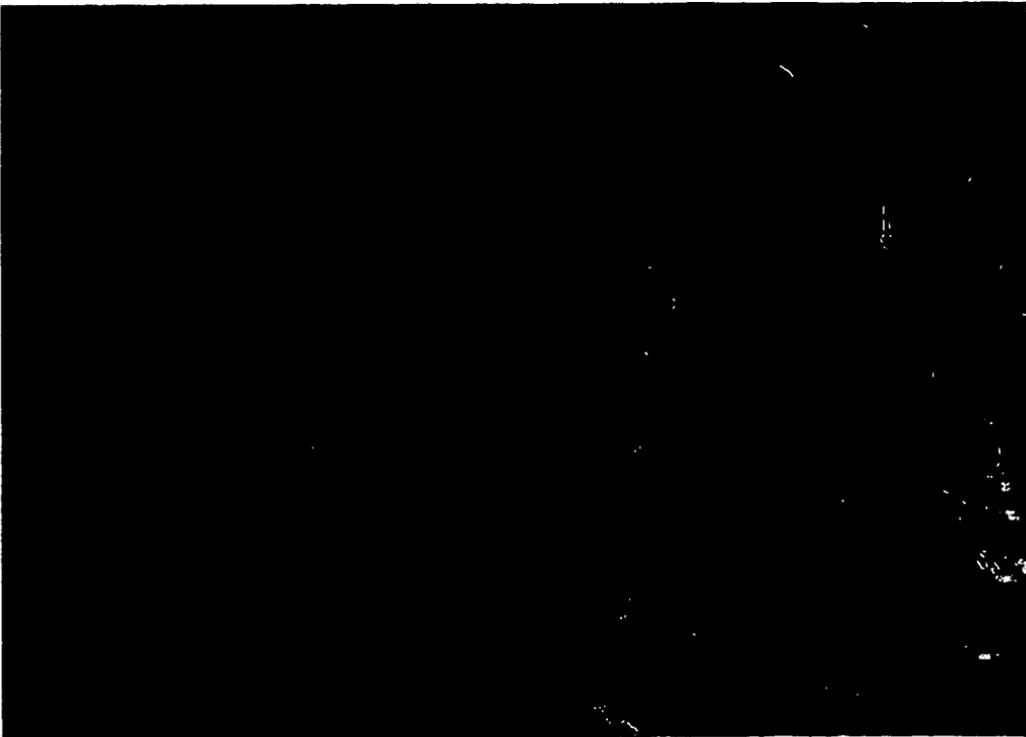


Fig. 11

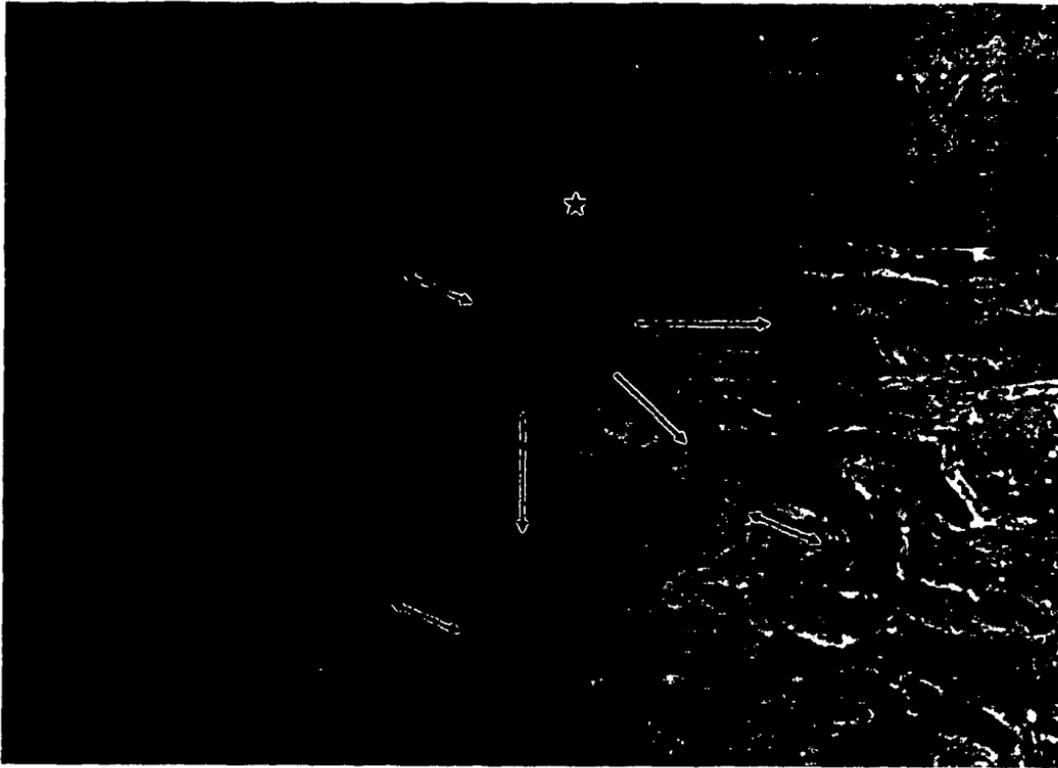


Fig. 12



Fig. 13

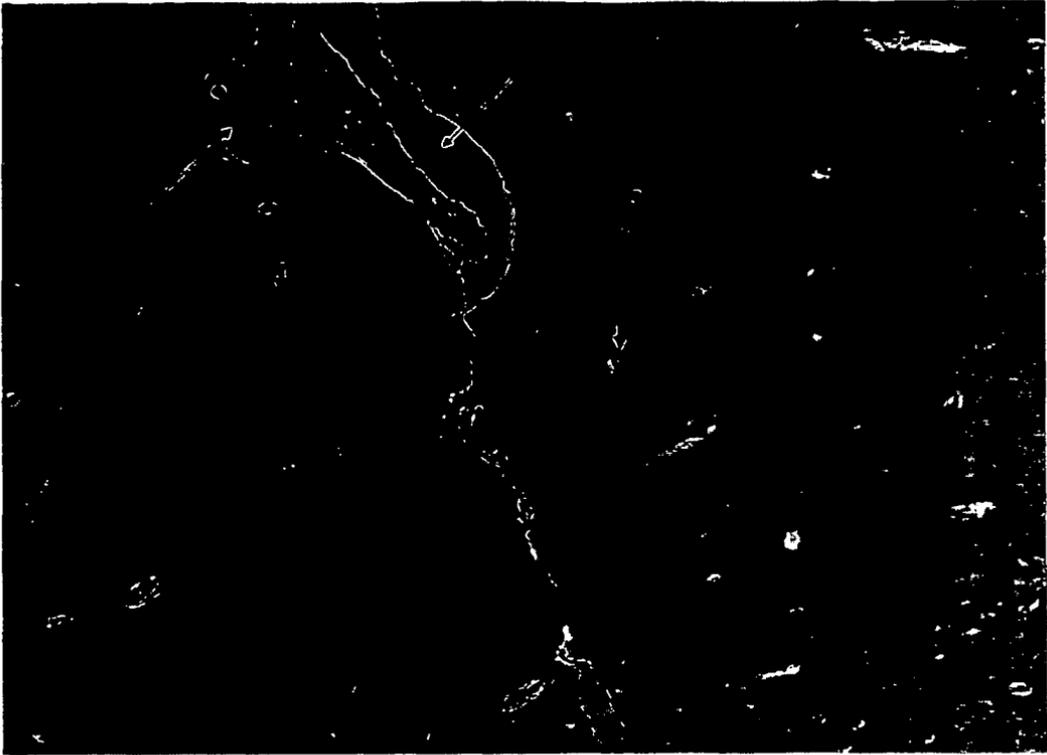


