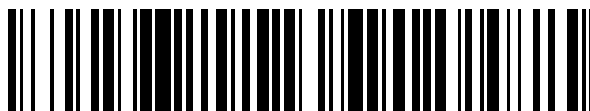


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 731**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2008 E 08784689 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 2164949**

54 Título: **Biomaterial a base de un soporte polimérico hidrófilo**

30 Prioridad:

13.07.2007 DE 102007034580

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

24.09.2013

73 Titular/es:

**NMI NATURWISSENSCHAFTLICHES UND
MEDIZINISCHES INSTITUT AN DER UNIVERSITÄT
TÜBINGEN IN REUTLINGEN STIFTUNG
BÜRGERLICHEN RECHTS (100.0%)
Markwiesenstrasse 55
72770 Reutlingen, DE**

72 Inventor/es:

WURST, HELMUT

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 423 731 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Biomaterial a base de un soporte polimérico hidrófilo

La presente invención se refiere a un biomaterial para el cultivo de células y/o de tejidos formados por células, que se basa en un soporte polimérico que contiene al menos un polímero hidrófilo reticulado.

5 Este tipo de biomateriales se emplea en la tecnología actual como los llamados materiales de liberación de fármacos (Drug-Release), como los implantados, como los matraces que forman tejidos o bien como los materiales para el cultivo de células, y a menudo se conocen también como “hidrogeles”. Estos biomateriales se emplean habitualmente para fines terapéuticos o bien para la investigación biológica, ya que debido a sus propiedades biofísicas y bioquímicas ajustables son realmente unas valiosas herramientas en la medicina regenerativa y en la “Tissue Engineering” así como en el cultivo general de células.

10 Con los biomateriales se puede conseguir, por ejemplo, la reconstitución de la estructura y de la función del tejido dañado o degenerado, cuando se va cargando con células, luego se implantan y seguidamente tiene lugar la morfogénesis de los tejidos, o bien cuando no se cargan con células, se implantan en los lugares en los cuales se fortalece in situ la formación de tejido nuevo por el crecimiento de las células y si fuera preciso por su diferenciación.

15 Tal como se ha mencionado, existe otro sector de aplicación importante, de biomateriales a base de materiales naturales o sintéticos en aplicaciones analíticas del cultivo celular, con ayuda del cual se puede investigar el modo de actuar de los biofactores en las células.

20 En la tecnología actual se conocen distintos biomateriales con diferentes propiedades, basados en materiales naturales o sintéticos, que en general y según el campo de aplicación deseado, se caracterizan por una estabilidad mecánica suficiente, por una elasticidad y por una estabilidad frente a una disgregación y que sobre todo no son tóxicos. Los materiales de origen natural empleados con frecuencia son preparados de colágeno. Esta proteína hidrófila contiene zonas o sectores que reaccionan con las células, como, por ejemplo, señales de adherencia, señales para la disgregación proteolítica del colágeno I o bien para la diferenciación celular. Estas señales y la naturaleza tridimensional del cultivo contribuyen a que las células se comporten de forma más natural en estos geles de colágeno que en el cultivo bidimensional convencional sobre superficies de receptáculos de cultivo.

30 Para poder comprender mejor las vías o los caminos de funcionamiento de estas señales es necesario emplear biomateriales en los cuales se puedan controlar el tipo y la cantidad de grupos de señales, es decir, un biomaterial, que no dañe las células y que inicialmente no lleve ninguna señal y que por lo tanto sea neutro frente a las células y que pueda ser modificado con grupos de señales.

35 En la tecnología actual (ver, por ejemplo, Hersel y cols., *Biomaterials* 24 (2003) 4385-4415; Lutolf y Hubbell, *Nature Biotechnology*, 23 (2005) 47-66) se emplea en general el polietilenglicol como polímero neutro celular (a continuación se abrevia como “PEG”), puesto que no actúa tóxicamente, no está enlazado por células y es hidrófilo. Sin embargo, puesto que el PEG lineal solamente se puede modificar en ambos extremos, y puesto que para la formación de un gel reticulante un compañero de la reacción debe llevar al menos tres grupos reactivos, por un lado se emplean péptidos para la reticulación que llevan al menos tres grupos reactivos, o bien se emplea un PEG ramificado que posee por ejemplo cuatro extremos modificables.

40 Además Nie y colaboradores (Production of heparin-functionalized hydrogels for the development of responsive and controlled growth factor delivery systems”, *Journal of Controlled Release* 122 (2007) 287-296) han publicado un hidrogel tridimensional que se basa en heparina y PEG.

45 Levesque y Shoichit (“Synthesis of Enzyme-Degradable, Peptide-Cross-Linked Dextran Hydrogels”, *Bioconjugate Chem.* 2007.18, 874-885) publican por otro lado un hidrogel a base de dextrano.

50 Finalmente Anseth y cols. describen (“In situ forming degradable networks and their application in tissue engineering and drug delivery”, *Journal of Controlled Release* 78 (2003) 199-209) la fabricación de un hidrogel tridimensional, que se basa en el copolímero de Polilactato-alcohol de polivinilo, que está funcionalizado con grupos acrilato.

55 Los polímeros o hidrogeles conocidos en la tecnología actual tienen, sin embargo, el inconveniente de que la fabricación /obtención de los péptidos empleados para la reticulación es costosa, al igual que la fabricación del PEG ramificado. Además otro inconveniente es que en la fabricación de geles a base de elementos de la reacción con tres o cuatro grupos reactivos por molécula, se debe trabajar muy cuidadosamente, ya que para la formación del gel todos los elementos de la reacción deben encontrarse en la proporción correcta y adecuada.

60 Los equipos conocidos actualmente tienen grandes inconvenientes para el desarrollo de reactivos para el cultivo de células y tejidos.

