

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 798**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 9/06** (2006.01)  
**A61P 17/02** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)  
**C07K 19/00** (2006.01)  
**A61L 26/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2010 E 10014788 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 2455104**

54 Título: **Hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos biofuncionalizados**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.09.2013**

73 Titular/es:  
**UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG (50.0%)**  
**Hugstetter Strasse 49**  
**79106 Freiburg, DE y**  
**ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG**  
**(50.0%)**

72 Inventor/es:  
**TOMAKIDI, PASCAL;**  
**STEINBERG, TORSTEN;**  
**WEBER, WILFRIED;**  
**LAIRD, DOUGAL y**  
**GÜBELI, RAPHAEL**

74 Agente/Representante:  
**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 423 798 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

Hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos biofuncionalizados

5 La presente invención se dirige a un hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos biofuncionalizado. Este hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención comprende una matriz de polímeros de PEG, que están modificados para contener al menos una proteína de fusión multifuncional, proteína de fusión multifuncional que comprende preferentemente como componentes un péptido de unión al sustrato (SBP), preferentemente un péptido de unión a RGD repetitivo y/o un dominio de unión a ZZ, preferentemente un marcador para la purificación y al menos un conector N- y/o C-terminal. La presente invención se dirige además a los hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos para su uso en el tratamiento de lesiones, en apósitos quirúrgicos, para su uso en el tratamiento de heridas, para su uso en la regeneración de tejidos duros y blandos, para su uso en el tratamiento de heridas de la cavidad oral, en el campo de la oftalmología, en el campo de los defectos periodontales, etc. Además, la presente invención proporciona un kit que comprende el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención y, opcionalmente, otros componentes.

Los sistemas biológicos tales como la piel, los tejidos conjuntivos o los huesos del sistema esquelético son sistemas complejos, teniendo lugar su regeneración y/o reparación bajo una organización controlada espacial y temporalmente. Una miríada de señales y células actúa en el espacio y el tiempo para curar una herida, por ejemplo, para reemplazar una parte destruida de la piel durante la regeneración tisular, o para inducir o favorecer el crecimiento óseo, etc. En muchos de estos casos, se han de llenar las cavidades para evitar una pérdida de tejido blando y/o duro, o para evitar una reducción significativa o incluso un colapso del mismo. Sin embargo, la eficacia de muchos biomateriales usados actualmente para la construcción de vehículos o matrices adecuados para dichos tratamientos está limitada por la falta de estructuras multifuncionales que complementen la dinámica inherente de estos sistemas biológicos.

En este contexto, se sabe que múltiples impulsos físicos, químicos y biológicos actúan cooperativa y/o sinérgicamente para afectar a la función celular durante la regeneración tisular *in vitro* e *in vivo*. Por lo tanto, para diseñar biomateriales que sirvan para facilitar la regeneración tisular, se debe considerar cuidadosamente la interacción entre las células/tejidos diana y estos impulsos medioambientales. Normalmente, son factores importantes los factores de crecimiento solubles, las interacciones célula-célula y célula-material, y las propiedades mecánicas del microambiente (véase, por ejemplo, Lin y Anseth, *Expert Review*, "PEG hydrogels for the controlled Release of Biomolecules in Regenerative Medicine", *Pharmaceutical Research*, Vol. 26, N° 3, marzo de 2009).

35 Teniendo en cuenta estos requisitos, la administración de moléculas bioactivas y la búsqueda de vehículos adecuados han sido objeto de una intensa investigación, pues son diversas las moléculas diana, incluyendo fármacos de bajo peso molecular, ácidos nucleicos, péptidos, factores de crecimiento y hormonas, y proteínas, para la regeneración acelerada de los tejidos.

40 Un enfoque prometedor en este campo se basa en el uso de los denominados hidrogeles. Los hidrogeles representan una clase de materiales con numerosas ventajas para albergar simultáneamente células y biomoléculas. También hay numerosas posibilidades que permiten controlar estrechamente las características de liberación a través de cambios sistemáticos en la estructura física y química del gel (véase, por ejemplo C. C Lin y A. T. Metters. "Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling". *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58:1379-1408 (2006)). Debido a la variabilidad de sus propiedades, los hidrogeles se han usado para permitir la preparación de los denominados polímeros "sensibles a estímulos" sintéticos, que se asemejan a las estructuras de tejidos naturales y modelos tisulares. En base a sus propiedades químicas y físicas, éstos polímeros "sensibles a estímulos" sintéticos se han acuñado con diferentes nombres, por ejemplo, polímeros "sensibles a estímulos", polímeros "sensibles al medio ambiente" o polímeros "inteligentes" (véase Brawa *et al.*, *Biomed. Mater.* 4 (2009) 022001 (15 pp)). La característica distintiva de estos polímeros sensibles a estímulos es su capacidad para someterse a cambios rápidos en su microestructura de un estado hidrófilo a un estado hidrófobo, que se activa por pequeños cambios en el medio ambiente. Los cambios macroscópicos que se producen son reversibles, por lo tanto, el sistema es capaz de volver a su estado inicial al retirarse el desencadenante. Los estímulos comunes que conducen a estos cambios se clasifican además bien como estímulos externos o internos. Los sistemas controlados externamente se basan en estímulos aplicados externamente que se producen con la ayuda de diferentes dispositivos de generación de estímulos, lo que finalmente produce la administración de fármacos por impulsos. Los sistemas regulados internamente también se conocen como dispositivos auto-regulados, donde la velocidad de liberación es controlada por un mecanismo de retroalimentación que se produce dentro del cuerpo para controlar los cambios estructurales en la red de polímero y para exponer la liberación del fármaco deseada, sin ninguna intervención externa. Los estímulos de los polímeros "sensibles a estímulos" pueden ser, por ejemplo, un cambio de disolvente, pH, temperatura, corriente eléctrica, campos magnéticos o tensión mecánica. Las respuestas a estos estímulos se pueden manifestar como cambios en la forma, las características superficiales, la solubilidad y la formación de un ensamblaje molecular intrincado o una transición sol-gel (véase Brawa *et al.*, *Biomed. Mater.* 4 (2009) 022001 (15pp)).

65

Los hidrogeles que se pueden usar como polímeros "sensibles a estímulos" sintéticos pueden estar basados en polímeros sintéticos tales como poli(etilenglicol) (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(N-isopropilacrilamida) (poli(NiPAAm)). Dichos hidrogeles se han usado en numerosas aplicaciones de medicina regenerativa (véase, por ejemplo, N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung y H. Ichikawa. "Hydrogels in pharmaceutical formulations". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50:27-46 (2000)).

En este contexto, Schmaljohann *et al.* (Schmaljohann, D., Nitschke, M., Schulze, R., Werner, C., Eichhorn, K.-J., "Patterning of stimuli-responsive hydrogels", *Polymer Preprints* 45, 380-381, diciembre de 2004) divulgan un hidrogel termosensible a base de un precursor de poli(NiPAAm-co-PEGMA). Se ha demostrado que el material muestra un cambio inducido por la temperatura en el comportamiento de adhesión y desprendimiento celular. Se puede utilizar en vehículo de cultivo celular inteligente con diferente química de sustrato en una resolución lateral que refleje las dimensiones de las células (intervalo micrométrico).

Del mismo modo, Voit *et al.* (Voit, B.; Schmaljohann, D.; Gramm, S., Nitschke, M., Werner, C., "Stimuli-responsive polymer layers for advanced cell culture technologies", *International Journal of Materials Research* 98, 646-650, agosto de 2007) divulgan una serie de copolímeros de injerto que consisten en poli(N-isopropilacrilamida) como componente termosensible de la estructura del polímero y de las cadenas laterales de poli(etilenglicol). Los hidrogeles inmovilizados en la superficie presentan una transición de parcialmente colapsados a totalmente hinchados, que está en el intervalo de 32-35 °C y corresponde a la temperatura de solución crítica inferior de los polímeros solubles. Se encontró que los soportes revestidos de hidrogel permiten la adhesión, la difusión y la proliferación de las células, y permiten la separación dependiente de la temperatura rápida y eficaz de láminas de células intactas o múltiples tipos de células.

Sin embargo, los geles sensibles a la temperatura, aún siendo adecuados para algunas aplicaciones *in vitro* basadas en células, no son adecuados para la administración *in vivo*, ya que el estímulo de la temperatura se tiene que proporcionar en el paciente o en el lugar de la administración durante o después de la administración del hidrogel sensible a estímulos a un paciente por tratar. Se producirán problemas similares cuando se utilizan hidrogeles sensibles a estímulos cuyos estímulos se seleccionan de entre un cambio de disolvente, pH, corriente eléctrica, campos magnéticos o tensión mecánica. Dichos hidrogeles sensibles a la temperatura o sensibles al pH se describen, por ejemplo, en los documentos WO 2009/144569 y WO 2010/068728.

Los hidrogeles, adecuados como hidrogeles sensibles a estímulos, también se pueden formar por reticulación. La reticulación proporciona un método adecuado para modificar geles para que presenten viscosidades más altas debido a un aumento aparente o real del peso molecular, lo que a menudo resulta en la formación de geles. La reticulación se puede conseguir químicamente mediante la formación de enlaces covalentes o físicamente mediante la formación de, por ejemplo, puentes de hidrógeno o interacciones iónicas. Obviamente, la reticulación también se puede lograr tanto química como físicamente. La reticulación química de polímeros hidrófilos es una ruta general y que se aplica habitualmente para obtener hidrogeles. Para poderse administrar o procesar estos geles, se disuelven prepolímeros en agua y luego se polimerizan, produciendo la formación del hidrogel *in situ*. Los procedimientos de hidrogelación a menudo se basan en el uso de macromonómeros acrílicos o metacrílicos que es preferible no emplear en aplicaciones (biomédicas), debido a su toxicidad inherente y debido a que, normalmente, requieren un iniciador auxiliar, potencialmente peligroso, para la polimerización. Por otra parte, los hidrogeles reticulados químicamente carecen de reversibilidad y tienen un comportamiento de degradación limitado, pues los poli(acrilato)s y los poli(metacrilato)s no son biodisolubles.

Por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 5.410.016 divulga hidrogeles a base de copolímeros de poli(etilenglicol) con poli(DL-lactida) que contienen las funciones de acrilato colgante que se reticulan *in situ*. El documento WO 01/44307 divulga hidrogeles a base de alcohol polivinílico modificado con acrilato colgante y grupos metacrilato que se reticulan químicamente *in situ*. Por consiguiente, de acuerdo con estas referencias de la técnica anterior, se obtiene un hidrogel reticulado irreversible a partir de prepolímeros procesables en agua que contienen grupos reactivos.

En el documento US 2009/0117656, se muestra otro enfoque de reticulación más que usa los enlaces disulfuro reversibles para interconectar las cepas de polímeros sintéticos, tales como polímeros hidrosolubles, incluyendo poliaminoácidos, sacáridos, poliésteres, poliamidas, poliéteres, polímeros de vinilo y los copolímeros de los mismos (véase, por ejemplo, el documento US 2009/0117656). Con este fin, se pueden usar compuestos reactivos tales como, por ejemplo, cistamina, cistina, 2-hidroxiethyl disulfuro, ácido 3,3'-ditiopropiónico (DTDP), glutatión disulfuro, 3,3'-ditiopropionhidrazida, los derivados de los mismos y similares, como agente de reticulación. Después, normalmente, se forma el péptido por auto-ensamblaje en un medio acuoso con posterioridad a la modificación del polímero sintético con el compuesto reactivo.

Un enfoque adicional de este tipo se refiere a hidrogeles de polímeros de dextrano elaborados a partir de dextrina acrilolada de reticulación con moléculas homo-, mono- y bifuncionales activas, por ejemplo, péptidos que tienen una o dos cisteínas en sus extremos (véase el documento US 2007/0167354). Más concretamente, el documento US 2007/0167354 divulga una matriz para inducir la migración celular, donde dos péptidos se unen covalentemente a la matriz, siendo un primer péptido escindible por proteasas naturales, por ejemplo, por metaloproteinasas de la matriz de tejido (MMP), y comprendiendo un segundo péptido un péptido de atracción de células, por ejemplo, un péptido

RGD. Estos dos péptidos promueven la adhesión inducida por células y la degradación enzimática del hidrogel. Al cambiar las composiciones porcentuales de estos dos péptidos con respecto a las reticulaciones disponibles totales, se puede regular el grado de adhesión y migración celular a través del gel. Sin embargo, este enfoque utiliza de nuevo macromonómeros acrílicos o metacrílicos que es preferible no emplear en las aplicaciones biomédicas.

5 Una forma específica de hidrogeles reticulados representa los denominados hidrogeles funcionalizados con heparina. Nie *et al.* (véase Ting Nie, Aaron Baldwin, Nori Yamaguchi, Kristi L. Kiick, "Production of heparin-functionalized hydrogels for the development of responsive and controlled growth factor delivery systems", *Journal of Controlled Release* 122 (2007) 287-296) informan sobre el ensamblaje no covalente de materiales heparinizados como ruta a sistemas de administración de fármacos sensibles, reversibles e inyectables, con los principales intereses en la administración de proteínas y la producción de materiales miméticos de la ECM. En este contexto, los polímeros estrella de poli(etilenglicol) funcionalizados con péptidos de unión a heparina se pueden mezclar directamente con heparina para formar soluciones viscoelásticas con propiedades ajustables, o se pueden mezclar con conjugados de poli(etilenglicol) estrella-heparina para formar hidrogeles no covalentes capaces de administrar factor de crecimiento a través de la erosión del hidrogel. Dichas estrategias de erosión, aunque pasivas, pueden ofrecer oportunidades únicas para mejorar la actividad del factor de crecimiento a través de la liberación conjunta del factor de crecimiento con las macromoléculas heparinizadas. Nie *et al.* también han publicado que los conjugados de PEG-heparina son competentes para la formación de hidrogeles elásticos mediante la interacción con factores de crecimiento de unión a heparina diméricos tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Es importante destacar que estos hidrogeles son capaces de realizar una liberación mediada por el receptor de VEGF y la erosión del hidrogel tras la exposición al receptor de VEGF VEGFR-2, y dada la función principal del VEGFR-2 en el control de la proliferación y la migración de las células endoteliales vasculares, estos resultados sugieren importantes estrategias para la administración dirigida de fármacos en las terapias vasculares y de curación de heridas.

25 En Kim *et al.* (2007), se divulga otro ejemplo adicional de hidrogeles de funcionalizados con heparina, que utilizan hidrogeles funcionalizados con heparina para la unión y la administración de factores de crecimiento. Más concretamente, Kim *et al.* (2007) han publicado el ensamblaje no covalente de hidrogeles mediante la interacción entre la heparina y los péptidos de unión a heparina o factores de crecimiento, así como la administración de factores de crecimiento a partir de estas matrices a través de erosión pasiva o erosión de la matriz mediada por el receptor. En este contexto, se ha observado que el poli(etilenglicol) (PEG) estrella de cuatro brazos modificado con heparina forma hidrogeles cuando se mezcla con PEG estrella modificados con péptidos de unión a heparina. Los péptidos usados se obtuvieron de la proteína que interactúa con la heparina (HIP), la antitrombina III (ATIII), o del factor plaquetario 4 (PF4ZIP). Dichos polímeros modificados forman hidrogeles a través de interacciones no covalentes principalmente electrostáticas, y los hidrogeles se pueden cargar con factores de crecimiento terapéuticamente relevantes.