Fig. 14



Fig. 15



Fig. 16

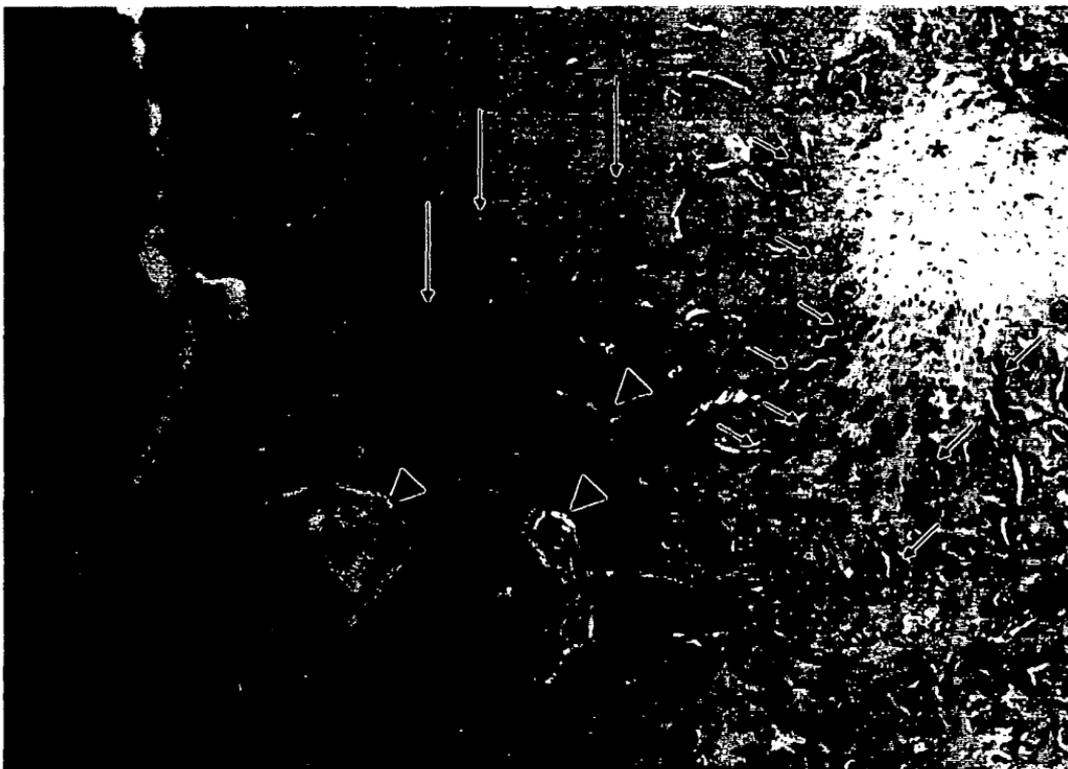


Fig. 17

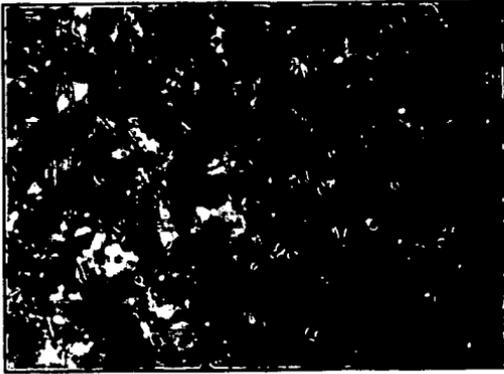


Fig. 18a