El cometido de la presente invención consiste pues en disponer de un biomaterial con el cual se pueden vencer los inconvenientes de los biomateriales conocidos actualmente.

5 Este cometido se resuelve preparando un biomaterial que se base en un soporte polimérico, que al menos contenga un polímero hidrófilo reticulado, donde el polímero sea funcionalizado con los grupos maleimida, y se elija a partir del alcohol de polivinilo y de la albúmina sérica o de mezclas de los mismos.

10 El cometido en el que se basa la invención se resuelve de este modo.

Con el biomaterial conforme a la invención se dispone de un polímero que presenta grupos muy modificables y que en comparación con el PEG ramificado se fabrica al mismo tiempo sin grandes costes.

15 Con el biomaterial conforme a la invención se puede disponer de hidrogeles baratos, que por un lado se puedan emplear en el cultivo de células, así como en su análisis en relación a la reacción de los biofactores, o bien que por otro lado incluso en el cultivo de tejidos puede ser que emigren *ex vivo* por colonización con las células e implantación en un tejido que va a ser regenerado, o bien *in situ* por preparación de una matriz a cuyas células pueden emigrar.

20 Además existe la posibilidad de que el biomaterial o el hidrogel se vayan a emplear también como biomaterial "Drug-Release", es decir como material del cual se liberan principios activos *in situ*. Dichas sustancias activas pueden ser, por ejemplo, medicamentos, fármacos o bien sustancias activas naturales o sintéticas, es decir sustancias que ejerzan una determinada acción sobre el tejido o las células que rodean el biomaterial.

25 Por "biomaterial" se entiende aquel material natural y sintético que es adecuado para la fabricación de matrices o geles, que se pueden emplear para el cultivo de células/tejidos *ex vivo* o *in vivo*.

30 Por "funcionalizado" se entiende en cuestión aquel proceso (cerrado) con el cual se dota al polímero de una función – por ejemplo, añadiendo grupos al polímero – que normalmente no posee. El "polímero funcionalizado" de esta forma se conoce como "biomaterial".

35 Por "tejido" se entiende cualquier estructura de células diferenciadas por un igual o bien de modo distinto. En un organismo pluricelular los tejidos pueden cumplir conjuntamente una serie de tareas localizadas y/o constituir el material de construcción específico para los órganos, contrariamente a la simple unión de células individuales no diferenciadas o bien solamente diferenciadas temporalmente.

40 Con el "cultivo de células o tejidos" se hace referencia a aquella aplicación en la cual las células se pueden aplicar o bien emigrar al biomaterial con el objetivo de multiplicar o bien diferenciar o bien sintetizar componentes celulares y extracelulares y en caso de necesidad formar un tejido.

45 El biomaterial es pues neutro desde el punto de vista celular, lo que por un lado significa que el biomaterial se comporta de forma neutra frente a las células, y por tanto no ejerce ninguna influencia sobre las células, o no desencadena ninguna reacción en las células. Las células no se unen al polímero con estos materiales, sino que esto ocurre únicamente tras una modificación del polímero con los grupos correspondientes.

50 El biomaterial así dispuesto puede luego según la aplicación y el objetivo ser modificado con biofactores. Las células pueden introducirse en el biomaterial, interactuar con los biofactores acoplados a ellas y seguidamente ser analizadas. De ese modo es posible el estudio definido de los correspondientes biofactores o de su acción sobre las células.

55 Con los biomateriales conocidos hasta el momento, es decir a base de colágeno, esto no habría sido posible ya que éstos reaccionan de por sí con las células y pueden desencadenar reacciones celulares, lo que imposibilita un estudio determinado de los biofactores o de sus mecanismos de actuación sobre las células.

60 Las sustancias empleadas para la funcionalización del polímero son los grupos maleimida en el caso del biomaterial conforme a la invención. Sobre estos grupos se podrían aplicar si fuera preciso biofactores, a los cuales se puedan unir células. El polímero se combina con las células y a través de un reticulante se transforma en una estructura hidrófila tridimensional. Por otro lado, se pueden introducir células incluso para un mero cultivo, incluso sin biofactores en el biomaterial, de manera que las células se añadan directamente al polímero funcionalizado, de tal forma que éste sea reticulado seguidamente en presencia de las células.

En los ensayos descritos se ha podido demostrar la adhesión de las células a los componentes del gel y el cultivo de las células en el gel, así como la modificación del biomaterial con los péptidos.

En el biomaterial conforme a la invención el polímero se elige del alcohol de polivinilo (PVA), de la albúmina de suero (por ejemplo del bovino) o de mezclas de los mismos.

5 Con el alcohol de polivinilo funcionalizado y la albúmina de suero bovino funcionalizada se han podido mostrar ensayos exitosos para el acoplamiento de péptidos al polímero, así como para el cultivo de células en el biomaterial.

10 El empleo de los mencionados polímeros hidrófilos, neutros desde el punto de vista celular, funcionalizados para el cultivo de células y/o tejidos en la tecnología actual se desconoce. Así que si para la fabricación de anticuerpos se emplea una albúmina de suero bovino funcionalizada con maleimida para el acoplamiento de los péptidos a la BSA, en general no se propondría ni sería necesario su empleo para el cultivo de células y/o tejidos.

15 Además en la tecnología actual se conoce el empleo de alcohol de polivinilo funcionalizado con maleimida (ver Manecke y Vogt. Biochimie 62(1980)603-613) únicamente para la inmovilización de enzimas, sin que exista ninguna referencia a un empleo para el cultivo de células/tejidos.

20 El que los polímeros funcionalizados con maleimida o bien los polímeros funcionalizados con otros grupos mencionados, sean adecuados para un empleo como biomateriales para el cultivo de células y/o tejidos, ha sido algo inesperado y que no se ha propuesto. Los ensayos en los que se basa la invención demuestran por primera vez que con los biomateriales conforme a la invención se dispone de una herramienta eficiente para el cultivo de células/tejidos, que ofrece unas propiedades importantes incluso para la investigación de los biofactores o bien para su reacción con las células.