40 La resistencia mecánica de dichos hidrogeles funcionalizados con heparina se puede controlar mediante la elección de diferentes péptidos de unión a heparina y composiciones poliméricas. Además, la distribución de la heparina cargada por toda la matriz también puede facilitar la incorporación homogénea de los factores de crecimiento en el vehículo de administración. Ventajosamente, la falta de agentes de reticulación tóxicos en los geles, junto con el potencial para su administración no invasiva (por ejemplo, por inyección) puede permitir su uso en múltiples aplicaciones clínicas y terapéuticas. Además, se pueden emplear factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) como reticulaciones en el ensamblaje de estas redes de hidrogel, pues proporcionan dos puntos de reticulación por molécula. Tras su administración en un sitio diana, el factor de crecimiento se puede retirar del gel mediante la unión con sus receptores, y posteriormente a través de endocitosis mediada por sus receptores, lo que provocaría erosión debido a la pérdida de puntos físicos de reticulación y permitiría teóricamente la eliminación de la matriz de polímero si se usan moléculas de PEG de peso molecular apropiado. Dicho sistema de administración se podría aplicar de forma flexible para numerosos dianas, dependiendo del factor de crecimiento deseado empleado en la matriz; en teoría, también se podrían usar múltiples factores de crecimiento en una sola matriz para permitir la administración y la erosión en múltiples escalas de tiempo que dependen de la afinidad del factor de crecimiento para la heparina. Sin embargo, aunque este sistema proporciona algunas propiedades deseables y ventajosas, se dirige exclusivamente a la provisión de factores de crecimiento *in vitro* o *in vivo*. No se aborda el crecimiento del tejido ni la incorporación de factores o células específicos en dicho hidrogel.

55 En el documento WO 2009/146929, se muestra otra forma específica de hidrogeles reticulados. El documento WO 2009/146929 divulga un hidrogel específicamente reticulado utilizando un polímero, un primer polipéptido específico y una pareja de unión polipeptídica específica, que puede ser idéntica o diferente al primer polipéptido. Ambos polipéptidos se unen covalentemente o no covalentemente al polímero y permiten la formación del hidrogel tras la interacción entre el primer polipéptido y la pareja de unión polipeptídica. Los polipéptidos específicos usados en el documento WO 2009/146929 son, por ejemplo GyrB, FKBP, FRB, F<sub>M</sub>, ToxT, DHFR y Cyp. Sin embargo, aunque el documento WO 2009/146929 ya permite la incorporación de fármacos y sustancias efectoras, dichos compuestos normalmente se filtran en un plazo bastante corto de tiempo. Además, dichos hidrogeles soportan mal la inclusión de células sobre o incluso en la matriz. Los geles de acuerdo con el documento WO 2009/146929 pueden, por lo tanto, ser menos adecuados para tratamientos a largo plazo o al menos requieren una administración repetida, por

ejemplo, durante el soporte o la reconstitución de tejido, por ejemplo, tras operaciones o, en general, para el crecimiento de tejido, o la complementación al crecimiento de tejido. En este contexto, sólo se conocen unos cuantos sistemas en la técnica que permiten realmente, aunque no de una manera suficientemente eficaz, el crecimiento del tejido, y la inclusión de células sobre o incluso en una matriz, así como la aplicación de dichas matrices.

Entre los diferentes hidrogeles, los sistemas de gel de PEG no iónicos hidrófilos parecen proporcionar muchas posibilidades para dichos fines con respecto a la adaptación de las propiedades del gel. Los sistemas de gel de PEG hidrófilos no iónicos se consideran, además, no tóxicos y presentan una excelente biocompatibilidad. Por consiguiente, estos hidrogeles de poli(etilenglicol) (PEG) se han tratado ampliamente en las últimas décadas como matrices para controlar la administración de fármacos, así como vehículos de administración de células para la promoción de la regeneración tisular. En consecuencia, en el contexto de la administración controlada, los hidrogeles de PEG diseñados adecuadamente pueden desempeñar un papel importante en el direccionamiento de las funciones celulares que son importantes para la supervivencia, la adhesión, la proliferación, la síntesis de matrices, las propiedades secretoras e incluso la diferenciación. Los objetivos y los principios de diseño para este fin son de dos tipos: para proporcionar la liberación local y prolongada de los agentes terapéuticos cargados, para aumentar el efecto terapéutico; y para disminuir las reacciones adversas y conservar la bioactividad de los agentes terapéuticos. Para lograr estos objetivos, se han de considerar detenidamente varios factores críticos, incluyendo los medios fisiológicos de las células y los tejidos diana, los mecanismos de carga/liberación de moléculas y de gelificación, las características moleculares de los agentes terapéuticos que se van a administrar, así como las interacciones potenciales con los hidrogeles poliméricos.

Los hidrogeles de PEG proporcionan un nicho único como sustrato portador de células, pues son altamente biocompatibles con las células en las condiciones de polimerización adecuadas. Mediante la copolimerización con otras macromoléculas, se pueden introducir múltiples restos funcionales para inhibir o promover la supervivencia y la función celular. Por ejemplo, el péptido de unión a la integrina Arg-Gly-Asp (o RGD) se puede introducir como un grupo funcional colgante en otros hidrogeles de PEG bioinertes para promover la supervivencia de las células que dependen de la adhesión, tales como los osteoblastos (J. A. Burdick, y K. S. Anseth. "Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering". *Biomaterials*. 23: 4315-4323 (2002)).

Sin embargo, aunque los entornos de hidrogel de PEG son generalmente muy permisivos y permiten una fácil difusión de los nutrientes, esta propiedad a menudo dificulta la administración localizada y la eficacia terapéutica de los factores solubles dirigidos a las células encapsuladas, como las redes de gel inerte son igualmente permeables a los agentes terapéuticos coencapsulados. Por lo tanto, el medio por el cual las moléculas bioactivas se presentan a las células encapsuladas dentro de las redes de hidrogel de PEG, tanto temporal como espacialmente, sigue siendo un reto importante en el diseño de los sistemas de administración de hidrogel, y es actualmente un tema de intensa investigación.

Ito *et al.* (Ito *et al.*, "Biomaterials" 31 (2010) 58-66) divulgan un hidrogel que comprende un péptido reconocible del dominio PDZ unido covalentemente a cada extremo de un poli(etilenglicol) de cuatro brazos (PDZ-péptido-PEG). Concretamente, Ito *et al.*, divulgan un método de autoensamblaje de hidrogeles que está dirigido por la interacción entre la proteína interactiva con tax recombinante 1 (TIP-1) con el dominio PDZ de una molécula, que está condensada a cada extremo de la proteína CutA trimérica triangular (CutA-TIP1) y un dominio PDZ. Los hidrogeles de Ito *et al.* proporcionan propiedades significativas como hidrogeles sensibles al corte para la administración inyectable de células en enfermedades o tejido cartilaginosa perdido. Por consiguiente, los hidrogeles de Ito *et al.* están diseñados específicamente, no para soportar las fuerzas de corte, sino para someterse a la transformación de gel a sol tras someterlos a una tensión de corte.

El documento WO 2009/146929 divulga un hidrogel que comprende un polímero, un primer polipéptido y una pareja de unión polipeptídica, donde la pareja de unión polipeptídica es un segundo polipéptido, un ácido nucleico o una molécula pequeña, donde la interacción entre el primer polipéptido y la pareja de unión polipeptídica estabiliza el hidrogel, y se modula mediante la adición de un compuesto modulador. Aunque el documento WO 2009/146929 proporciona ciertas bases para el desarrollo de un hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos, no divulga la necesidad de unir covalentemente dicho péptido de fusión multifuncional con el polímero ni aborda la necesidad de estabilizar dicho hidrogel y la increscencia celular, que son lo más importante cuando se usan dichos hidrogeles para la regeneración de los tejidos.

Resumiendo todo lo anterior, se han descrito muchos enfoques ventajosos y prometedores en los últimos años. Sin embargo, ninguno de estos enfoques parece proporcionar hidrogeles tanto con una buena idoneidad para aplicaciones *in vivo* como una flexibilidad suficiente para la unión y la liberación de forma eficaz de diversos factores y/o células en el hidrogel en un enfoque sencillo y rápido. Además, ninguno de estos hidrogeles parece ser adecuado como una especie de matriz celular y/o tisular para aplicaciones *in vitro* y/o *in vivo* para los objetivos de la increscencia celular y/o regeneración de los tejidos en un paciente por tratar.

Por consiguiente, el objeto subyacente a la presente invención es proporcionar nuevos medios, preferentemente una

nueva matriz de hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos, y métodos de producción de los mismos, que presenten tanto una buena idoneidad para aplicaciones *in vivo* como una flexibilidad suficiente para la unión y la liberación de manera eficaz de diversos factores y/o células en el hidrogel dentro de un enfoque sencillo y rápido.

5 Este objeto se resuelve mediante la materia objeto de las reivindicaciones adjuntas.

De acuerdo con una primera realización específica, el objeto subyacente de la presente invención se resuelve mediante un hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos, que comprende una matriz de polímeros de PEG que están modificados para contener al menos una proteína de fusión multifuncional, comprendiendo la proteína de fusión multifuncional como componentes un péptido de unión al sustrato (SBP), un péptido de unión a RGD repetitivo y, preferentemente, un marcador para la purificación y al menos un conector N- y/o C-terminal, donde al menos una proteína de fusión multifuncional está unida covalentemente al polímero de PEG, donde el péptido de unión al sustrato (SBP) se selecciona de entre la secuencia N-terminal de la subunidad B de la ADN girasa de *Escherichia coli* (GyrB), de la secuencia N-terminal de la subunidad B de la ADN girasa de *Escherichia coli* de acuerdo con la SEC ID N° 2 o de una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 80% de identidad con la secuencia de acuerdo con SEC ID N° 2 o de proteínas FKBP, F<sub>M</sub>, ToxT, DHFR, Cyp, E, PIP, TetR, ArgR, ArsR, HucR, FRB, estreptavidina, avidina, neutravidina, receptor de hormona esteroidea, una hormona esteroidea o una proteína de unión a heparina, donde el conector N- y/o C-terminal se selecciona de entre un resto que contiene tiol, un aminoácido modificado con tiol o que contiene tiol, una cisteína, una homocisteína, un tiol acoplado a maleimida, un resto vinilsulfona, secuencias peptídicas, enlaces peptídicos, una HaloTag, una SNAP-tag, una CLIP-tag, un enlace de reacción de transglutaminasa, aminoácidos o entidades de formación de quelatos NTA o una polihistidina de unión a un ión metálico multivalente, y donde la formación de gel se realiza uniendo el péptido de unión al sustrato (SBP) con su sustrato específico.

25 Ventajosamente, el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención se puede producir de manera rentable y proporciona una gran variabilidad. Se puede preparar en base a un polímero de polietilenglicol farmacéuticamente autorizado injertado covalentemente con un péptido de unión al sustrato (SBP). La formación del gel se consigue fácilmente por la interacción de los péptidos de unión al sustrato (SBP) según lo definido en la presente memoria, preferentemente a través de un sustrato específico o mediante la unión del péptido de unión al sustrato (SBP) con su sustrato específico, por ejemplo, la dimerización de dos subunidades GyrB a través de coumermicina o la unión de GyrB con coumermicina. La adición de un compuesto antagonista o de sustrato en exceso, por ejemplo, novobiocina en el caso de GyrB, permite la disolución ajustable del hidrogel. La incorporación de motivos de adhesión celular, por ejemplo, en forma de un péptido de unión a RGD repetitivo (RGD<sub>n</sub>), en la secuencia de la proteína de fusión permite el crecimiento celular en el hidrogel. Los factores de crecimiento embebidos, por ejemplo FGF-7 (factor de crecimiento de fibroblastos 7, o KGF, factor de crecimiento de queratinocitos) en el hidrogel, por ejemplo, a través de un dominio de unión a ZZ, se puede hacer de una manera controlada en el tiempo y de una manera sensible a la dosis por el inductor novobiocina.

40 De acuerdo con la primera realización, la proteína de fusión multifuncional de la invención usada para modificar los polímeros de PEG de la matriz de PEG comprende preferentemente como componentes un péptido de unión al sustrato (SBP), preferentemente un péptido de unión a RGD repetitivo, tal como (RGD<sub>n</sub>) y/o un dominio de unión a ZZ, preferentemente un marcador para la purificación y al menos un conector N- y/o C-terminal.

45 El péptido de unión al sustrato (SBP) de la proteína de fusión multifuncional de la invención es una proteína o un polipéptido seleccionado de entre las proteínas o los polipéptidos definidos en la reivindicación 1, capaz de unirse a su sustrato específico, o al mismo o un péptido de unión al sustrato diferente (SBP). En el contexto de la presente invención, dicho péptido de unión al sustrato (SBP) se puede seleccionar de entre proteínas o polipéptidos que interactúan entre sí, por ejemplo, a través de un sustrato específico, o que se unen directamente a un sustrato específico. Por consiguiente, cuando se unen a un polímero de PEG, al menos dos de dichos péptidos de unión al sustrato (SBP), opcionalmente a través de un sustrato específico, permiten por tanto la formación de un ensamblaje molecular intrincado o una transición de sol a gel y la formación del hidrogel debido a la "reticulación" de cepas individuales de polímeros de PEG. Como alternativa, la formación del hidrogel puede ser posible tras la unión de un péptido de unión al sustrato (SBP), que ya está unido a un polímero de PEG, con su sustrato específico, que está igualmente unido a otro polímero de PEG. Por consiguiente, los péptidos de unión al sustrato adecuados (SBP) se pueden seleccionar de entre péptidos que tienen preferentemente una tendencia a formar homo- o heteromultímeros, por ejemplo, homo- o heterodímeros o incluso homo- o heterotrímeros, etc. Como alternativa, los péptidos de unión al sustrato adecuados (SBP) se pueden seleccionar de entre proteínas o polipéptidos que se unen preferentemente de manera específica a un sustrato específico. Más preferentemente, en ambos casos, la interacción de dos o más péptidos de unión al sustrato (SBP) a través de un sustrato específico o de un péptido de unión al sustrato (SBP) con su sustrato específico se puede inducir o volver a disolver tras la adición o la eliminación (o la sustitución) de sustratos específicos. Dicho sustrato específico puede ser, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico, un péptido, una molécula orgánica pequeña, etc., y es unido preferentemente de manera específica por los péptidos de unión al sustrato (SBP) según lo definido en la presente memoria. Las combinaciones de dos o más péptidos de unión al sustrato (SBP), que tienen una tendencia a formar homo- o heteromultímeros, bien sin o a través de la unión a un sustrato específico, o las combinaciones de un péptido de unión al sustrato (SBP) y su sustrato específico, se pueden denominar "parejas de unión" a los efectos de la presente invención.

Por consiguiente, las parejas de unión en el sentido anterior, donde al menos dos o más péptidos de unión al sustrato (SBP) interactúan entre sí, se seleccionan preferentemente, por ejemplo, de entre combinaciones de péptido de unión al sustrato (SBP)-péptido de unión al sustrato (SBP) o de entre combinaciones de péptido de unión al sustrato (SBP)-sustrato específico. Preferentemente, en ambos casos, el péptido de unión al sustrato (SBP) representa un componente de la proteína de fusión multifuncional de la invención y confiere sus propiedades de unión a toda la proteína de fusión multifuncional. Dichas combinaciones de péptido de unión al sustrato (SBP)-péptido de unión al sustrato (SBP) o combinaciones de péptido de unión al sustrato (SBP)-sustrato específico se pueden seleccionar, por ejemplo, de entre proteína de unión a heparina (HBP)-proteína de unión a heparina (HBP), proteína de unión a heparina (HBP)-heparina, GyrB-GyrB (subunidad B de girasa), FKBP-FRB (proteína de unión a FK-un dominio (FRB) del homólogo de la proteína cinasa lipídica FRAP (FKBP-proteína asociada a rapamicina)), F<sub>M</sub>-F<sub>M</sub> (mutación F36M de la proteína de unión a FK), ToxT-ToxT (proteína ToxT de *V. cholerae*), DHFR-DHFR (dihidrofolato reductasa), FKBP-FKBP (proteína de unión a FK), FKBP-Cyp (proteína de unión a FK-ciclofilina) y Cyp-Cyp (ciclofilina). Dichas parejas de unión también pueden ser homomultímeros o heteromultímeros de al menos dos de los péptidos de unión al sustrato (SBP) mencionados anteriormente. Los sustratos específicos correspondientes se pueden seleccionar, por ejemplo, de entre heparina, antibióticos de cumarina (para GyrB-GyrB), rapamicina o FK506 y derivados (por ejemplo, rapálogos, inhibidores de mTOR) (para FKBP-FRB y F<sub>M</sub>), ciclosporinas y derivados (para Cyp), FK506 (para FKBP-FRB y F<sub>M</sub>), virtstatina (para ToxT) y metotrexato y derivados de los mismos (por ejemplo, antifolatos) (para DHFR-DHFR) y/o de compuestos orgánicos pequeños, por ejemplo, compuestos de un peso molecular de entre 100 y 5.000 g/mol, en particular, de entre 100 y 2.000 g/mol.