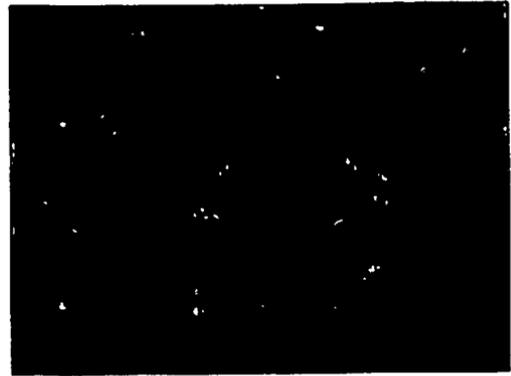


Fig. 18b



Fig. 18c



Fig. 18d



Fig. 18e

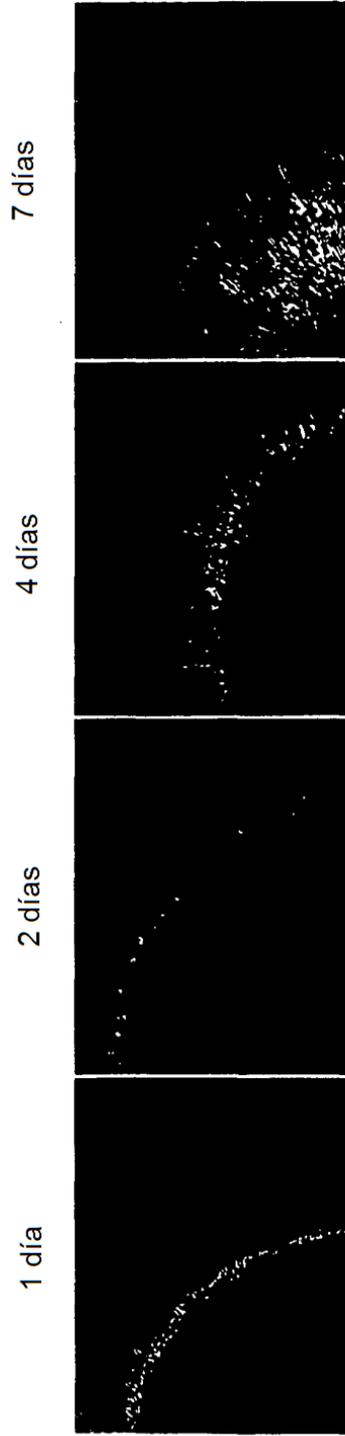


Fig. 19a Fig. 19b Fig. 19c Fig. 19d