25 Por lo tanto en otras configuraciones es preferible que el biomaterial presente al menos un biofactor, y en particular que el biofactor tenga al menos un grupo tiol, a través del cual el biofactor forme un enlace covalente con los grupos maleimida del polímero.

30 “Biofactor” debe equivaler a aquella sustancia natural o sintética que puede tener una influencia en las células o que puede influir en las reacciones sobre o en las células. Esta influencia se puede limitar a determinadas células y determinadas condiciones, sin que la sustancia pierda su importancia como “biofactor”. La calidad química de las sustancias conocidas como “biofactores” no se limita pues a una clase de compuestos determinada, sino que más bien puede incluir cualquier sustancia natural y sintética que por su naturaleza y/o en forma modificada ejerza alguna acción sobre las células biológicas.

35 Por “grupos de señales” se deben entender aquella parte de un biofactor sobre la cual se desencadena una reacción de células de los biofactores.

40 Por “células” se entiende el conjunto de células que pueden ser cultivadas con el presente biomaterial, e incluye en particular las células eucarióticas, especialmente las células de mamíferos como las células de animales y de seres humanos.

45 En particular el biofactor se elige preferiblemente de los péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, sustancias activas orgánicas, principios activos que inducen la apoptosis, sustancias activas que promueven la adherencia, sustancias activas que inhiben el crecimiento, sustancias activas antiinflamatorias, agonistas y antagonistas receptores, o mezclas de los mismos.

Esta configuración tiene la ventaja de que se pueden elegir distintos factores cuya acción sobre las células es conocida, pero cuya acción específica en el entorno tridimensional del cultivo se encuentra todavía por descubrir.

50 En particular se prefiere que el biofactor se elija de: Proteínas de matriz extracelular, proteínas de superficie celular, anticuerpos, factores de crecimiento, azúcar, lectinas, hidratos de carbono, citoquinas, ADN, ARN, siRNA, aptámeros, así como fragmentos relevantes en el enlace o en la reacción, o bien mezclas de los mismos.

55 La matriz extracelular (matriz extracelular, sustancia intercelular, MEC) es la parte del tejido, la parte de las células en el espacio intercelular, es decir el conjunto de materiales extracelulares que forma parte de un tejido. La MEC equivale por tanto a la totalidad de las macromoléculas que se encuentra fuera de la membrana plasmática de las células en tejidos y órganos. La matriz extracelular consta en su mayor parte de distintas proteínas, en particular colágeno, y glucoproteínas, en particular laminina, vitronectina, fibronectina o bien determinados polisacáridos, los glucosaminoglicanos.

60 Por “fragmentos relevantes en el enlace y la acción” se entiende partes/segmentos de los biofactores mencionados, de manera que aunque no se emplee el biofactor completo, siempre se considere que ejercen la misma /casi misma o al menos similar reacción o efecto sobre las células que el factor completo. Por reacción se puede entender el mero o simple enlace de las células, pero también la reacción posterior a un enlace en una célula del enlace, como por ejemplo, el desencadenamiento de determinadas vías de reacción en las células, que pueden conducir a una

producción /vertido de determinadas sustancias a través de las células, o bien a una diferenciación o transformación de las células.

5 En este contexto es preferible que el péptido presente una secuencia, que se elija de la SEQ ID Nr.1 (Péptido "HW1"), SEQ ID Nr.2 (Péptido "HW2") o bien SEQ ID nr. 9(péptido "HW9") del protocolo de secuencias. La secuencia de aminoácidos 6-11 en HW9 es una secuencia de adhesión de la fibronectina humana, que también se encuentra en otros organismos. Las secuencias flanqueantes no son de origen natural.

10 La invención se refiere además a un método para fabricar un biomaterial para aplicaciones en cultivos de células/tejidos, que presenta las etapas siguientes:

- a) Preparar un polímero hidrófilo, que se elige del alcohol de polivinilo o de la albúmina de suero, o bien de mezclas de los mismos,
- b) Funcionalizar el polímero de la etapa a) con maleimida y
- 15 c) Añadir un reticulante para reticular el polímero modificado en la etapa b)

20 El método conforme a la invención tiene la ventaja de que se pueden fabricar los biomateriales de forma económica, las células por el contrario son neutras desde el punto de vista celular, y con el mismo se dispone de una herramienta simple y fiable con ayuda de la cual se pueden analizar o cultivar las células.

En particular en el método conforme a la invención es preferible que exista además una etapa a)':
a)'Aminación del polímero

25 Este método se emplea especialmente para fabricar PVA, alcohol de polivinilo, funcionalizado con maleimida, mientras que por ejemplo la BSA, albúmina sérica bovina no debe ser aminada antes de la funcionalización.

Además es preferible que el método presente junto a la etapa b) una etapa b)':
b)' Adición de e incubación con biofactores y/o células, en particular células mamíferas.

30 En esta configuración se añadirán preferiblemente o bien inicialmente biofactores y seguidamente células al polímero funcionalizado, donde los biofactores podrán formar un enlace covalente con los grupos funcionales, y las células con los biofactores. Por otro lado existe la posibilidad de que las células se añadan al polímero sin biofactores formando un enlace covalente, de manera que un biomaterial únicamente sirva para el cultivo de células, sin realizar una investigación de las reacciones de los biofactores sobre las células.

35 En el método conforme a la invención el polímero se elige del alcohol de polivinilo y de la albúmina de suero, en particular de la albúmina de suero bovino o de mezclas de los mismos.

40 Estas configuraciones tienen la ventaja de que se pueden relacionar con las sustancias que en cierto modo se comportan de forma neutra frente a las células.