De acuerdo con un aspecto particular, los péptidos de unión al sustrato (SBP) se pueden seleccionar de entre péptidos de unión al sustrato (SBP) que tienen una tendencia a formar dímeros. Los ejemplos particulares de dichos péptidos de unión al sustrato (SBP) se seleccionan preferentemente, por ejemplo, de entre GyrB, F<sub>M</sub>, ToxT, FKBP y DHFR. Los sustratos específicos que permiten la inducción de la dimerización de estos péptidos de unión al sustrato (SBP) se pueden seleccionar de entre antibióticos de cumarina, rapamicina y derivados, virtstatina, FK1012 y metotrexato y derivados de los mismos. Estos sustratos específicos también se pueden seleccionar de entre compuestos que permiten inducir y/o disolver la interacción entre estos péptidos de unión al sustrato (SBP), neutralizando así la interacción entre ambas parejas de unión, pues la neutralización puede conducir a la reducción sustancial de la interacción de ambos péptidos de unión al sustrato (SBP), por ejemplo, de una manera competitiva. Dichos compuestos son, por ejemplo, sustratos específicos, como se ha mencionado anteriormente, cuando se usan en un exceso sustancial, o preferentemente otros representantes diferentes de la misma clase de compuestos dimerizantes, por ejemplo, la clase de antibióticos de cumarina, rapamicina y derivados, y metotrexato, antifolatos y derivados de los mismos, y también FK506.

Las parejas de unión de los péptidos de unión al sustrato (SBP) según lo definido en la presente memoria y ácidos nucleicos como sus sustratos específicos son, por ejemplo, E-ETR (proteína MphR(A) y su operador ETR de *E. coli*), PIP-PIR (proteína PIP de *Streptomyces pristinaespiralis* y su operador PIR), TetR-tetO (represor de tetraciclina derivado de Tn10 TetR y su operador tetO), ArgR-argO (represor sensible a la arginina y su operador argO), ArsR-arsO (represor sensible al arsénico y su operador arsO) y HucR-hucO (represor sensible al ácido úrico y su operador hucO). Otras de dichas parejas son las descritas por Ramos J. L. *et al.* (*Microbiol Mol Biol Rev* 69, 326-56, 2005), Martínez-Bueno M. *et al.* (*Bioinformatics* 20, 2787-91, 2004), y las que aparecen en base de datos de reguladores BacT (<http://www.bactregulators.org/>). Cuando dichos péptidos de unión al sustrato (SBP) se utilizan como componentes de la proteína de fusión multifuncional de la invención, los sustratos específicos están unidos preferentemente al polímero de PEG como se usa en la presente memoria. Los compuestos específicos adecuados para disolver la interacción y, por lo tanto, el hidrogel de PEG sensible a estímulos de la invención cuando se utilizan dichas parejas de unión son, por ejemplo, antibióticos macrólidos (para E-ETR), antibióticos de estreptogramina (para PIP-PIR), antibióticos de tetraciclina (para TetR-tetO), arginina (para ArgR-argO), metales pesados (para ArsR-arsO) y ácido úrico (para HucR-hucO).

Las parejas de unión de péptidos de unión al sustrato (SBP) según lo definido en la presente memoria y las moléculas pequeñas como sus sustratos específicos son, por ejemplo, GyrB-antibióticos de cumarina, FKBP-inhibidores de mTOR, FRB-inhibidores de mTOR, F<sub>M</sub>-inhibidores de mTOR, Cyp-ciclosporinas, Cyp-ascomicinas, DHFR-antifolato, estreptavidina-análogo de biotina, avidina-análogo de biotina, neutravidina-análogo de biotina, receptores de hormonas esteroideas-hormonas esteroideas y análogos de las mismas, y ToxT-virtstatina. En caso de que el sustrato específico sea una molécula pequeña, la molécula pequeña tiene preferentemente un peso molecular de preferentemente < 5.000 g/mol, en particular de entre 100 y 5.000 g/mol. En este contexto, los antibióticos de cumarina y aminocumarina pueden incluir, por ejemplo, novobiocina, clorobiocina, coumermicina y dihidronovobiocina.

Un ciclosporina o una ascomicina puede ser, por ejemplo, ciclosporina A (NEORAL(R)), ISAtx-247, FK506 (tacrolimus), FK778, ABT-281 o ASM981. Un inhibidor de mTOR puede ser, por ejemplo, rapamicina o un derivado de la misma, por ejemplo, Sirolimus (RAPAMUNE(R)), Deforolimus, Temsirolimus, Zotarolimus, Everolimus (Certican(R)), CCI1779, ABT578, biolimus-7, biolimus-9, un rapálogo, por ejemplo, AP23573, azatioprina, campath 1 H, un modulador del receptor de S1 P, por ejemplo, FTY720 o un análogo del mismo. Los rapálogos pueden incluir, entre otros, variantes de rapamicina que tienen una o más de las siguientes modificaciones con respecto a la rapamicina: desmetilación, eliminación o reemplazo del grupo metoxi en C7, C42 y/o C29; eliminación, derivatización

o reemplazo del grupo hidroxilo en C13, C43 y/o C28; reducción, eliminación o derivatización de la función cetona en C14, C24 y/o C30; reemplazo del anillo pipercolato de 6 miembros por un anillo prolinilo de 5 miembros, y sustitución alternativa en el anillo ciclohexilo o reemplazo del anillo ciclohexilo por un anillo ciclopentilo sustituido. Otras modificaciones consideradas se presentan en los apartados de antecedentes de las patentes de EE.UU. N° 5.525.610; 5.310.903 y 5.362.718, y también en la patente de EE.UU. N° 5.527.907. Además se considera la epimerización selectiva del grupo hidroxilo C28 (documento WO 01/14387). También se considera el uso de análogos de rapamicina que contienen diversos restos que contienen fósforo, tales como los descritos en los documentos WO 03/064383 y WO 05/16252. Otros rapálogos considerados se describen en la patente de EE.UU. N° 6.984.635, la patente de EE.UU. N° 6.649.595 y la patente de EE.UU. N° 7.091.213. Los antifolatos pueden incluir, por ejemplo, compuestos de unión a DHFR como, por ejemplo, metotrexato, trimetoprim, diaminopirimidinas como brodimoprim y epioprim, o iclaprim. Otros inhibidores de DHFR que se consideran son los descritos en Hawser S. *et al.*, *Biochemical Pharmacology* 71, 25 941-948, 2006. Por último, los análogos de biotina pueden incluir, por ejemplo, compuestos de unión a estreptavidina, neutravidina o avidina como, por ejemplo, biotina, HABA, destiobiotina, iminobiotina o diaminobiotin. Preferentemente, las moléculas pequeñas enumeradas anteriormente como sustratos específicos de péptidos de unión al sustrato (SBP) según lo definido en la presente memoria se pueden someter a la derivatización adecuada para unir las mismas al polímero de PEG como se usa en la presente memoria para el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención. Dicha derivatización puede incluir la introducción de una función amina, amida, tiol, hidroxilo, aldehído, azida, alquino, cetona, epóxido o carboxi.

En el contexto de la presente invención, los péptidos de unión al sustrato (SBP) y las combinaciones de los mismos y sus sustratos específicos particularmente preferidos se seleccionan preferentemente de entre las siguientes combinaciones de péptidos de unión al sustrato (SBP) y sus sustratos específicos: GyrB-GyrB y, como su sustrato específico, antibióticos de aminocumarina (por ejemplo, coumermicina, novobiocina, etc.), F<sub>M</sub>-F<sub>M</sub> y FKBP-FRB y, como su sustrato específico, rapamicina, FK506 y sus derivados AP21998 y AP22542, etc., más preferentemente cuando se usan las combinaciones GyrB-GyrB, F<sub>M</sub>-F<sub>M</sub> y/o FKBP-FRB, más preferentemente GyrB-GyrB y/o F<sub>M</sub>-F<sub>M</sub>.

De acuerdo con una alternativa muy específica, el péptido de unión al sustrato (SBP) como componente de la proteína de fusión multifuncional de la presente invención puede ser GyrB. En el contexto de la presente invención, GyrB es preferentemente una proteína derivada de la subunidad B de la ADN girasa de *Escherichia coli*, y se une específicamente a sus sustratos, preferentemente seleccionados de entre antibióticos de aminocumarina incluyendo, por ejemplo, novobiocina, clorobiocina, coumermicina y dihidronovobiocina, preferentemente coumermicina. La coumermicina es una molécula de aminocumarina larga con dos sitios de unión a gyrB y encuentra uso como antibiótico. Su nombre IUPAC sistemático es [(3R,4S,5R)-5-hidroxi-6-[2-hidroxi-3-[[4-[[2-hidroxi-7-[(3R,4S,5R)-3-hidroxi-5-metoxi-6,6-dimetil-4-(5-metil-1H-pirrol-2-carbonil)oxioxan-2-il]oxi-8-metil-4-oxocromen-3-il]carbamoil]-3-metil-1H-pirrol-2-carbonil]amino]-8-metil-4-oxocromen-7-il]oxi-3-metoxi-2,2-dimetiloxan-4-il]-5-metil-1H-pirrol-2-carboxilato. Como la coumermicina comprende dos sitios de unión a GyrB, la coumermicina permite la dimerización de dos subunidades GyrB mediante la unión simultánea de dos subunidades GyrB al mismo tiempo. Esta propiedad específica se puede utilizar para reticular dos sustratos acoplados a una proteína o péptido GyrB entre sí utilizando la dimerización de la coumermicina de GyrB. El "dímero" formado se puede volver a disolver en sus dos subunidades GyrB monoméricas, por ejemplo, mediante la adición del antibiótico novobiocina, otro antibiótico de aminocumarina que tiene el nombre IUPAC sistemático de 4-hidroxi-3-[4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)benzamido]-8-metilcoumarin-7-il-3-O-carbamoil-5,5-di-C-metil- $\alpha$ -l-ixofuranosida. La novobiocina solo comprende un sitio de unión para GyrB. Por consiguiente, el sistema de GyrB/coumermicina se puede usar para reticular eficazmente polímeros de PEG modificados con la proteína de fusión multifuncional de la invención que contiene subunidades gyrB tras la adición de coumermicina, lo que produce la gelificación de los polímeros de PEG y la formación de un hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos en base a las interacciones proteína-sustrato-proteína. Dicho hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos también se puede volver a disolver específicamente cuando se añade el antibiótico novobiocina, u otros antibióticos de aminocumarina, ya que estos antibióticos de aminocumarina desplazan específicamente la coumermicina de una manera competitiva y, por lo tanto, interrumpen las interacciones proteína-sustrato-proteína.

En el contexto de la presente invención, GyrB como el péptido de unión al sustrato (SBP) de la presente invención, se selecciona de entre la subunidad B de la ADN girasa de *Escherichia coli*, más preferentemente de la secuencia N-terminal de la subunidad B de la ADN girasa de *Escherichia coli*, aún más preferentemente de la secuencia N-terminal de la subunidad B de la ADN girasa de *Escherichia coli* de acuerdo con SEC ID N° 2 (véase también la Fig. 5) o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 50, 60, 70 o 80%, preferentemente al menos un 90%, más preferentemente al menos un 95%, e incluso más preferentemente al menos un 97,5% de identidad con la secuencia de acuerdo a SEC ID N° 2, o puede ser codificado por una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEC ID N° 1 (véase también la Fig. 5) o una secuencia de ácido nucleico que muestra al menos un 50, 60, 70 o 80%, preferentemente al menos un 90%, más preferentemente al menos un 95%, e incluso más preferentemente al menos un 97,5% de identidad con la secuencia de acuerdo a SEC ID N° 1.

De acuerdo con una alternativa adicional muy específica, el péptido de unión al sustrato (SBP) de la presente invención puede ser una proteína de unión a heparina (HBP). Dicha proteína de unión a heparina se puede seleccionar, por ejemplo, de entre factor de crecimiento de unión a heparina 1 (humano) (HBGF-1), factor de crecimiento de unión a heparina 2 (humano) (HBGF-2), factor de crecimiento de unión a heparina 2 (humano)

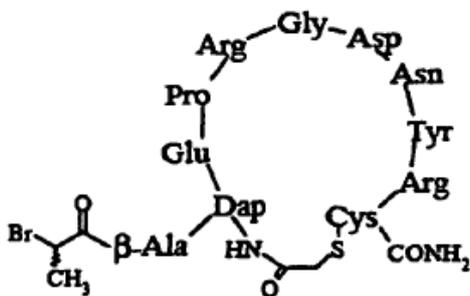
(HBGF-2, GenBank NM\_002006), FGF4 (GenBank NM\_002007), azurocidina (GenBank NM\_001700) o la proteína catiónica antimicrobiana de 37 kDa (CAP37), etc. Una proteína de unión a heparina (HBP) según lo definido anteriormente preferentemente forma parte de la proteína de fusión multifuncional de la invención y típicamente se une a heparina como sustrato. Por lo tanto, una proteína de unión a heparina (HBP) según lo definido anteriormente  
 5 permite la dimerización o incluso la multimerización de dos o más proteínas de unión a heparina con una (o más) molécula/s de heparina como sustrato/s. Por consiguiente, dicha molécula de unión a heparina, si está contenida en la proteína de fusión multifuncional de la invención, se puede usar para reticular de manera eficaz polímeros de PEG modificados con una proteína de fusión que contiene proteínas de unión a heparina tras la adición de heparina, produciendo la gelificación de los polímeros de PEG y la formación de un hidrogel de PEG disoluble sensible a  
 10 estímulos solo en base a las interacciones de proteína-sustrato-proteína. Dicho hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos también se puede degradar específicamente de nuevo cuando se añade un sustrato de competición, por ejemplo, heparina en exceso, es decir, en una cantidad suficiente para saturar todos los sitios de unión a heparina de una proteína de unión a la heparina. El hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulo se puede disolver además específicamente, cuando se añade una proteína de unión a heparina de competición, tal como cualquiera de las  
 15 proteínas de unión a heparina anteriormente mencionadas o, por ejemplo, receptor de la proteína de unión a heparina 2 (HBPR2), que se une específicamente a la heparina usada para la multimerización. Cuando se añade dicho sustrato competitivo y/o una proteína de unión a la heparina, las interacciones proteína-sustrato-proteína se interrumpen, y el gel se degrada.