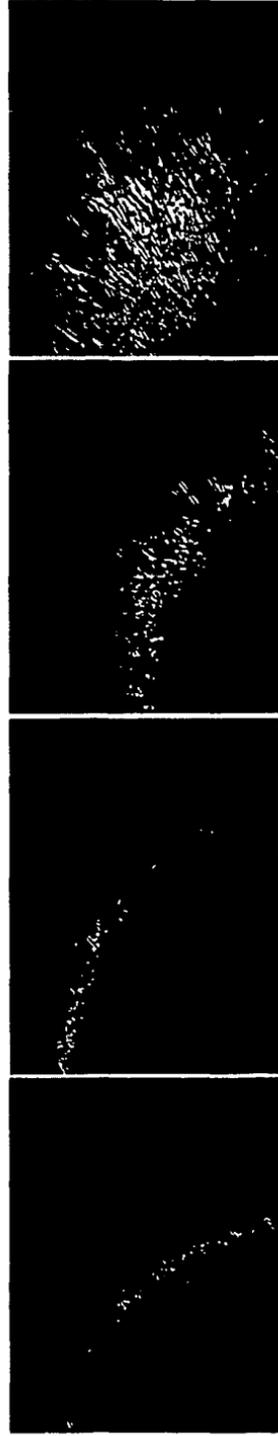


Fig. 19e Fig. 19f Fig. 19g Fig. 19h

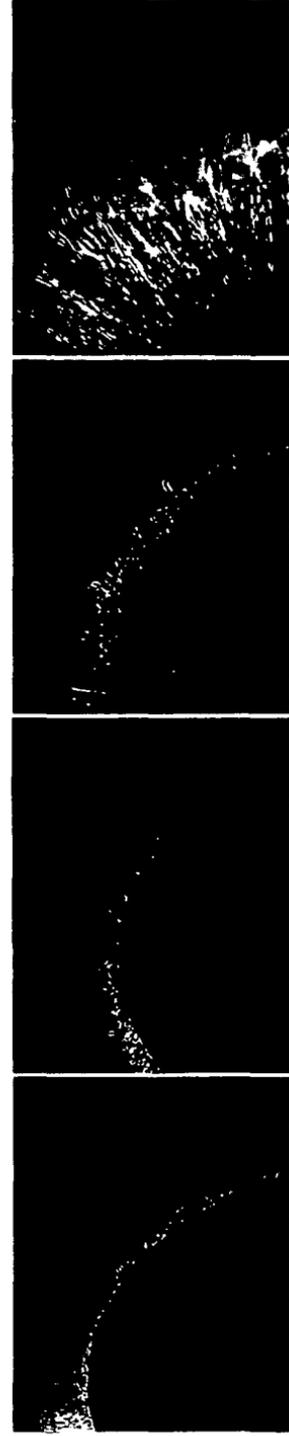


Fig. 19i Fig. 19j Fig. 19k Fig. 19l