45 Además en una configuración del método conforme a la invención es preferible que el biofactor se elija de los péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, sustancias orgánicas, sustancias activas que inducen la apoptosis, sustancias activas que promueven la adherencia, sustancias activas que inhiben el crecimiento, sustancias activas antiinflamatorias, agonistas y antagonistas receptores y en particular de proteínas de matriz extracelular, de proteínas de la superficie celular, anticuerpos, factores de crecimiento, azúcares, lectinas, hidratos de carbono, citoquinas, ADN, ARN, siRNA, aptámeros, así como fragmentos relevantes en el enlace o en la reacción, o bien mezclas de los mismos.

50 A la hora de perfeccionar el método conforme a la invención es preferible que el reticulante en la etapa c) se elija del Ditio-PEG o bien del dextrano modificado por SH.

55 En los ensayos en los que se basa la invención se ha podido observar con éxito el empleo de este reticulante. Además es una ventaja que ambas sustancias se hayan descrito de forma suficiente y no hayan dado lugar a reacciones secundarias inesperadas.

En el método conforme a la invención es preferible que el biomaterial conforme a la invención se fabrique tal como se ha descrito.

60 Se describe en la presente también el empleo de maleimida para la funcionalización de polímeros hidrófilos para la fabricación de un biomaterial para aplicaciones en cultivos celulares, y en particular la utilización de maleimida para la fabricación de un biomaterial conforme a la invención anteriormente descrito.

Se entiende que para una investigación y un análisis exacto y preciso de las células, se debería desear que el

biomaterial pudiera ser descompuesto por las correspondientes sustancias adecuadas. La sustancia que se va a emplear depende del reticulante empleado y/o del polímero, de manera que, por ejemplo, se pueden emplear para la disgregación dextrano como reticulante o bien dextranasas como polímero.

5 Otras ventajas se deducen de la descripción y de los dibujos añadidos.

Se entiende que las características ya mencionadas y que se mencionarán son útiles no solo en las combinaciones indicadas sino también en otras combinaciones o en posiciones aisladas sin abandonar el marco de la presente invención.

10 Ejemplos de ejecución de la invención se han mostrado en las figuras y se aclaran en las siguientes descripciones:

Figura 1 Los resultados de los ensayos de adherencia de las células 3T3 a distintos componentes de gel;
 Figura 2a,b Tomas de Microscopía confocal Láser de quistes MDCK después de 15 días en gel de PVA; y
 15 Figura 3 Los resultados del cultivo de las células madre mesenquimales en geles de PVA y BSA (coloración con calceína/ioduro de propidio)

Ejemplo 1: Fabricación de BSA funcionalizada con maleimida

20 Se han disuelto 250 mg de BSA (Sigma-Aldrich, nr. Cat. A7030) en 5 ml de Borato sódico 1M (pH 8,2) A esta solución se han añadido 6 mg de N-Maleoil-β-alanina (Sigma-Aldrich, nr. Cat. 63285) y la solución se ha incubado a temperatura ambiente durante 2 horas. Después se han disuelto 130 mg de N-hidroxisuccinimida en 730 μl de acetonitrilo. Luego se han disuelto 96 mg de N-maleoil-β-alanina en 570 μl de solución de N-hidroxisuccinimida. A esta solución se han añadido 80 μl de acetonitrilo y 80 μl de diisopropilcarbodiimida. Al cabo de unos 5 minutos de
 25 incubación a temperatura ambiente se ha centrifugado el conjunto 5 minutos. El sobrenadante se ha añadido gota a gota a la solución de BSA agitando constantemente. Tras un periodo de incubación de 45 minutos a temperatura ambiente se ha dializado el conjunto cuatro veces frente a 500 ml de PBS sobre hielo y seguidamente se ha concentrado por ultrafiltración a un volumen de 4 ml.

30 **Ejemplo 2:** Fabricación de PVA funcionalizado con maleimida

Se han disuelto 120 mg de carbonildiimidazol en 3 ml de PVA al 4% (p/v) en DMSO (Sigma-Aldrich, nr. Cat. P8136) y se ha incubado la mezcla durante 3 horas a temperatura ambiente. Esta solución se ha añadido gota a gota a 420 μl de etilendiamina agitando y se ha seguido agitando durante 2 días a temperatura ambiente en un recipiente
 35 cerrado. El PVA aminado se precipita por la adición de 30 ml de etanol/éter dietílico (1:5) y se forman gránulos por centrifugación. El sedimento se disuelve en 3 ml de PBS y se lleva a pH 6 mediante la adición de HCl 2,5 M. Luego se dializa la solución tres veces frente a 1 litro de carbonato sódico 100 mM (pH 8,2) Para la funcionalización del PVA aminado se han disuelto de entrada 75 mg de N-Maleoil-β-alanina en 1029 μl de N-hidroxisuccinimida 1M en acetonitrilo y se ha activado la mezcla mediante la adición de 125 μl de diisopropilcarbodiimida. Después de 10
 40 minutos a temperatura ambiente la mezcla se centrifugaba durante 5 minutos y el sobrenadante se añadía gota a gota a la solución de amina-PVA agitando constantemente. Tras 1 hora a temperatura ambiente la mezcla se centrifugaba 10 minutos a 3000 rpm y el sobrenadante se dializaba tres veces frente a 600 ml de PBS. Luego la mezcla se concentraba a 3,5 ml por ultrafiltración.