20 La proteína de fusión multifuncional usada para modificar los polímeros de PEG del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención comprende además un péptido de unión a RGD repetitivo, que tiene más preferentemente la fórmula (RGD)<sub>n</sub>. Típicamente, dicho péptido de unión a RGD repetitivo de fórmula (RGD)<sub>n</sub> de la proteína de fusión multifuncional puede ser un péptido que contenga al menos una secuencia peptídica RGD, preferentemente al menos dos secuencias de péptido RGD, o incluso tres, cuatro, cinco o más secuencias de  
 25 péptido RGD, es decir, n puede ser 1, 2, 3, 4, 5 o incluso más, preferentemente, n es de 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 2 a 5, 2 a 4, 2 o 3, o 3 a 5, 3 a 4 o 4 a 5. En este contexto, una secuencia peptídica RGD es típicamente una secuencia que contiene los tres aminoácidos (consecutivos) RGD, que es la abreviatura de códigos de una letra de los aminoácidos para "arginina-glicina-aspartato", preferentemente en el orden indicado. Dicha secuencia RGD representa típicamente una parte de la secuencia de reconocimiento de las integrinas a las proteínas de la matriz extracelular.  
 30 En este contexto, las integrinas son conocidas como receptores que median la unión entre una célula y los tejidos que la rodean, por ejemplo, otras células o la matriz extracelular (ECM). Las integrinas también desempeñan un papel en la señalización celular y, por tanto, definen la forma celular, la movilidad y regulan el ciclo celular. Las secuencias de RGD, que se pueden utilizar para el propósito de la invención para permitir la unión de una célula con la proteína de fusión multivalente a través de las integrinas, se obtienen típicamente de una proteína o péptido de la  
 35 ECM que comprende una secuencia peptídica RGD, o una secuencia sintética, comprendiendo en cada caso la secuencia de aminoácidos arginina-glicina-aspartato ("RGD" en el código de aminoácidos de una letra). Dichas secuencias de adhesión específicas a células que se podrían incorporar a la proteína de fusión multifuncional de la invención son, por ejemplo, como las revisadas y enumeradas por Hersel *et al.* (2003) (véase Hersel *et al.*, "Biomaterials" 24 (2003), 4385-4415). Incluso más preferentemente, dichas secuencias RGD se pueden seleccionar de entre al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

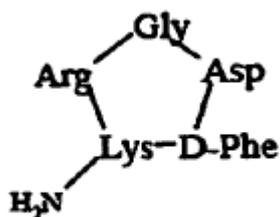
40 RGD (SEC ID N° 3), RGDS (SEC ID N° 4), (RGDS)<sub>n</sub> (SEC ID N° 5), donde n es preferentemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o incluso más, GRGD (SEC ID N° 6), RGDV (SEC ID N° 7), RGDT (SEC ID N° 8), GRGDG (SEC ID N° 9), GRGDS (SEC ID N° 10), GRGDY (SEC ID N° 11), GRGDF (SEC ID N° 12), YRGDS (SEC ID N° 13), YRGDG (SEC ID N° 14), YGRGD (SEC ID N° 15), GRGDSP (SEC ID N° 16), GRGDSPG (SEC ID N° 17), GRGDSP (SEC ID N° 18), GRGDSY (SEC ID N° 19), GRGDVY (SEC ID N° 20), GRGDSPK (SEC ID N° 21), CGRGDSPK (SEC ID N° 22), CGRGDSY (SEC ID N° 23), YAVTGRGDS (SEC ID N° 24) (armazón de tirosina mimético de RGD), AcCGNGEPRGD (SEC ID N° 25), YRAY-NH<sub>2</sub> (SEC ID N° 26), AcGCGYGRGDSPG (SEC ID N° 27), RGDSPASSKP (SEC ID N° 28), AcGRGDSPASSKG (SEC ID N° 29),  
 50

o se pueden seleccionar de entre secuencias RGD cíclicas tales como:

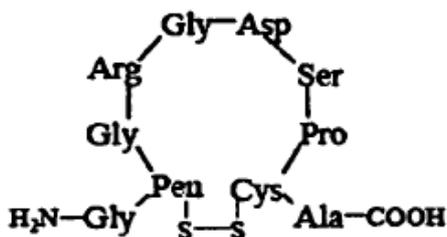
βAXEPRGDNYRC (SEC ID N° 30), donde X representa el aminoácido modificado Dap (ácido 2,3-diaminopropiónico), βA representa b-alanina, y esta secuencia RGD cíclica tiene la siguiente estructura:



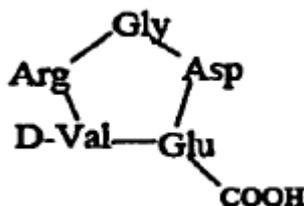
KRGDf (SEC ID N° 31), donde f representa la variante de D-aminoácido de fenilalanina, y donde esta secuencia RGD cíclica tiene la siguiente estructura:



- 5 GPenGRGDSPCA (SEC ID N° 32), donde Pen representa penicilina, y donde esta secuencia RGD cíclica tiene la siguiente estructura:



vRGDE (SEC ID N° 33), donde v representa la variante de D-aminoácido de valina, y donde esta secuencia RGD cíclica tiene la siguiente estructura:



10

o se puede seleccionar de entre una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 80%, preferentemente al menos un 90%, más preferentemente al menos un 95%, e incluso más preferentemente al menos un 97,5% de identidad con la secuencia de cualquiera de las SEC ID N° 3 a 33.

15

Las proteínas de fusión multifuncionales de la invención usadas para modificar los polímeros de PEG del hidrogel de PEG soluble sensible a estímulos de la invención pueden comprender además al menos un conector N- y/o C-terminal según lo definido en la reivindicación 1. Por consiguiente, el conector puede estar situado en el extremo N-terminal, en el extremo C-terminal o en el extremo N- y el extremo C-terminal de la proteína de fusión multifuncional de la invención. Dicho conector N- y/o C-terminal se puede usar para unir la proteína de fusión multifuncional de la invención con un polímero de PEG como se define en la presente memoria (o además) con un componente adicional según lo definido en la presente memoria) mediante un enlace covalente o un enlace no covalente (fuerte y específico). Un enlace no covalente (fuerte y específico) en el sentido de la presente invención es un enlace con una constante de disociación inferior a  $10^5$  M en condiciones fisiológicas. Los conectores adecuados en el contexto de la presente invención incluyen, por ejemplo, entidades formadoras de quelatos de tipo NTA y polihistidina de unión a un ión de metal multivalente, aminoácidos, un resto que contiene tiol tal como, por ejemplo, un aminoácido modificado con tiol o que contiene tiol, una cisteína, una homocisteína, cualquier resto adicional que contenga tiol, un tiol acoplado a maleimida, un resto de vinilsulfona, secuencias de péptidos, enlaces peptídicos, una HaloTag (Los

20

25

G. V. *et al.*, *Methods Mol Biol.* 356, 195-208, 2007), una SNAP-tag o una CLIP-tag (Gautier A. *et al.*, *Chem Biol.* 15, 128-36, 2008) o un enlace de reacción de transglutaminasa (Ehrbar M. *et al.*, *Biomaterials* 29, 1720-9, 2008). Para este propósito, el polímero de PEG como se emplea de acuerdo con la presente invención preferentemente se ha modificado correspondientemente antes de la introducción de la proteína de fusión multifuncional de la invención para permitir la unión covalente o no covalente de dicho conector con la proteína de fusión multifuncional de la invención.

En el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la presente invención al menos una proteína de fusión multifuncional está unida covalentemente a PEG.

De acuerdo con un aspecto muy específico, el conector de la proteína de fusión multifuncional de la invención es un resto que contiene tiol tal como, por ejemplo, un aminoácido modificado con tiol o que contiene tiol, una cisteína, una homocisteína, cualquier otro resto que contenga tiol, un tiol acoplado a maleimida o un resto vinilsulfona. Cuando se usa un resto que contiene tiol, la unión preferentemente con el polímero de PEG o un componente adicional se produce de forma covalente y, preferentemente, a través de un enlace tioéter. Para este propósito, por ejemplo, el polímero de PEG como se emplea de acuerdo con la presente invención (o un componente adicional) se ha modificado preferentemente de la manera correspondiente antes de la introducción de la proteína de fusión multifuncional de la invención para permitir la unión covalente del resto que contiene tiol con un grupo reactivo correspondiente de la proteína de fusión multifuncional de la invención, por ejemplo, a través de un enlace tioéter. El al menos un resto que contiene tiol N- y/o C-terminal también se pueden usar para unir covalentemente un componente adicional con la proteína de fusión multifuncional de la invención, por ejemplo, a través de un enlace tioéter. En el caso de que la proteína de fusión multifuncional de la invención solo comprenda un resto que contiene tiol, por ejemplo, un resto de cisteína, el resto que contiene tiol se usa preferentemente para unir covalentemente la proteína de fusión multifuncional de acuerdo con la presente invención con el polímero de PEG a través de un enlace tioéter. En el caso de que la proteína de fusión multifuncional de la invención usada para modificar los polímeros de PEG del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención comprenda dos restos que contienen tiol, es decir, en el extremo N- y el extremo C-terminal de la proteína de fusión multifuncional de la invención, el primer resto que contiene tiol se usa preferentemente para unir covalentemente la proteína de fusión multifuncional de acuerdo con la presente invención con el polímero de PEG a través de un enlace tioéter, y el segundo resto que contiene tiol se usa preferentemente para unir covalentemente un componente adicional con la proteína de fusión de la invención multifuncional a través de un enlace tioéter. En este contexto, dicho componente adicional puede ser bien una célula según lo definido en la presente memoria, una proteína según lo definido en la presente memoria, una proteína de fusión según lo definido en la presente memoria, otro polímero de PEG según lo definido en la presente memoria o cualquier otro componente según lo definido en la presente memoria, donde el componente adicional se ha modificado preferentemente de la manera correspondiente antes de preparar dicho enlace para permitir la unión covalente con el resto que contiene tiol de la proteína de fusión multifuncional de la invención, por ejemplo, a través de un enlace tioéter.

La proteína de fusión multifuncional de la invención también puede contener un marcador para la purificación (marcador de purificación o marcador), es decir, un tramo de aminoácidos añadido a la proteína de fusión multifuncional de la invención que permite la recuperación de la proteína de fusión por su afinidad única. Preferentemente, el marcador de purificación se añade bien al extremo N- o C-terminal de la proteína o péptido de fusión (o cerca del mismo, por ejemplo, como un segundo componente del péptido de fusión determinado a partir de bien el extremo C- o N-terminal) para asegurar su accesibilidad y no perturbar el plegamiento proteico de los diferentes componentes de la proteína o del péptido de fusión. Los marcadores de purificación en el contexto de la presente invención comprenden, por ejemplo un marcador His<sub>6</sub>, un marcador FLAG, un marcador HA, un marcador MYC, etc. En este contexto, un marcador de His es preferentemente un marcador que consiste en 6 residuos de histidina (His) (marcador His<sub>6</sub>) que permite que la proteína de fusión multifuncional de la invención se recupere por afinidad a una columna de níquel o cobalto. Un marcador FLAG comprende, preferentemente, por ejemplo, la secuencia DYKDDDDK (SEC ID N° 34) o una secuencia adicional, y permite la recuperación de la proteína de fusión multifuncional de la invención con un anticuerpo específico. Un marcador HA en el contexto de la presente invención es típicamente una fusión con un epítipo derivado de la proteína de la gripe hemaglutinina (HA): por ejemplo, YPYDVP (SEC ID N° 35), y permite la recuperación con un anticuerpo HA. Finalmente un marcador MYC es, por lo general, una fusión con un epítipo derivado de la proto-oncoproteína MYC humana: por ejemplo, ILKKATAYIL (SEC ID N°: 36), EQKLISEEDL (SEC ID N°: 37), y permite la recuperación con un anticuerpo MYC. Los expertos en la materia conocen otros marcadores de purificación, y se pueden adaptar y son aptos para su uso en el contexto de la proteína de fusión multifuncional de la invención.

La proteína de fusión multifuncional usada para modificar los polímeros de PEG del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención también puede comprender un dominio de unión adicional, por ejemplo, un dominio ZZ, que permite la unión de un dominio F<sub>c</sub> y, de este modo, la conjugación de otro componente (péptido o proteína) con el dominio ZZ a través de un dominio F<sub>c</sub>. Dicho dominio ZZ, adecuado para el propósito de la presente invención, se puede seleccionar de entre un dominio ZZ como, por ejemplo, el definido en el vector pEZZ-18, GE healthcare, o como el definido en Ishikawa-Sakurai *et al.* (2004) (véase Ishikawa-Sakurai *et al.*, "Human Molecular Genetics", 2004, Vol. 13, N° 7 693-702), preferentemente, una secuencia de acuerdo con AKHQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGR (SEC ID N° 38), o una secuencia de acuerdo con

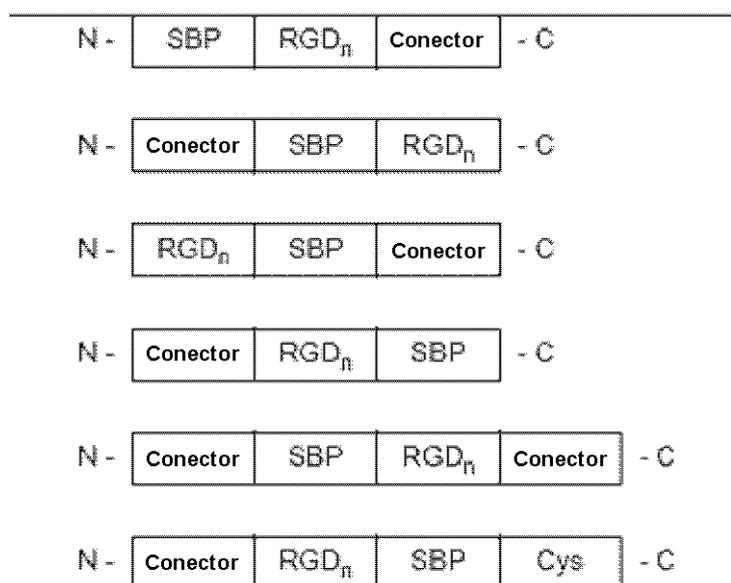
AKHQAKCNICKECPVGFYRSLKHFNYDVCQSCFFSGR (SEC ID N° 39), que muestra los dominios ZZ de la distrofina (SEC ID N° 38) y la utrofina (SEC ID N° 39), o una secuencia de acuerdo con (M)AQHDEAVDNKFNKEQQNAFYELHLPNLNNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAPKVDNKFNKEQQN AFYEILHLPNLNNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKK LNDAPKVDANSS (SEC ID N° 40 (véanse también los aminoácidos 1 o 2 a 129 de la Figura 7)), o una secuencia de aminoácidos que muestra un 80%, preferentemente, al menos un 90%, más preferentemente, al menos un 95%, e incluso más preferentemente al menos un 97,5% de identidad con la secuencia de cualquiera de entre SEC ID N° 38 a 40.

La unión de la proteína de fusión multifuncional de la invención según lo definido de acuerdo con la presente invención (y, opcionalmente, un sustrato específico o cualquier compuesto adicional) con un polímero de PEG según lo definido en la presente memoria, por ejemplo, a través de un conector según lo definido anteriormente, se puede producir mezclando los componentes y variando preferentemente la concentración de los componentes que se van a unir en los intervalos definidos en la presente memoria. Esto permite preferentemente que los componentes interactúen entre sí, formando de este modo un enlace.

Además de dichos conectores definidos anteriormente, que son adecuados para unir la proteína de fusión multifuncional de la invención, opcionalmente un sustrato específico o cualquier compuesto adicional con un polímero de PEG y, de ese modo, reticular los polímeros para formar un hidrogel de PEG, se pueden introducir otros conectores (reticuladores) en el hidrogel de PEG sensible a estímulos de la invención, en los polímeros de PEG usados para ello o en la proteína de fusión multifuncional definida de acuerdo con la presente invención. Esto puede permitir una mayor reticulación (química) del hidrogel de PEG sensible a estímulos de la invención. Los agentes de reticulación adecuados son, por ejemplo, cualquier compuesto homo- o heterofuncional que muestre al menos dos sitios para la unión a otra molécula, como los descritos en "Bioconjugate Techniques" (II edición por Greg T. Hermanson, Academic Press, 2008).

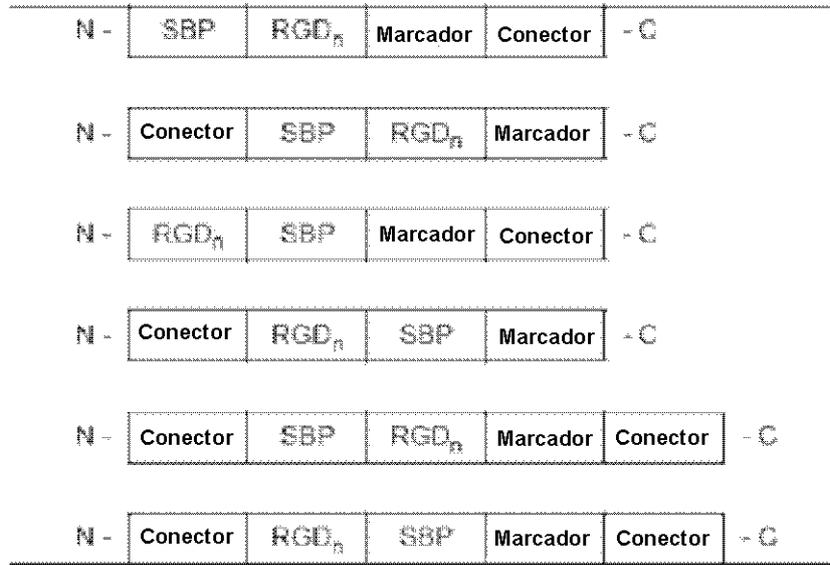
Los componentes de la proteína de fusión multifuncional de la invención usados para modificar los polímeros de PEG pueden estar situados en cualquier posición de la proteína de fusión, determinada con respecto al extremo N- y/o C-terminal de la proteína de fusión multifuncional de la invención. Sin embargo, es preferible que la proteína de fusión multifuncional de la invención se componga para permitir tanto la multimerización eficaz de los péptidos de unión al sustrato (SBP) debido a la interacción con su sustrato específico como la unión del péptido de unión al sustrato (SBP) con su sustrato específico, y en paralelo, la unión eficaz de las células. Además, deberá permitir opcionalmente la unión de otras moléculas, por ejemplo, a través de otras secuencias de unión.

Por consiguiente, la proteína de fusión multifuncional de la invención puede contener el péptido de unión al sustrato (SBP), un péptido de unión a RGD repetitivo según lo definido anteriormente y al menos un conector N- y/o C-terminal, por ejemplo, en al menos uno de los siguientes órdenes (del terminal N al terminal C (que se define como N- o -C)):

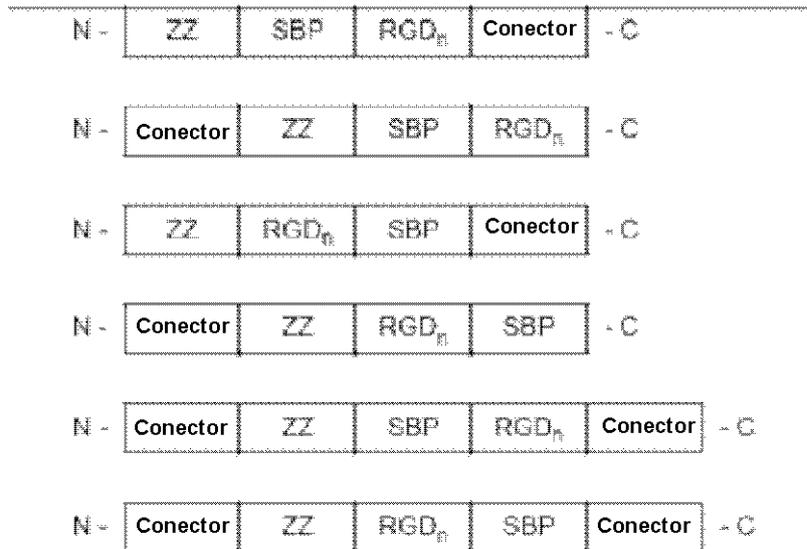


40 etc.

Además, la proteína de fusión multifuncional de la invención puede contener el péptido de unión al sustrato (SBP), un péptido de unión a RGD repetitivo y al menos un conector N- y/o C-terminal y un marcador para la purificación, por ejemplo, en al menos uno de los siguientes órdenes (del terminal N al terminal C (que se define como N- o -C)):



5 La proteína de fusión multifuncional de la invención también puede contener el péptido de unión al sustrato (SBP), un péptido de unión a RGD repetitivo y al menos un conector N- y/o C-terminal, un dominio de unión a ZZ según lo definido en la presente memoria y, opcionalmente, un marcador para la purificación, por ejemplo, en al menos uno de los siguientes órdenes (del terminal N al terminal C (que se define como N- o -C)):



0



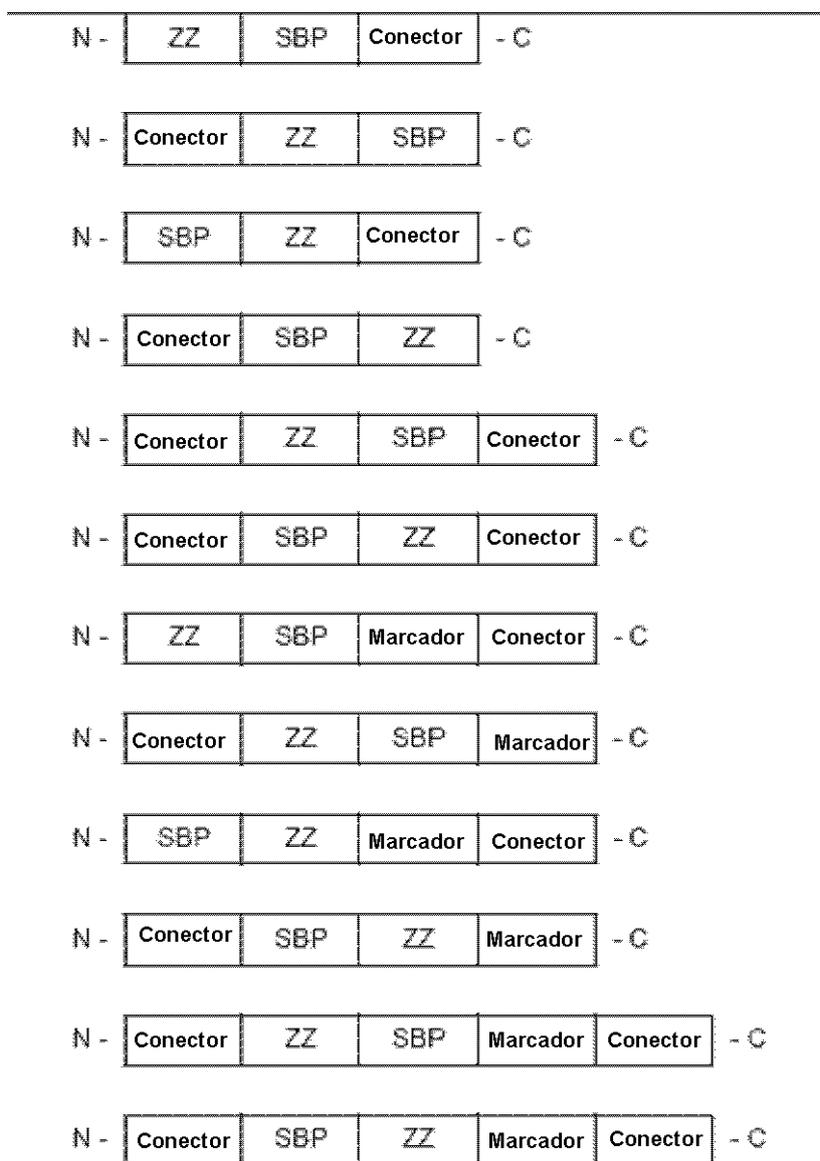
o



etc.

5 Además o como alternativa, la al menos una proteína de fusión multifuncional usada para modificar los polímeros de PEG puede comprender como componentes un péptido de unión al sustrato (SBP) según lo definido anteriormente, preferentemente un dominio ZZ según lo definido anteriormente, preferentemente un marcador para la purificación según lo definido anteriormente y al menos un conector N- y/o C-terminal. Por consiguiente, la proteína de fusión

10 multifuncional de la invención puede contener como componentes un péptido de unión al sustrato (SBP) según lo definido anteriormente, preferentemente, un dominio ZZ según lo definido anteriormente, preferentemente, un marcador para la purificación según lo definido anteriormente y al menos un conector N- y/o C-terminal, por ejemplo, en al menos uno de los siguientes órdenes (del terminal N al terminal C (que se define como N- o -C)):



etc.

5 Los diferentes componentes de la al menos una proteína de fusión multifuncional según lo definido de acuerdo con la presente invención están preferentemente unidos directamente entre sí o a través de un espaciador. Si los diferentes componentes de la proteína de fusión multifuncional están unidos a través de un espaciador, el espaciador es preferentemente un espaciador peptídico. Un espaciador peptídico tiene típicamente una longitud de 1 a 20, preferentemente de 1 a 10 aminoácidos, más preferentemente de 1 a 5, aún más preferentemente de 1 a 3 aminoácidos. En algunos casos, la secuencia del espaciador peptídico puede ser incluso más larga, comprendiendo 10 de 21 a 50 aminoácidos. Un espaciador peptídico puede estar compuesto de varias secuencias de aminoácidos. Por consiguiente, dicho espaciador peptídico se inserta preferentemente a través de enlaces peptídicos entre al menos dos componentes de la proteína de fusión multifuncional según lo definido de acuerdo con la presente invención, más preferentemente entre tres, cuatro o incluso cinco o todos los componentes de la proteína de fusión multifuncional, según lo definido de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, un espaciador peptídico 15 introducirá cierta flexibilidad estructural entre los componentes individuales de la proteína de fusión multifuncional que se va a unir. Al introducir dicho espaciador, se logra una flexibilidad estructural, por ejemplo, al tener un espaciador peptídico que contiene varios residuos de glicina o prolina y, opcionalmente, residuos de serina, preferentemente al menos un 30%, más preferentemente al menos un 40% e incluso más preferentemente al menos un 60, 70, 75, 80, 85, 90 o incluso un 95 o 100% de residuos prolina y/o glicina de la secuencia del espaciador peptídico y, opcionalmente, del 1 al 10, 1 al 20, 1 al 30 o 1 al 40% de los residuos de serina de la secuencia del 20 espaciador peptídico, por ejemplo, un espaciador que muestra una secuencia, por ejemplo, de acuerdo con (SGGG)<sub>n</sub> (SEC ID N° 41), (SGGGG)<sub>n</sub> (SEC ID N° 42) o (SGGGGG)<sub>n</sub> (SEC ID N° 43), donde n es preferentemente 1, 2, 3, 4, 5, etc. Además, dicho espaciador puede proporcionar una distancia suficiente al resto de los componentes de la

proteína de fusión multifuncional, si es necesario. Con independencia de su estructura (espaciador peptídico), el espaciador puede ser preferentemente inmunológicamente inactivo. Los espaciadores apropiados pueden ser seleccionados y preparados fácilmente por cualquier experto en la materia.

5 Las proteínas de fusión multifuncionales de la invención particularmente preferidas según lo definido en la presente memoria se pueden seleccionar de entre proteínas de fusión multifuncionales de acuerdo con pRG107 (secuencia de ácido nucleico codificante: SEC ID N ° 44, secuencia de proteína: SEC ID N °: 45), pRG11 (secuencia de ácido nucleico codificante: SEC ID N ° 46, secuencia de proteína: SEC ID N ° 47) o pRG116 (secuencia de ácido nucleico codificante: SEC ID N ° 48, secuencia de proteína: SEC ID N ° 49) o una secuencia de aminoácidos que muestra al  
10 menos un 80%, preferentemente al menos un 90%, más preferentemente al menos un 95%, e incluso más preferentemente al menos un 97,5% de identidad con la secuencia de cualquiera de las SEC ID N ° 45, 47 o 49, o codificada por una secuencia de ácido nucleico que muestra al menos un 80% , preferentemente al menos un 90%, más preferentemente al menos un 95%, e incluso más preferentemente al menos un 97,5% de identidad con la secuencia de cualquiera de las SEC ID N es 44, 46 o 48 (véanse también las figuras 6, 7 y 8).

15 Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de proteína o péptido según lo definido en la presente memoria, estas se pueden alinear para posteriormente compararlas entre sí. Por lo tanto, por ejemplo, se pueden insertar huecos en la primera secuencia y se puede comparar el componente de la posición correspondiente de la segunda secuencia. Si una posición de la primera secuencia está ocupada por el mismo componente que el situado  
20 en una posición de la segunda secuencia, las dos secuencias son idénticas en esta posición. El porcentaje en el que dos secuencias son idénticas es una función del número de posiciones idénticas dividido entre el número total de posiciones. El porcentaje en el que dos secuencias son idénticas se puede determinar usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido de algoritmo matemático que se puede usar es el algoritmo de Karlin *et al.* (1993), PNAS EE.UU., 90:5873-5877 o Altschul *et al.* (1997), *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402. Dicho algoritmo  
25 está integrado en el programa BLAST. Las secuencias que son idénticas a las secuencias descritas en la presente invención en un cierto grado se pueden identificar con este programa. Lo mismo se aplica de manera análoga a las secuencias de ácidos nucleicos.

30 La presente invención también proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de fusión multifuncional, según lo definido anteriormente, secuencias de vectores, en particular, vectores de expresión y células, transfectadas con dichas secuencias de ácido nucleico. Las secuencias de ácido nucleico pueden ser ADN, ARN, de cadena sencilla, de doble cadena, circular y/o lineal.

35 Se puede usar cualquiera de las alternativas anteriores de la proteína de fusión multifuncional de la invención, según lo definido anteriormente, para modificar los polímeros de PEG y formar el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención, por ejemplo, una proteína de fusión multifuncional que comprende como componentes un péptido de unión al sustrato (SBP), preferentemente, un péptido de unión RGD repetitivo tal como (RGD)<sub>n</sub> y/o un dominio de unión a ZZ, preferentemente, un marcador para la purificación y al menos un resto de cisteína N- y/o C-terminal o una proteína de fusión multifuncional que comprende como componentes de un péptido de unión al  
40 sustrato (SBP) según lo definido anteriormente, preferentemente, un dominio ZZ según lo definido anteriormente, preferentemente un marcador para la purificación según lo definido anteriormente y al menos un resto de cisteína N- y/o C-terminal según lo definido anteriormente, etc.

45 Dependiendo del tipo y/o de la cantidad de diferentes proteínas de fusión multifuncionales, según lo definido de acuerdo con la presente invención, más concretamente, del número de los conectores específicos contenidos en cada una de las diferentes proteínas de fusión multifuncionales, el grado de reticulación del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención puede verse afectado. Además, se pueden modificar correspondientemente el contenido de otros componentes del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención, el contenido de, por ejemplo, componentes tales como las células que se unen a una secuencia RGD según lo definido en la presente memoria de la proteína de fusión multifuncional de la invención, o la unión de componentes adicionales tales como un componente adicional (péptido o proteína) con el dominio ZZ a través de su dominio F<sub>c</sub>.

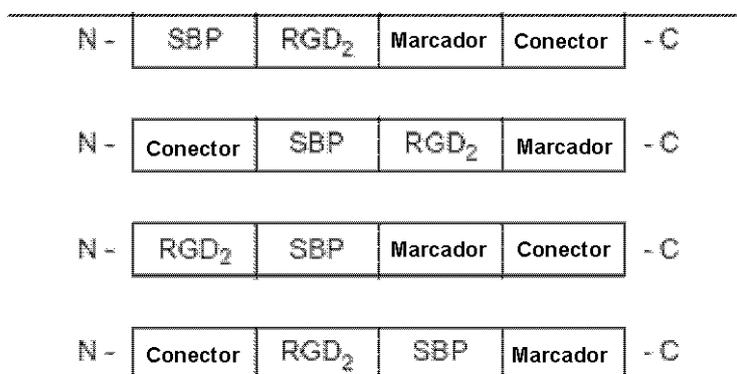
50 Particularmente preferida como proteína de fusión multifuncional de la invención para modificar el grado de reticulación del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención son las proteínas de fusión multifuncionales según lo definido anteriormente y, aún más preferentemente, como las seleccionadas de entre las siguientes:

- 60 a) proteínas de fusión multifuncionales según lo definido en la presente memoria que solo tienen un conector según lo definido anteriormente;
- b) proteínas de fusión multifuncionales según lo definido en la presente memoria que tienen dos conectores según lo definido anteriormente;
- c) una combinación de proteínas de fusión multifuncionales según lo definido en la presente memoria que solo tienen un conector según lo definido anteriormente y de proteínas de fusión multifuncionales según lo definido  
65 en la presente memoria que tienen dos conectores según lo definido anteriormente.