45 En lugar de PVA el dextrano se funcionaliza mediante grupos de maleimida o tiol. Para la fabricación del dextrano tiolfuncionalizado se disuelven, por ejemplo, 1 g de dextrano (Serva-, nr. Cat. 18690) en 10 ml de sulfóxido de dimetilo anhidro. En esta solución se han disuelto además 100 mg de carbonildiimidazol. Al cabo de 2 horas de incubación a temperatura ambiente se han añadido 1,12 g de cistamina x 2 HCl y 1,5 ml de piridina. Para la disolución completa de la diamina se coloca la mezcla unos minutos en un baño de ultrasonidos. Tras una
 50 incubación de dos días, la mezcla se dializa tres veces frente a 1 litro de H₂O (membrana de celulosa regenerada, MWCO 3000). Durante la diálisis, el contenido de acidez se ajusta a pH 6 mediante la adición de HCl. A continuación se disuelven en el dializado 347 mg de ditiotreitól. El dextrano modificado se separa inmediatamente de los componentes de bajo peso molecular por cromatografía de filtración en gel con Sephadex G25 (HiPrep™ 26/10 Desalting Column(GE Healthcare/Life Sciences) con fosfato sódico 5 mM (pH 5) y una velocidad de flujo de 10
 55 ml/min. Las fracciones contenidas de dextrano se han purificado (36 ml) y seguidamente por diálisis inicialmente frente a HCl 1 mM y seguidamente frente a 1 litro de HCl 0,5 mM se han purificado de nuevo bajo una atmósfera de nitrógeno. Para finalizar se ha concentrado la mezcla mediante liofilización a 9 ml y por centrifugación se ha separado del material no disuelto.

60 **Ejemplo 3:** Acoplamiento de péptidos y formación de gel

Enlace de péptidos a maleimida-BSA: 10 μl de maleimida-BSA se han incubado con distintas cantidades de péptido HW1 (acetil-KGLQGCGGLQGK-OH; SEQ ID Nr.1) o bien HW2 (acetil-KGGLQGCGK-OH; SEQ ID Nr.2) a temperatura ambiente durante al menos 10 minutos en un volumen de 12 μl. Luego se ha separado el péptido libre del acoplado mediante cromatografía de filtración en gel y se ha determinado el perfil de elución midiendo la absorción a 214 nm.

Para la determinación del montaje se han integrado los cromatogramas. Para HW1 se ha medido un montaje del 93% en maleimida-BSA y para el HW2 del 10%. Por el contrario no se ha detectado acoplamiento de HW1 a BSA no modificado.

Enlace de péptidos a maleimida-PVA: 4 µl de maleimida-PVA o 2 µl de PVA del 4% se han incubado con 100 nmol de péptido HW1 (acetil-KGLQGCLQGK-OH; SEQ ID Nr.1) o bien HW2 (acetil-KGGLQGK-OH; SEQ ID Nr.2) a temperatura ambiente durante al menos 10 minutos en un volumen de 16 µl. Luego se han separado 20 µl de una dilución 1:4 mediante cromatografía de filtración en gel y se ha determinado el perfil de elución midiendo la absorción a 214 nm. Para la determinación del montaje se han integrado los cromatogramas. La tabla 1 muestra la proporción relativa de péptido no enlazado:

Tabla 1: Montaje de péptidos

Mal-PVA	✓		✓			✓
PVA				✓		
HW1		✓	✓	✓		
HW2					✓	✓
Péptido libre(%)	n/a	100	12	96	100	107

Formación de gel:

Ambos materiales se podían formar mediante la adición de un reticulante con dos grupos tiol a los geles. La tabla 2 muestra las cantidades típicas que son adecuadas para la formación del gel en distintas intensidades.

Tabla 2: Formación de gel

Maleimida-BSA(µl)	308	167	178			
Maleimida-PVA (µl)				308	168	100
PBS (µl)	0	167	178	0	168	300
100 mg/ml Dithio-PEG(3 kDa)(µl)	92	66	54	92	64	50

Ejemplo 4: Adherencia de las células 3T3 a los componentes del gel

Sobre un portaobjetos de vidrio recubierto de nitrocelulosa (NMI Technologietransfer GmbH, Reutlingen) se han aplicado respectivamente componentes de 1 µl en un tampón (0,5% Trehalosa, 1 µg/ml conjugado de BSA-tetrametilrodamina (Invitrogen, Carlsbad, CA; nr. Cat. A-23016) en PBS (fosfato sódico 20 mM (pH 7,2), NaCl 150 mM). Los portaobjetos se guardaban durante la noche a temperatura ambiente y al día siguiente se pulverizaban con solución bloqueante (Stabilguard, SurModics, Eden Prairie, MN) para bloquear los frascos entre los componentes. Luego se lavaban los portas dos veces con PBS y se agitaban con una suspensión celular (10⁵ células 3T3 por ml) durante 2 horas. Luego se separaba la suspensión celular, se trataban los portas con solución de color Comassie y se fotografiaban.

En la figura 1 se muestran los resultados de la adherencia de las células 2T3 a los componentes del gel, donde en A se han empleado 200 µg/ml de fibronectina, en B una solución de maleimida-PVA diluida 1:5, en C 1 µl de una solución que consta de 2 µl de maleimida-PVA, 0,5 µl de HW9 (FITC-β-Ala-GCGYGRGDSPGSGC; SEQ ID nr. 3 con grupo de fluoresceína antes de la β-alanina; 50 mM), 7,5 µl de PBS, en D 20 mg/ml de Di-Thio-PEG (3 kDa; Rapp-Polymere Tübingen; nr. Cat. 11 3000-40), en E maleimida-BSA diluida 1:10, y en F 1 µl de una solución que consta de 2 µl de maleimida-BSA, 0,38 µl de HW9 (FITC-β-Ala-GCGYGRGDSPGSGC; SEQ ID nr. 3 con grupo de fluoresceína antes de la β-alanina; 50 mM), 7,62 µl de PBS.