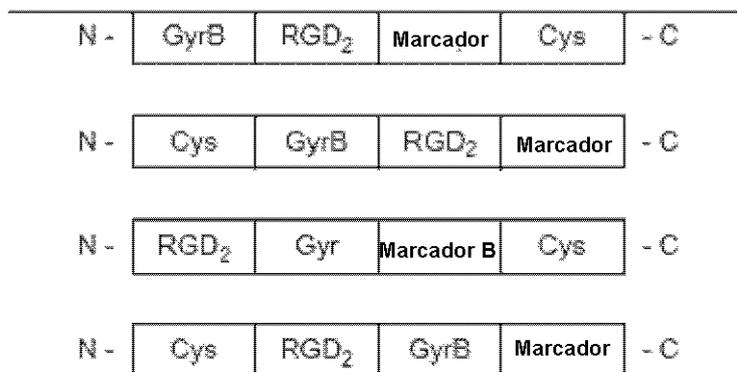
Se prefiere muy particularmente una combinación de proteínas de fusión multifuncionales según lo definido en la presente memoria que solo tienen un conector según lo definido anteriormente y proteínas de fusión multifuncionales según lo definido en la presente memoria que tienen dos conectores según lo definido anteriormente, aunque se pueden usar solo las proteínas de fusión multifuncionales según lo definido en la presente memoria que solo tienen un conector según lo definido anteriormente y solo las proteínas de fusión multifuncionales según lo definido en la presente memoria que tienen dos conectores.

Preferentemente, las proteínas de fusión multifuncionales según lo definido en la opción c) se pueden seleccionar de entre cualquiera de las proteínas de fusión multifuncionales mencionados anteriormente, más preferentemente de una mezcla o combinación de proteínas de fusión multifuncionales según lo definido en la presente memoria que solo tienen un conector según lo definido anteriormente y que contienen una proteína de unión al sustrato (SBP), una secuencia RGD tal como (RGD<sub>n</sub>), opcionalmente, un marcador para la purificación y un conector N- o C-terminal, y dichas proteínas de fusión multifuncionales según lo definido en la presente memoria que tienen dos conectores según lo definido anteriormente y que contienen una proteína de unión al sustrato (SBP), una secuencia RGD tal como (RGD<sub>n</sub>), opcionalmente un marcador para la purificación y un conector N-terminal y un C-terminal.

En este contexto, las proteínas de fusión multifuncionales ejemplares según lo definido en la presente memoria que solo tienen un conector según lo definido anteriormente se pueden seleccionar de entre las siguientes:

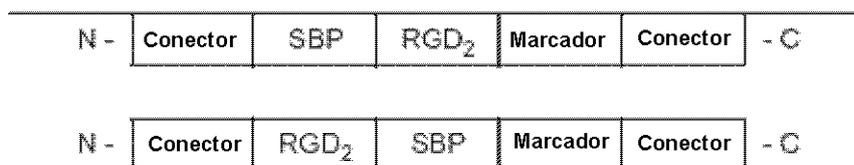


más preferentemente, se seleccionan de entre:



Además, las proteínas de fusión multifuncionales ejemplares según lo definido en la presente memoria que tienen dos conectores según lo definido anteriormente se pueden seleccionar de entre las siguientes:

25



más preferentemente de entre:

N -	Cys	GyrB	RGD <sub>2</sub>	Marcador	Cys	- C
N -	Cys	RGD <sub>2</sub>	GyrB	Marcador	Cys	- C

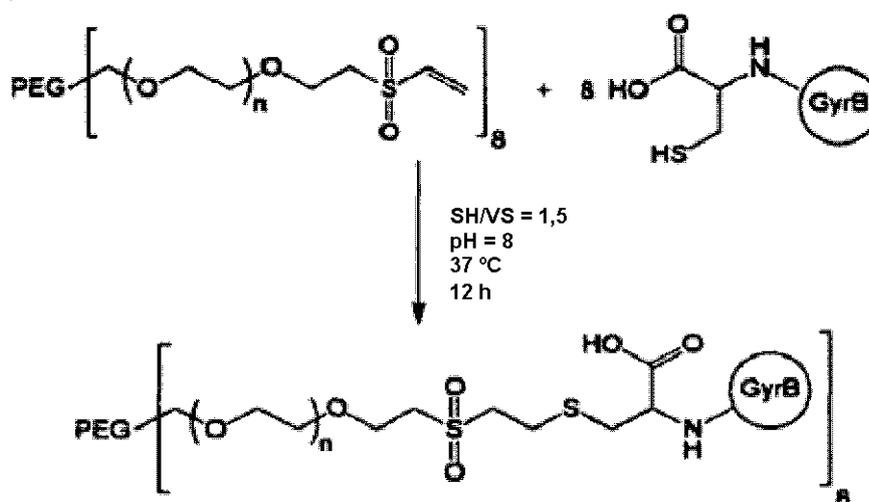
El hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención de acuerdo con la presente invención comprende preferentemente una matriz de polímeros de PEG, que están modificados para contener al menos una proteína de fusión multifuncional según lo definido anteriormente. Como se define en la presente memoria, PEG se define como polietilenglicol (PEG), un compuesto de poliéter con muchas aplicaciones que van de la fabricación industrial a la medicina. El PEG también se conoce como óxido de polietileno (PEO) o polioxietileno (POE), preferentemente dependiendo de su peso molecular. El PEG, PEO o POE a veces se usan como sinónimos y se refieren a un oligómero o un polímero de óxido de etileno. Los tres nombres son sinónimos desde el punto de vista químico, aunque históricamente el PEG ha tendido a referirse a oligómeros y polímeros con una masa molecular por debajo de 20.000 g/mol, PEO a los polímeros con una masa molecular superior a 20.000 g/mol y POE a un polímero de cualquier masa molecular. El PEG y PEO son típicamente líquidos o sólidos de bajo punto de fusión, en función de sus pesos moleculares. Los PEG se preparan por polimerización de óxido de etileno y se encuentran disponibles en el mercado en un amplio intervalo de pesos moleculares de 300 g/mol a 10.000.000 g/mol. Aunque el PEG y el PEO con diferentes pesos moleculares encuentran uso en diferentes aplicaciones y tienen diferentes propiedades físicas, por ejemplo, la viscosidad, debido a los efectos de la longitud de cadena, sus propiedades químicas son casi idénticas. También hay disponibles diferentes formas de PEG dependiendo del iniciador usado para el proceso de polimerización, siendo el más común de ellos un PEG-metil-éter monofuncional (metoxipoli(etilenglicol)), abreviado como mPEG. Los PEG de peso molecular inferior también están disponibles como oligómeros puros, denominados monodispersos, uniformes o discretos. También hay PEG disponibles con diferentes geometrías. Los PEG estrella *Branchedor* tienen de aproximadamente 3 a 100 cadenas de PEG (brazos) que emanan de un núcleo central. Los PEG *Comb* tienen múltiples cadenas de PEG normalmente injertadas a una cadena principal de polímero. Se puede utilizar cualquiera de dichos polímeros de PEG en el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención según lo definido anteriormente.

En el contexto de la presente invención, los polímeros de PEG para su uso en el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención según lo definido anteriormente se puede seleccionar preferentemente de entre polímeros de PEG, polímeros de PEO y/o polímeros de POE según lo definido anteriormente, preferentemente dentro de un peso molecular de aproximadamente 300 g/mol a 10.000.000 g/mol, más preferentemente dentro de un peso molecular de aproximadamente 300-50.000 Da, incluso más preferentemente dentro de un peso molecular de aproximadamente 300-38.000 Da, etc., lo más preferentemente dentro de un peso molecular de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 kDa, por ejemplo, dentro de un peso molecular de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 kDa, dentro de un peso molecular de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 kDa, por ejemplo, dentro de un peso molecular de aproximadamente 35 a aproximadamente 40 kDa, por ejemplo, 37,5 kDa. Más preferentemente, los polímeros de PEG para su uso en el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención según lo definido anteriormente se pueden seleccionar de entre cualquier polímero de PEG según lo definido anteriormente, y tienen preferentemente diferentes geometrías tales como PEG ramificados, por ejemplo, que tienen de aproximadamente 3 a 10 cadenas de PEG que emanan de un núcleo central, o por ejemplo, PEG estrella que tienen de aproximadamente 10 a 100 cadenas de PEG que emanan de un núcleo central según lo definido en la presente memoria. Incluso más preferentemente, los polímeros de PEG para su uso en el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención según lo definido anteriormente se pueden seleccionar de entre cualquiera de dichos polímeros de PEG según lo definido en la presente memoria, más preferentemente de entre polímeros de PEG que tienen un peso molecular según lo definido anteriormente y que tienen, preferentemente, diferentes geometrías según lo definido en la presente memoria, tales como PEG estrella que tienen, por ejemplo, de aproximadamente 3 a aproximadamente 100 cadenas de PEG (brazos) que emanan de un núcleo central, preferentemente que tienen de aproximadamente 3 a aproximadamente 50, de 3 a aproximadamente 30 o de 3 a aproximadamente 20 cadenas de PEG (brazos) que emanan de un núcleo central. Los PEG estrella, que son particularmente preferidos para su uso en el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención según lo definido anteriormente, pueden ser un polímero de PEG según lo definido anteriormente que tiene 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 o más cadenas (brazos) que emanan de un núcleo central, es decir, que son un polímero de PEG estrella de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 brazos. Dichos polímeros de PEG también se denominan PEG estrella de múltiples brazos, por ejemplo, PEG estrella de 3 a 15 brazos.

En el contexto de la presente invención, los polímeros de PEG para su uso en el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención según lo definido anteriormente se pueden modificar para permitir un enlace covalente o no covalente con la proteína de fusión multifuncional de la invención según lo definido en la presente memoria.

Al menos una proteína de fusión multifuncional está unida covalentemente con el PEG. Dicho enlace covalente o no covalente es preferentemente como se ha definido anteriormente. En un caso preferido, dicho enlace es un enlace

covalente. Más preferentemente, dicho enlace es un enlace tioéter. Dicho enlace tioéter se puede formar mediante la reacción de un resto que contiene SH o tior de la proteína de fusión multifuncional de la invención según lo definido anteriormente, por ejemplo, de una cisteína, con un resto de vinilsulfona o cualquier resto adicional que permita la formación de un enlace tioéter. Para este propósito, el resto que contiene SH o tior de la proteína de fusión multifuncional de la invención según lo definido anteriormente se ha reducido antes de la reacción con el resto de vinilsulfona o el resto adicional usando un agente reductor, preferentemente TCEP. Esta etapa evita que el resto de tior reaccione con un enlace disulfuro y permite la formación de un enlace tioéter. En este contexto, los polímeros de PEG para su uso en el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención proporcionan preferentemente al menos un resto de vinilsulfona libre para el enlace tioéter o cualquier resto adicional que permite la formación de un enlace tioéter. Por consiguiente, el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención se puede modificar antes de la reticulación para introducir dicha modificación. La modificación puede comenzar, por ejemplo, a partir de un polímero de PEG-OH de un polímero de PEG según lo definido anteriormente, preferentemente, de un PEG estrella de múltiples brazos según lo definido anteriormente. A continuación, se muestra una reacción de modificación ejemplar:



De acuerdo con un aspecto específico, dicha modificación se puede producir por sulfonación del polímero de PEG-OH de un polímero de PEG según lo definido anteriormente, preferentemente un PEG estrella de múltiples brazos según lo definido anteriormente, conduciendo típicamente a un PEG estrella-vinilsulfona (PEG-VS). De acuerdo con un protocolo muy específico, es posible sintetizar un PEG estrella-vinilsulfona (PEG-VS) de múltiples brazos de acuerdo con Lutolf *et al.* (2003) (véase Lutolf M. P., Hubbell J. A., 2003, "Synthesis and physicochemical characterization of end-linked poly(ethylene glycol)-co-peptide hydrogels formed by Michael-type addition". *Bio-macromolecules* 4(3):713-22) a partir de un PEG-OH de 8 brazos (Shearwater Polymers, Huntsville, AL). Los PEG-VS de múltiples brazos se pueden sintetizar, por ejemplo, mediante el acoplamiento de PEG-OH con un exceso de divinilsulfona (Aldrich, Buchs, Suiza). Como ejemplo, se puede disolver PEG-OH en un disolvente, por ejemplo, diclorometano o, en algunos casos, el PEG se puede secar por destilación azeotrópica, por ejemplo, en tolueno, por ejemplo, usando una trampa Dean Stark antes de iniciar la reacción. Al PEG disuelto en diclorometano, se puede añadir NaOH, preferentemente en atmósfera de argón, preferentemente con un exceso molar frente a los grupos OH, por ejemplo, de 4 a 6 veces, por ejemplo de 5 veces. Después de la evolución del hidrógeno, se puede añadir divinilsulfona en exceso molar frente a los grupos OH, preferentemente a 50 a 100 veces. La reacción se lleva a cabo típicamente a temperatura ambiente, preferentemente durante 1 a 3 días, por ejemplo, de 2 a 3 o incluso durante 3 días, preferentemente en atmósfera de argón con agitación constante. Tras ello, típicamente, se neutraliza la solución de reacción, preferentemente con ácido concentrado, por ejemplo, ácido acético, se filtra y se reduce hasta un volumen pequeño. A continuación, se puede hacer precipitar el PEG mediante la adición de la solución restante en éter dietílico enfriado en hielo. Entonces, se puede recuperar el polímero por filtración, lavar con, por ejemplo, éter dietílico, y secar, preferentemente al vacío. Luego se puede disolver el polímero seco en agua desionizada que contiene cloruro de sodio y extraer en diclorometano. Esta solución se puede secar con carbonato de sodio y se puede reducir el volumen por evaporación. Por último, se puede volver a hacer precipitar el producto y lavarlo, por ejemplo, con éter dietílico, para eliminar toda la divinilsulfona restante. El producto final se puede secar al vacío y almacenar en gas inerte, por ejemplo, argón, preferentemente a 20 °C. La derivatización se puede confirmar con RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ). El grado de conversión de grupos terminales, mostrado por RMN, se encuentra preferentemente en un intervalo del 90 al 99%, más preferentemente en un intervalo de 95 al 98%. Se puede usar además cromatografía de permeación en gel para confirmar que el material de partida (PEG-OH) y el PEG-VS terminalmente funcionalizado tienen distribuciones de peso molecular idénticas.

También se pueden unir otros compuestos químicos a los polímeros de PEG según lo definido en la presente memoria a través de cualquier enlace como se ha indicado anteriormente o cualquier otra unión química que sea posible, por ejemplo, mediante la formación de amidas (por ejemplo, ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, aminas, etc.), mediante la adición de Michael (por ejemplo, restos de maleinimida, carbonilos insaturados, etc.), mediante

química clic (por ejemplo, azidas o alquinos), mediante metatesis de alqueno/alquino (por ejemplo, alquenos o alquinos), la formación de iminas o hidrozonas (aldehídos o cetonas, hidrazinas, hidroxilaminas, aminas), las reacciones de formación de complejos (avidina, biotina, proteína G) o componentes que permitan reacciones de sustitución de tipo Sn (por ejemplo, halogenalcános, tioles, alcoholes, aminas, hidrazinas, hidrazidas, ésteres de ácidos sulfónicos, sales de oxifosfonio) u otros restos químicos que se pueden utilizar en la unión de otros componentes. Dichas otras uniones químicas posibles también se pueden usar para unir covalentemente otros componentes según lo definido en la presente memoria, tales como la proteína multifuncional fusión de la invención, otros componentes, células, etc. con polímeros de PEG según lo definido en la presente memoria.

El objeto subyacente de la presente invención se resuelve además mediante un método para la preparación del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención, preferentemente un hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos según lo definido anteriormente. Típicamente, el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención, que comprende una matriz de polímeros de PEG según lo definido anteriormente, se puede preparar de acuerdo con las siguientes etapas:

- a) proporcionar al menos una proteína de fusión multifuncional según lo definido en la presente memoria;
- b) mezclar la al menos una proteína de fusión multifuncional de acuerdo con la etapa a) con un sustrato para la proteína de unión al sustrato (SBP) según lo definido anteriormente;
- c) añadir la mezcla obtenida de acuerdo con la etapa b) a un polímero de PEG según lo definido en la presente memoria; y formar de este modo preferentemente el hidrogel de PEG.