Ejemplo 5: Cultivo de células MDCK en gel de PVA

Células de MDCK (una línea celular epitelial de los riñones de perro) se disponían en geles de PVA en una densidad de 1 Mio de células/ml. (Composición del gel: Maleimida-PVA: 10 µl, PBS: 6 µl; células MDCK: 10⁴ células en 10 µl de PBS, reticulante (dithio-PEG, 3 kDa; 100 mg/ml): 4 µl). El volumen total de cada gel era de 30 µl, donde se habían colocado previamente los 4 µl de reticulante en el recipiente del cultivo celular (Nalge Nunc Int., LAB-TEK II, Chambered Coverglass-Borosilicate). Justo tras la preparación de la mezcla de gel restante que todavía contenía las células, se añadía el reticulante pipeteando tres veces con los componentes del gel. En el intervalo de unos 10 segundos se formaba un gel. El gel se recubría de 400 µl de medio de cultivo (DMEM high Glucose, 4 mM glutamin, 1% penicillin/Streptomycin y 10% suero vacuno fetal) y se incubaba en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ y 37°C. Transcurridos 7 y 15 días de cultivo de las células en el gel de PVA se realizaba una tinción de actina (TRITC-Phalloidin (0,3 µg/ml), Sigma) y la coloración del núcleo (Syto Green (167 nM), Molecular Probes) para la representación de las células MDCK.

En las figuras 2a y 2b se muestran las tomas de Microscopía confocal láser de los quistes de MDCK después de 15 días en gel de PVA. En los quistes de MDCK visualizados en la figura 2 la marca de fluorescencia del citoesqueleto de actina permite vislumbrar una polaridad de las células con zona apical en la dirección de la luz y de la zona basolateral en la dirección de la matriz de PVA. En la figura 2a se muestra el corte óptico a través de un quiste MDCK en el gel de PVA para la representación de la luz (microscopía confocal láser): A: coloración del núcleo con Syto Green, B: tinción de actina con TRITC-Phalloidin. En la figura 2b, se visualiza el corte óptico en la zona exterior a través de un quiste MDCK en el gel e PVA, donde la luz no es visible; A: tinción del núcleo con Syto Green. B: tinción de actina con TRITC-Phalloidin. C: toma de contraste de fases. D: Superposición de A, B y C.

10 **Ejemplo 6:** Cultivo de células madre mesenquimales en geles de PVA y BSA

Cultivo 2D de células: Las células madre mesenquimales humanas se han cultivado con métodos estándar en frascos de cultivo de tejido (frascos T75, Greiner), se han disuelto por la superficie mediante solución de tripsina, se han formado gránulos, se han extraído en un medio de MSC y se han contado.

15 Cultivo 3D: Para la incrustación de células en geles de BSA se han colocado 21,6 µl de maleimida-BSA y 19 µl de suspensión celular (50000 células) en una cavidad de una placa de microvaloración y se han reticulado mediante la adición de 9,4 µl de solución reticulante (100 mg/ml Dithio-PEG, 3000 Da). Para la incrustación en PVA se han colocado 15,1 µl de maleimida-PVA y 28,7 µl de suspensión celular (50000 células) en una cavidad de una placa de microvaloración y se han reticulado mediante la adición de 6,2 µl de solución reticulante. Al cabo de unos 5 minutos los preparados de gel se revestían de 250 µl de un medio y se cultivaban durante 6 días a 37°C. Se realizaba una tinción con calceína-ioduro de propidio y los geles se fotografiaban en un microscopio de fluorescencia. Con ello se demostraba que en ambos geles el porcentaje destacado de células (>95%) todavía estaba vivo después de una incubación de 6 días.

25 En la figura 3 se muestran los resultados de la tinción con calceína/ioduro de propidio de las células madre mesenquimales tras un cultivo 3D de 6 días de duración: A: células en gel de BSA; B: células en gel de PVA.

30 **Ejemplo 7:** Ejemplos de cultivos celulares en geles de BSA y PVA

Se han cultivado con éxito varios preparados celulares primarios así como líneas celulares en geles de PVA y GSA. La tabla 3 muestra un resumen de estos ensayos.

35 **Tabla 3: Cultivo celular 3D con distintos tipos de células**

Tipo de célula	Tipo de gel	Duración del cultivo (días)	Ensayos	Resultados
Condrocitos humanos de cartilago osteoartrítico	PVA	16	Calceína, ioduro de propidio	>80% sobreviven
Condrocitos humanos de cartilago osteoartrítico	BSA	16	Calceína, ioduro de propidio	>90% sobreviven
Ratón Línea celular MC3T3	PVA	3	Calceína, ioduro de propidio	>80% sobreviven
Ratón Línea celular MC3T3	BSA	3	Calceína, ioduro de propidio	>70% sobreviven
Células madre mesenquimales humanas	PVA	6	Calceína, ioduro de propidio	>95% sobreviven
Células madre mesenquimales humanas	BSA	6	Calceína, ioduro de propidio	>95% sobreviven
MDCK	BSA	6	Contraste de fases – Microscopía	Formación de quistes
NIH 3T3	PVA	17	Calceína, ioduro de propidio	>5% sobreviven, formación de agregados (tamaño hasta 60 µm)
MDCK	PVA	17	Calceína, ioduro de propidio	>50% sobreviven, formación de quistes (tamaño hasta 100 µm)

MDCK	PVA	7 y 15	Representación de la polaridad de los quistes por tinción con actina	Zonas apicales y basolaterales representables. En los quistes investigados se han hallado ambas polaridades: apical tanto en dirección de la luz como en dirección de la matriz
------	-----	--------	--	---

De los resultados antes mencionados con los biomateriales analizados se demuestra que tanto los polímeros empleados como los péptidos empleados son ejemplos claros de los biomateriales conforme a la invención

PROTOCOLO DE LA SECUENCIA

- 5 <110> NMI Universidad de Tübingen, Facultad de Medicina y Ciencias Naturales
<120> Biomaterial a base de un soporte polimérico hidrófilo
<130> 3605P139
<160> 3
<170> Patente versión 3.1
- 10 <210> 1<211>11<212>PRT<213> Secuencia artificial
<220>
<223> péptidos sintetizados
<220>
<221> MOD_RES<222>(1)..(1)<223> ACETILACIÓN
15 <400> 1
- Lys Gly Leu Gln Gly Cys Gly Leu Gln Gly Lys
1 5 10
- 20 <210> 2<211>8<212>PRT<213> Secuencia artificial
<220>
<223> péptidos sintetizados
<220><221> MOD_RES<222>(1)..(1)<223> ACETILACIÓN
25 <400> 2
- Lys Gly Gly Leu Gln Gly Gly Lys
1 5
- 30 <210> 3<211>15<212>PRT<213> Secuencia artificial
<220>
<223> péptidos sintetizados
<220><221> MOD_RES<222>(1)..(1)<223> bAla
35 <400> 3
- Ala Gly Cys Gly Tyr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly Ser Gly Cys
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un biomaterial como un hidrogel tridimensional para el cultivo de las células o tejidos, donde el biomaterial está basado en un soporte polimérico, que contiene al menos un polímero hidrófilo reticulable, que se caracteriza por que el polímero se funcionaliza con grupos maleimida, y por que el polímero se elige entre el alcohol de polivinilo y la albúmina de suero o bien mezclas de los mismos, y donde el polímero funcionalizado es reticulado por la adición de un agente reticulante.
- 10 2. Uso conforme a la reivindicación 1, que se caracteriza por, que el polímero es reticulado en presencia de las células.
3. Uso conforme a la reivindicación 1 ó 2, que se caracteriza por, que al menos presenta un biofactor.
- 15 4. Uso conforme a la reivindicación 3, que se caracteriza por, que el biofactor presenta al menos un grupo tiol, a través del cual los biofactores están unidos a los grupos maleimida del polímero.
- 20 5. Uso conforme a una de las reivindicaciones 3 ó 4, que se caracteriza por, que el biofactor se elige de los péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, sustancias activas orgánicas, sustancias activas que inducen la apoptosis, sustancias activas que promueven la adherencia, sustancias activas que inhiben el crecimiento, sustancias activas antiinflamatorias, agonistas y antagonistas receptores.
- 25 6. Uso conforme a la reivindicación 5, que se caracteriza por, que el biofactor se elige de las proteínas de la matriz extracelular, de las proteínas de la superficie celular, de los factores de crecimiento, de los azúcares, lectinas, hidratos de carbono, citoquinas, ADN, ARN, siRNA, aptámeros, así como fragmentos relevantes en el enlace o en la reacción, o bien mezclas de los mismos.
- 30 7. Uso conforme a al menos una de las reivindicaciones 3 hasta 6, que se caracteriza por, que el polímero es reticulable a través de las células enlazadas a los biofactores.
8. Uso conforme a al menos una de las reivindicaciones 2 a 7, que se caracteriza por, que las células son células de mamíferos.
- 35 9. Hidrogel tridimensional para el cultivo de células o tejidos, de manera que el hidrogel se basa en un soporte polimérico, que al menos contiene un polímero hidrófilo reticulable, que se caracteriza por que el polímero se funcionaliza con grupos maleimida y se elige del alcohol de polivinilo y de la albúmina de suero o bien de mezclas de ambos, y mediante la adición de un reticulante.
- 40 10. Procedimiento para la fabricación de un biomaterial como hidrogel para aplicaciones tridimensionales en cultivos celulares, que presenta las etapas siguientes:
- 45 a) Preparación de un polímero hidrófilo, que se elige de la albúmina de suero y del alcohol de polivinilo, o bien de mezclas de los mismos
 b) Funcionalizar el polímero de la etapa a) con maleimida, y
 c) Añadir un reticulante para reticular el polímero funcionalizado en la etapa b)
- 50 11. Procedimiento conforme a la reivindicación 10, que se caracteriza por que además presenta la etapa a') :
 a') Aminación del polímero
12. Procedimiento conforme a la reivindicación 10 ó 11, que se caracteriza por, que además presenta la etapa b'):
 b') Añadir e incubar con biofactores y/o células, en particular células mamíferas.
- 55 13. Procedimiento conforme a la reivindicación 12, que se caracteriza por, que el biofactor se elige de los péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, sustancias activas orgánicas, sustancias activas inductoras de la apoptosis, sustancia activas que promueven la adherencia, sustancias activas que inhiben el crecimiento, sustancias activas antiinflamatorias, agonistas y antagonistas receptoras, y en particular de las proteínas de matriz extracelular, proteínas de superficie celular, anticuerpos, factores de crecimiento, azúcares, lectinas, hidratos de carbono, citoquinas, ADN, ARN, ARN de silenciamiento, aptámeros así como fragmentos o mezclas relevantes tanto en el enlace como en el efecto.
- 60 14. Procedimiento conforme a la reivindicación 13, que se caracteriza por, que el biofactor se elige de las proteínas de la matriz extracelular, de los factores de crecimiento, de los fragmentos o mezclas de los mismos relevantes en el enlace y en el efecto.

15. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 10 hasta 14, que se caracteriza por, que el reticulante se elige en la etapa c) del PEG tiofuncionalizado.
- 5
16. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 10 hasta 15, que se caracteriza por, que se fabrica un hidrogel conforme a la reivindicación 9.