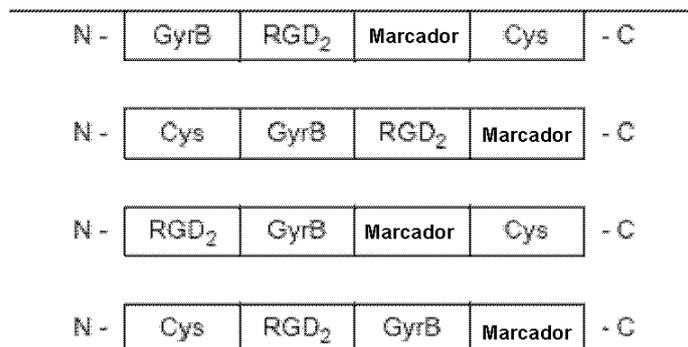
En la etapa a) del método para la preparación del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención, se proporciona al menos una proteína de fusión multifuncional. Como ya se ha tratado anteriormente, el grado de reticulación del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención puede verse influido selectivamente por el uso de un tipo específico y/o una cantidad de diferentes proteínas de fusión multifuncionales según lo definido de acuerdo con la presente invención, más concretamente, mediante el uso de proteínas de fusión multifuncionales según lo definido en la presente memoria que solo tienen uno o dos conectores según lo definido en la presente memoria, por ejemplo, uno o dos restos que contienen tiol, cisteínas o homocisteínas. Como se puede entender fácilmente, las proteínas de fusión multifuncionales según lo definido en la presente memoria que solo tienen un conector generalmente darán lugar a un tipo diferente de reticulación que las proteínas de fusión multifuncionales según lo definido en la presente memoria que tienen dos conectores.

Por consiguiente, en la etapa a) del método para la preparación del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención, se pueden proporcionar diferentes proteínas de fusión multifuncionales según lo definido en la presente memoria, preferentemente para modificar el tipo y grado de reticulación del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención. En consecuencia, en la etapa a) del método de preparación del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención, se pueden usar preferentemente:

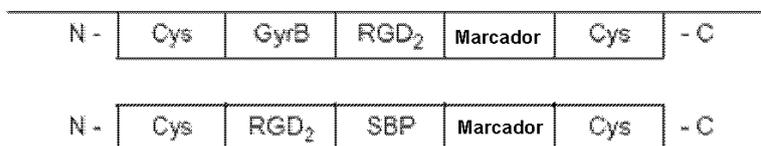
- a) proteínas de fusión multifuncionales según lo definido en la presente memoria que solo tienen un conector según lo definido anteriormente;
- b) proteínas de fusión multifuncionales según lo definido en la presente memoria que tienen dos conectores según lo definido anteriormente; y/o
- c) proteínas de fusión multifuncionales según lo definido en la presente memoria que solo tienen un conector según lo definido anteriormente y proteínas de fusión multifuncionales según lo definido en la presente memoria que tienen dos conectores según lo definido anteriormente.

Una opción muy preferida es la c), es decir, una mezcla o combinación de proteínas de fusión multifuncionales según lo definido en la presente memoria que solo tienen un conector según lo definido anteriormente y proteínas de fusión multifuncionales según lo definido en la presente memoria que tienen dos conectores según lo definido anteriormente.

En este contexto, las proteínas de fusión multifuncionales ejemplares según lo definido en la presente memoria para la etapa a) del método de preparación del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención que solo tienen un conector según lo definido anteriormente se pueden seleccionar más preferentemente, por ejemplo, de entre las siguientes:



Además, las proteínas de fusión multifuncionales ejemplares según lo definido en la presente memoria para la etapa a) del método de preparación del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención que tienen dos conectores según lo definido anteriormente se pueden seleccionar más preferentemente de entre las siguientes:

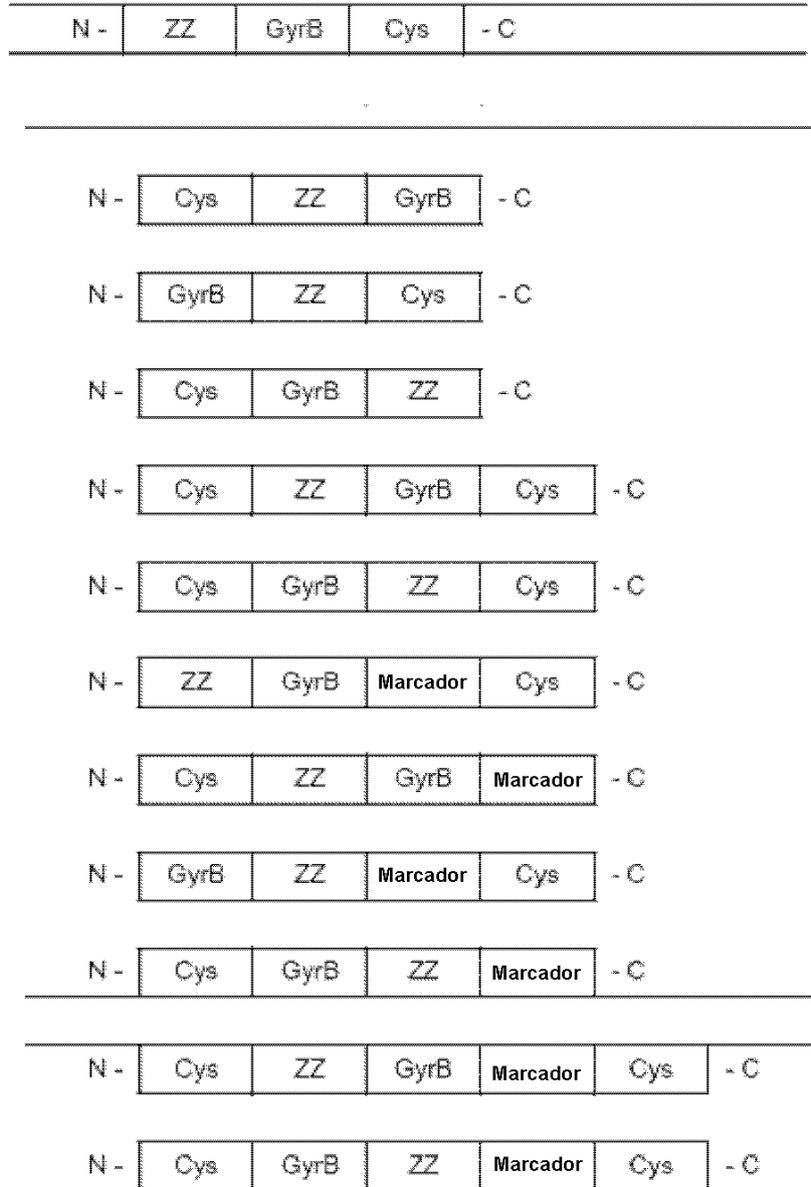


Preferentemente, la relación molar entre las proteínas de fusión multifuncionales que solo tienen un conector y las proteínas de fusión multifuncionales que tienen dos conectores, como se puede usar en la etapa a) del método de la invención, es preferentemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 1, aproximadamente 10 a aproximadamente 1, aproximadamente 5 a aproximadamente 1, aproximadamente 4 a aproximadamente 1, aproximadamente 3 a aproximadamente 1, aproximadamente 2 a aproximadamente 1, aproximadamente 1 a aproximadamente 1, aproximadamente 1 a aproximadamente 2, aproximadamente 1 a aproximadamente 3, aproximadamente 1 a aproximadamente 4, aproximadamente 1 a aproximadamente 5, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 o incluso aproximadamente 1 a aproximadamente 20. Más preferentemente, la relación molar entre las proteínas de fusión multifuncionales que solo tienen un conector y las proteínas de fusión multifuncionales que tienen dos conectores es de aproximadamente 10 a aproximadamente 1, aproximadamente 5 a aproximadamente 1, aproximadamente 4 a aproximadamente 1, aproximadamente 3 a aproximadamente 1, aproximadamente 2 a alrededor de 1 o aproximadamente 1 a aproximadamente 1, lo más preferentemente, de aproximadamente 5 a aproximadamente 1.

Además, las concentraciones finales (preferentemente en disolución antes de la formación del hidrogel) de esta/s proteína/s de fusión multifuncional/es que se deben proporcionar en la etapa a) del método de preparación del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención pueden estar en un intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 µg/µl, en un intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 300 µg/µl, en un intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 250 µg/µl, en un intervalo de aproximadamente 30 a aproximadamente 200 µg/µl, en un intervalo de aproximadamente 40 a aproximadamente 175 µg/µl, en un intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 150 µg/µl, más preferentemente, en un intervalo de aproximadamente 60 a aproximadamente 140 µg/µl, en un intervalo de aproximadamente 70 a aproximadamente 130 µg/µl, en un intervalo de aproximadamente 80 a aproximadamente 120 µg/µl, o en un intervalo de aproximadamente 90 a aproximadamente 110 µg/µl.

Además del grado de reticulación, se puede modificar correspondientemente el contenido de otros componentes del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención, tales como las células que se unen a una secuencia RGD según lo definido en la presente memoria dentro de la proteína de fusión multifuncional de la invención o de otros componentes peptídicos o proteicos, por ejemplo, la unión al dominio ZZ a través de un dominio F<sub>c</sub>. Por lo tanto, también puede ser preferible introducir además dichas proteínas de fusión multifuncionales de la invención que comprenden un dominio ZZ según lo definido anteriormente en el hidrogel de PEG de la invención.

Por consiguiente, en la etapa a) del método para la preparación del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención, se pueden proporcionar además dichas proteínas de fusión multifuncionales que contienen un dominio ZZ según lo definido en la presente memoria. En general, para este fin, se puede usar cualquier proteína de fusión multifuncional que contenga un dominio ZZ según lo definido en la presente memoria. En este contexto, las proteínas de fusión multifuncionales ejemplares según lo definido en la presente memoria para la etapa a) del método de preparación del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención que contienen un dominio ZZ se pueden seleccionar más preferentemente de entre las siguientes:



Si las proteínas de fusión multifuncionales de la invención que comprenden un dominio ZZ según lo definido anteriormente se incorporan en el hidrogel de PEG de la invención, las concentraciones finales de (todas) las proteínas de fusión multifuncionales que se deben proporcionar en la etapa a) del método de la invención para la preparación del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención pueden estar en aproximadamente el mismo intervalo ya definido anteriormente. Sin embargo, puede ser preferible determinar las concentraciones finales de las proteínas de fusión multifuncionales de la invención que comprenden un dominio ZZ por separado, por ejemplo, en un intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 µg/µl, en un intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 50 µg/µl, en un intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 25 µg/µl, en un intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 20 µg/µl, en un intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10 µg/µl, en un intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5 µg/µl, más preferentemente, en un intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2,5 µg/µl, o en un intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2 µg/µl.

Dependiendo del tipo y/o de la cantidad de diferentes proteínas de fusión multifuncionales según lo definido de acuerdo con la presente invención, más concretamente, del número de conectores específicos contenidos en diferentes proteínas de fusión multifuncionales, el grado de reticulación del hidrogel de PEG soluble sensible a estímulos de la invención puede verse influido. Además, es posible modificar consecuentemente el contenido de otros componentes del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención, el contenido de, por ejemplo, componentes tales como las células que se unen a una secuencia RGD según lo definido en la presente memoria dentro de la proteína de fusión multifuncional de la invención, o la unión de componentes adicionales tales como otro

componente peptídico o proteico con el dominio ZZ a través de su dominio F<sub>c</sub>.

En la etapa b) del procedimiento de la invención para la preparación del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención, se mezclan entre sí la al menos una proteína de fusión multifuncional como la proporcionada de acuerdo con la etapa a) y un sustrato, según lo definido anteriormente para la proteína de unión al sustrato (SBP).

El sustrato específico para la proteína de unión al sustrato (SBP) según lo definido anteriormente puede ser cualquier sustrato adecuado según lo definido en la presente memoria que puede ser unido por al menos una, preferentemente, al menos dos proteínas de unión al sustrato (SBP) según lo definido anteriormente, para permitir la dimerización o la multimerización de los polímeros de PEG unidos covalentemente o simplemente la unión específica del sustrato mediante la proteína de unión al sustrato (SBP). Por ejemplo, un sustrato específico para la proteína de unión al sustrato GyrB según lo definido anteriormente es el antibiótico coumermicina, que se puede unir mediante (una o) dos subunidades gyrB. Por otra parte, una proteína de unión a heparina (HBP), según lo definido anteriormente se puede unir a la heparina como su sustrato, donde preferentemente al menos una, preferentemente al menos dos proteínas de unión a heparina (HBP) se pueden unir al mismo sustrato. Por consiguiente, puede ser necesario en la etapa b) del método de la invención para la preparación del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención usar la proteína de unión al sustrato (SBP) en un exceso molar igual o incluso del doble con respecto a su sustrato. En otras palabras, la relación molar entre la proteína de unión a heparina (HBP) y su sustrato es preferentemente de aproximadamente 1:1 o 2:1. Como ejemplo particular, la relación molar entre una proteína de fusión multifuncional que contiene GyrB que se va a usar y su sustrato de coumermicina es preferentemente de aproximadamente 2:1. Asimismo, la relación molar entre una proteína de unión a heparina (HBP) que contiene la proteína de fusión multifuncional que se va a usar y su sustrato de coumermicina es preferentemente de aproximadamente 2:1 o incluso de 1:1.

La mezcla obtenida en la etapa b) se incuba preferentemente tras mezclar para permitir un buen mezclado de los componentes de la mezcla. En particular, la incubación puede permitir la unión de la proteína de unión al sustrato (SBP) con su sustrato específico, por ejemplo, para permitir la unión de una o dos o más proteínas de fusión multifuncionales, cada una de las cuales contiene una subunidad GyrB, con su sustrato específico, el antibiótico de coumermicina, o, por ejemplo, para permitir la unión de una o dos proteínas de fusión multifuncionales, cada una de las cuales contiene una proteína de unión a heparina, con su sustrato de heparina específico.

En la etapa c) del método de preparación del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención, la mezcla como se proporciona en la etapa b), es decir, de al menos una proteína de fusión multifuncional según lo definido en la presente memoria y un sustrato según lo definido anteriormente para la proteína de unión al sustrato (SBP), se añade preferentemente a un polímero de PEG según lo definido en la presente memoria. La adición de la mezcla como se proporciona en la etapa b) a un polímero de PEG según lo definido en la presente se lleva a cabo típicamente en un intervalo de temperaturas de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 50 °C, más preferentemente en un intervalo de temperatura de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 40 °C, por ejemplo, a aproximadamente la temperatura ambiente (T. A., por ejemplo, de aproximadamente 20 a 25 °C, por ejemplo 20 °C o 25 °C) o a aproximadamente 37 °C. Como ya se ha definido anteriormente, el polímero de PEG se puede modificar para que comprenda un resto que contiene tiol o cualquier resto adicional que permita la formación de un enlace tioéter, por ejemplo, restos de vinilsulfona.

La relación molar entre la proteína de fusión multifuncional según lo definido en la presente memoria (que contiene la proteína de unión al sustrato (SBP)) y los restos reactivos (de formación de tioéter) del polímero de PEG como se proporciona en la etapa c) del método de la invención es preferentemente de aproximadamente 1:1, por ejemplo, entre aproximadamente 0,75:1 y aproximadamente 1:0,75, entre aproximadamente 0,8:1 y aproximadamente 1:0,8, entre aproximadamente 0,85:1 y aproximadamente 1:0,85, entre aproximadamente 0,9:1 y aproximadamente 1:0,9, entre aproximadamente 0,95:1 y aproximadamente 1:0,95, o de aproximadamente 1:1. Preferentemente, la concentración del polímero de PEG podría ser del 0,5-15%, por ejemplo, del aproximadamente 0,5 al aproximadamente 5%, del aproximadamente 2,5 al aproximadamente 7,5%, del aproximadamente 5 al aproximadamente 10%, del aproximadamente 7,5 al aproximadamente 12,5%, o del aproximadamente 10 al aproximadamente 15%, bien p/v o v/v o p/p, o puede estar en un intervalo formado por dos de estos valores.