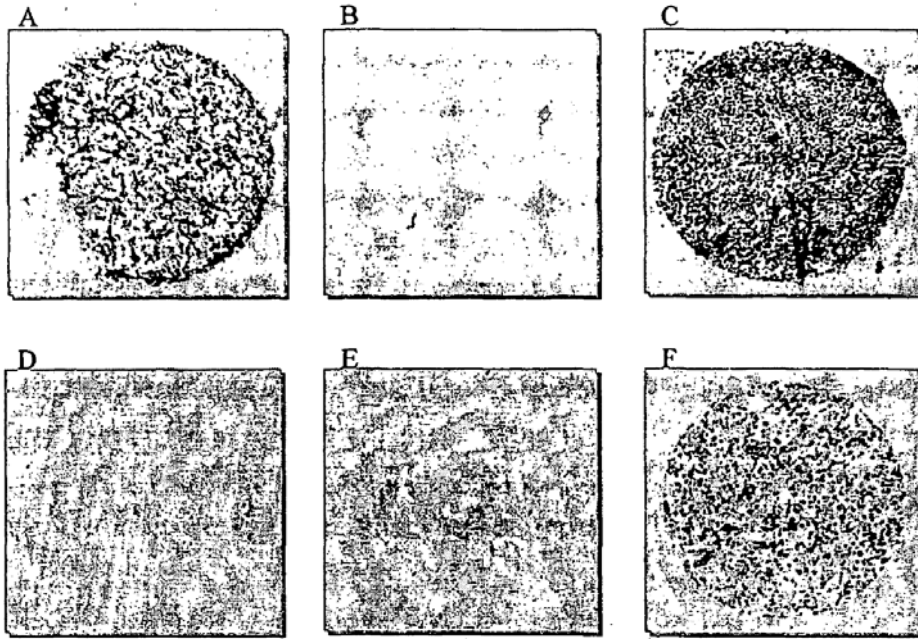


Fig. 1

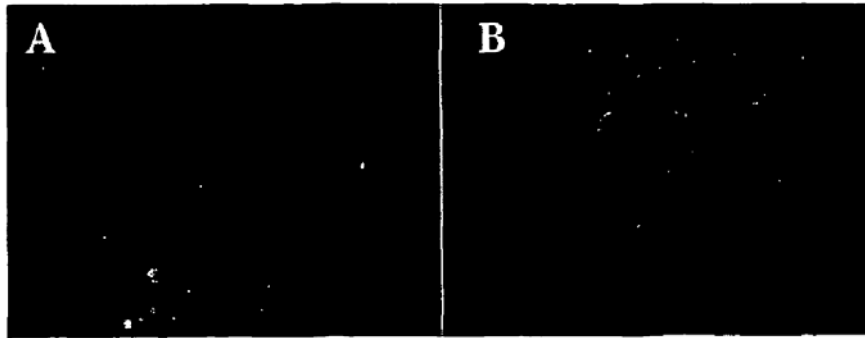


Fig. 2a

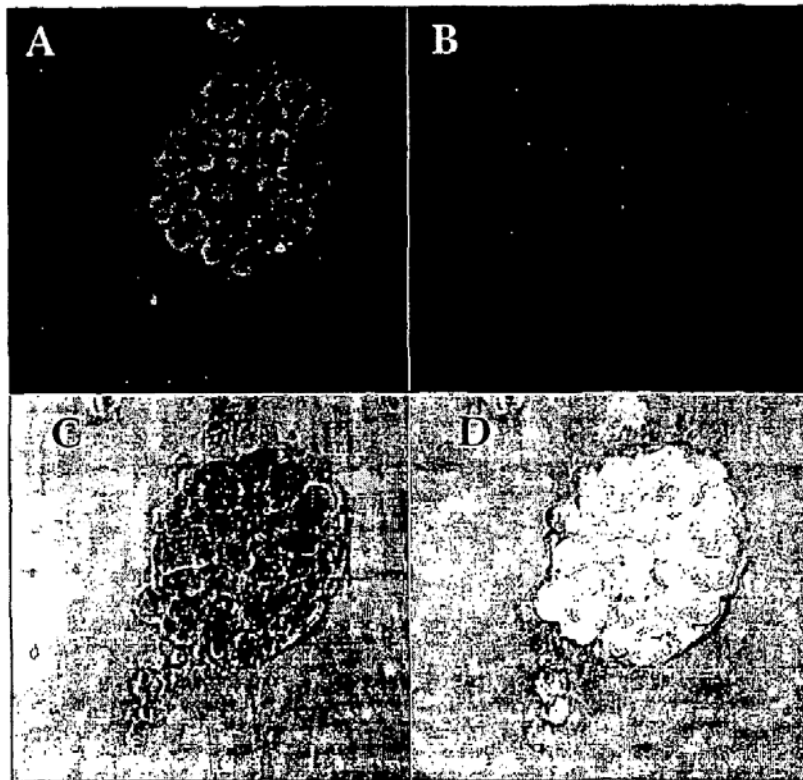


Fig. 2b

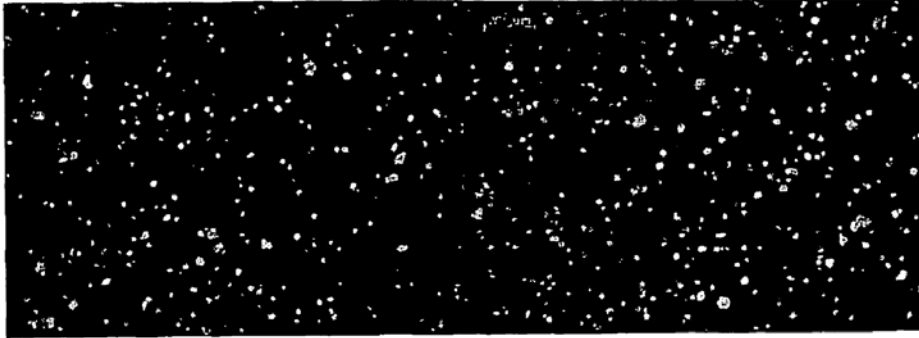


Fig. 3