La formación del hidrogel de acuerdo con la etapa c) del método de la invención para la preparación de los hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos de la invención se lleva a cabo preferentemente en una atmósfera humidificada para evitar el secado y, por lo tanto, el encogimiento del hidrogel de PEG recién formado.

De acuerdo con una alternativa muy preferida del método de la invención, los hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos de la invención se pueden preparar proporcionando al menos una proteína de fusión multifuncional de la invención, por ejemplo, en una primera etapa a) del método de la invención. La al menos una proteína de fusión multifuncional de la invención comprende, preferentemente, una proteína de fusión multifuncional de la invención según lo definido anteriormente con un conector y otra proteína de fusión multifuncional de la invención más que comprende dos conectores según lo definido anteriormente, típicamente en una cantidad molar de aproximadamente 10 a aproximadamente 1, aproximadamente 5 a aproximadamente 1, aproximadamente 4 a

aproximadamente 1, aproximadamente 3 a aproximadamente 1, aproximadamente 2 a aproximadamente 1, aproximadamente 1 a aproximadamente 1, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 1, preferentemente, a una concentración final de proteína en un intervalo de aproximadamente 60 a aproximadamente 140  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , en un intervalo de aproximadamente 70 a aproximadamente 130  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , en un intervalo de aproximadamente 80 a aproximadamente 120  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  o en un intervalo de aproximadamente 90 a aproximadamente 110  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , por ejemplo, de aproximadamente 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Para otra modificación, se puede añadir una proteína de fusión multifuncional que contenga un dominio ZZ según lo definido en la presente memoria durante la etapa a) a una concentración final en un intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , en un intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , más preferentemente, en un intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , o en un intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , por ejemplo, 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . En una segunda etapa b) de la alternativa muy preferida, preferentemente, luego se mezcla la solución de proteína con el sustrato de la proteína de unión al sustrato (SBP), por ejemplo, con coumermicina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, N° de cat. C9270, 50 mg/ml en DMSO), si se usa GyrB como proteína de unión al sustrato en la proteína de fusión multifuncional, preferentemente, a una relación molar de SBB:sustrato de aproximadamente 2:1. Después de la incubación, preferentemente en un intervalo de temperaturas de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 40 °C, por ejemplo, a T.A. o a 37 °C, preferentemente durante aproximadamente 1 h, se puede añadir un polímero de PEG según lo definido en la presente memoria en la tercera etapa c) de la alternativa muy preferida. La proteína de fusión multifuncional según lo definido en la presente memoria, que contiene la proteína de unión al sustrato (SBP), y los restos reactivos (de formación de tioéter) del polímero de PEG están preferentemente en una relación molar de aproximadamente 1:1. Luego se realiza preferentemente la formación del hidrogel mediante la incubación de la mezcla obtenida de acuerdo con la etapa c), preferentemente, en un intervalo de temperaturas de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 40 °C, por ejemplo, a T.A. o a 37 °C, preferentemente durante aproximadamente 5 a 15 horas, por ejemplo, durante 10 h, preferentemente, en una atmósfera humidificada.

Como alternativa, el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención también se puede preparar alternando las etapas anteriormente identificadas, por ejemplo,

- a) proporcionando al menos una proteína de fusión multifuncional según lo definido en la presente memoria y un polímero de PEG según lo definido en la presente memoria;
- b) mezclando la al menos una proteína de fusión multifuncional según lo definido en la presente memoria y un polímero de PEG obtenido de acuerdo con la etapa a) con un sustrato para la proteína de unión al sustrato (SBP) según lo definido en la presente memoria; formándose así preferentemente el hidrogel de PEG.

Las condiciones de reacción son preferentemente como se han descrito anteriormente.

De acuerdo con otra alternativa, el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención también se puede preparar alternando las etapas anteriormente identificadas, por ejemplo,

- a) proporcionando al menos una proteína de fusión multifuncional según lo definido en la presente memoria y un polímero de PEG según lo definido en la presente memoria, donde un sustrato para la proteína de unión al sustrato (SBP) según lo definido en la presente memoria se ha unido al polímero de PEG;
- b) mezclando la al menos una proteína de fusión multifuncional según lo definido en la presente memoria y un polímero de PEG obtenido de acuerdo con la etapa a) con un sustrato para la proteína de unión al sustrato (SBP) según lo definido en la presente memoria; formándose así preferentemente el hidrogel de PEG.

Las condiciones de reacción son preferentemente como se han descrito anteriormente.

El hidrogel de PEG soluble sensible a estímulos de la invención, preferentemente según lo definido anteriormente y preferentemente como el preparado anteriormente de acuerdo con el método de la invención, se puede modificar además mediante la incorporación de componentes adicionales seleccionados de entre, por ejemplo, células, proteínas, polipéptidos, antibióticos, anticuerpos, polímeros antimicrobianos y antiflogísticos clínicamente permitidos no esteroideos tales como derivados de (i) ácido acetilsalicílico, (ii) ácido arilpropiónico, (iii) ácido arilacético, (iv) ácido indolacético, (v) ácido antranílico y Oxycams, así como inhibidores selectivos de la COX-2.

Las proteínas que se pueden incorporar en el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención se pueden seleccionar, por ejemplo, de entre factores de crecimiento. En este contexto, sin limitarse a los mismos, los factores de crecimiento se pueden seleccionar, por ejemplo, de entre adrenomedulina (AM), factor autocrino de motilidad, proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factor de crecimiento epidérmico (EGF), eritropoyetina (EPO), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), por ejemplo, FGF-7, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor de diferenciación del crecimiento 9 (GDF9), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado de hepatoma (HDGF), factor de crecimiento de unión a heparina (HBGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor estimulante de la migración, miostatina (GDF-8), factor de crecimiento nervioso (NGF) y otras neurotrofinas, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), trombopoyetina (TPO), trombospondina (TPS), factor de crecimiento

transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento placentario (PIGF), [(somatotropina bovina fetal)] (FBS), cofactor IL-1 para EL-3 e IL-6 (activa los linfocitos T), factor de crecimiento de linfocitos T IL-2 (estimula la síntesis de IL-1, activa los linfocitos B y las células NK), IL-3 (estimula la producción de todas las células no linfoides), IL-4 (factor de crecimiento para linfocitos B activados, linfocitos T en reposo y mastocitos), IL-5 (induce la diferenciación de los linfocitos B activados y eosinófilos), IL-6 (estimula la síntesis de Ig, factor de crecimiento para células plasmáticas), IL-7 (factor de crecimiento de linfocitos pre-B), factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y angiostatina (inhibe la neovascularización). Un factor de crecimiento particularmente preferido es, por ejemplo, FGF-7, más preferentemente como se define de acuerdo con SEC ID N° 50 (véase también la Figura 9, aa1 a 106). Incluso más preferentemente, una proteína según lo definido anteriormente que se puede incorporar en el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención, se selecciona de entre una proteína de fusión que comprende un factor de crecimiento según lo definido anteriormente, opcionalmente, un conector según lo definido anteriormente, preferentemente, un dominio F<sub>c</sub> según lo definido en la presente memoria y, opcionalmente, un marcador para la purificación según lo definido anteriormente. Lo más preferentemente, dicha proteína de fusión se selecciona de entre una secuencia de acuerdo con SEC ID N° 52 (denominada en la presente memoria FGF-7-Fc-His) o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 50, 60, 70 o 80%, preferentemente, al menos un 90%, más preferentemente, al menos 95%, e incluso más preferentemente al menos 97,5% de identidad con la secuencia de acuerdo con SEC ID N° 52 (véase también la Figura 9). Como alternativa, dicha proteína de fusión está codificada por una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEC ID N° 51 o una secuencia de ácido nucleico que muestra al menos un 50, 60, 70 o 80%, preferentemente, al menos un 90%, más preferentemente al menos un 95%, e incluso más preferentemente al menos un 97,5% de identidad con la secuencia de acuerdo con SEC ID N° 51 (véase también la Figura 9).

Las proteínas según lo definido anteriormente que se pueden incorporar en el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención pueden estar unidas al hidrogel de PEG, por ejemplo, a través del dominio ZZ de la proteína de fusión multifuncional de la invención incorporada según lo definido anteriormente. Con este fin, las proteínas que se incorporarán estarán normalmente condensadas a una pareja de unión del dominio ZZ, por ejemplo, un dominio F<sub>c</sub>, por ejemplo, de acuerdo con SEC ID N° 53 o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 50, 60, 70 o 80%, preferentemente al menos un 90%, más preferentemente al menos un 95%, e incluso más preferentemente al menos un 97,5% de identidad con la secuencia de acuerdo con SEC ID N° 53 (véase también la Figura 9, aa 123 a 354).

Las proteínas que se incorporarán al hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención pueden estar además condensadas a una secuencia de reconocimiento específica de la proteasa, que se encuentra preferentemente situada entre la proteína según lo definido anteriormente y la pareja de unión del dominio ZZ, según lo definido anteriormente. Este enfoque permite la incorporación de las proteínas en el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención, y la liberación específica de proteínas específicas, por ejemplo, un factor de crecimiento específico, del hidrogel de la invención tras un desencadenante específico. Dicho desencadenante puede ser una proteasa que tenga como secuencia específica de reconocimiento de la proteasa una secuencia de aminoácidos usada para unir la proteína según lo definido anteriormente y la pareja de unión del dominio ZZ, según lo definido anteriormente. Dichas secuencias de reconocimiento de proteasa bien podrían ser específicas de las proteasas producidas endógenamente como metaloproteasas de la matriz (MMP, por ejemplo, según lo descrito en Ehrbar *et al.* (2007) "Biomaterials" 28, 3856-3866) o de proteasas que se podrían añadir externamente bien de manera conjunta a partir de la administración del hidrogel o en otro momento. Por consiguiente, las proteasas como las usadas en este aspecto pueden incluir dichas proteasas producidas endógenamente o metaloproteasas de la matriz, o preferentemente proteasas seleccionadas de entre, por ejemplo, factor Xa, caspasas o la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV).

Del mismo modo, las proteínas en el contexto de la invención que se van a incorporar en el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención pueden ser proteasas como las mencionadas anteriormente.

Las proteínas se pueden incorporar en el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención antes de o en paralelo a la formación del hidrogel de la invención o mediante la incubación de las proteínas con el hidrogel de PEG (formado fácilmente) según lo definido en la presente memoria. La incubación se puede producir preferentemente en un intervalo de temperaturas de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 40 °C, por ejemplo, a T.A. o a 37 °C. La incubación se puede producir además, preferentemente, a una concentración final de proteína en un intervalo de aproximadamente 60 a aproximadamente 140 ng/ $\mu$ l, en un intervalo de aproximadamente 70 a aproximadamente 130 ng/ $\mu$ l, en un intervalo de aproximadamente 80 a aproximadamente 120 ng/ $\mu$ l o en un intervalo de aproximadamente 90 a aproximadamente 110 ng/ $\mu$ l, por ejemplo, aproximadamente 100 ng/ $\mu$ l.

Las células que se pueden usar para incorporarlas en el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención se pueden seleccionar, por ejemplo, de entre células madre tales como células madre humanas, células madre adultas, células madre embrionarias, células madre diseñadas o no diseñadas mediante ingeniería genética, células madre primarias o inmortalizadas (líneas celulares), preferentemente, células madre mesenquimales, osteoblastos, cementoblastos, células de fibroblastos de todos los tejidos conjuntivos, por ejemplo, fibroblastos gingivales y/o cutáneos y corneales, bien solos o junto con fibroblastos del ligamento periodontal, queratinocitos, por

ejemplo, queratinocitos gingivales y queratinocitos de la cavidad oral y del tracto aerodigestivo superior, así como de la piel y de la superficie ocular, células del sistema nervioso central, células neuronales, células endoteliales de tejido vascular y corneal, pericitos, miocitos, adipocitos, astrocitos, melanocitos etc. Las células según lo definido anteriormente son preferentemente células autólogas, es decir, células derivadas del paciente que se va a tratar.

5 Ventajosamente, el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención se puede disolver/degradar tras un estímulo específico. Dicho estímulo específico puede ser, por ejemplo, la adición de un sustrato específico o un antagonista de una proteína de unión al sustrato (SBP) según lo definido anteriormente. Como ejemplo, si hay GyrB contenido en la proteína de fusión multifuncional usada para reticular el hidrogel de PEG, el hidrogel de PEG se puede degradar tras la adición del antibiótico novobiocina específico. La disolución/degradación también puede ocurrir, si está previsto, de manera escalonada en el tiempo, por ejemplo, mediante la administración lenta de un sustrato o un antagonista de una proteína de unión al sustrato (SBP) según lo definido anteriormente en el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención. La disolución/degradación normalmente se lleva a cabo en el sitio de aplicación del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención.

15 De acuerdo con una realización específica adicional, el objeto subyacente de la presente invención se resuelve además mediante el uso del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención como un medicamento, dispositivo médico o producto médico. Especialmente su composición química, la posibilidad de ajustar sus parámetros bioactivos y biomiméticos con las secuencias de reconocimiento de integrinas, así como la incorporación de factores de crecimiento específicos hacen de los hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos de la invención una herramienta importante y valiosa en múltiples aplicaciones clínicas. Ventajosamente, los hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos de la invención se pueden usar en múltiples aplicaciones clínicas.

25 Dichas aplicaciones clínicas del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención, preferentemente en forma de un medicamento, dispositivo médico o producto médico, incluyen, por ejemplo, tratamientos en el campo de la implantología, dermatología y de los carcinomas del tracto aerodigestivo superior (por ejemplo, durante la otorrinolaringología o medicina de oído, nariz y garganta), así como las heridas de la cavidad oral (por ejemplo, durante la cirugía oral y maxilofacial). Más concretamente, dichas aplicaciones clínicas del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención incluyen, por ejemplo, apósitos para heridas, soporte de tejidos o aplicaciones de regeneración de tejidos en el campo de la medicina regenerativa, la medicina dental y la odontología. Entre dichas aplicaciones, se pueden tratar, por ejemplo, las heridas ulcerosas crónicas dentro del campo de la dermatología, así como las heridas en el campo de la medicina regenerativa, en particular, las heridas que se pueden producir durante la extirpación quirúrgica de los carcinomas del tracto aerodigestivo superior (por ejemplo, durante la otorrinolaringología o medicina de oído, nariz y garganta), así como las heridas de la cavidad oral (por ejemplo, durante la cirugía oral y maxilofacial). En el caso de las heridas ulcerosas que surgen con frecuencia en la parte inferior de las extremidades inferiores de los pacientes diabéticos, se pueden cultivar queratinocitos autólogos *in vitro* en los hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos de la invención en presencia de fibroblastos dérmicos irradiados con la división celular desactivada, hasta que se obtiene un epitelio preformado. Dichos queratinocitos autólogos típicamente proceden, por ejemplo, de la vaina externa de la raíz del cabello y, por tanto, se pueden obtener fácilmente. Posteriormente, los hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos de la invención, que se han cultivado, por tanto, con dichas células autólogas, se administran preferentemente sobre una herida preferentemente pretratada del mismo paciente del que se obtuvieron las células. La administración de los hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos de la invención en la herida preferentemente pretratada del paciente se produce normalmente a una densidad y en un tamaño que preferentemente inician la curación de la herida y, preferentemente, sirve de soporte para las células con los nutrientes de los tejidos y fluidos circundantes. La administración de los hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos de la invención también permite la oclusión de la herida debido a una degradación dirigida y sistemática del hidrogel de PEG y la liberación resultante de proteínas específicas tales como factores de crecimiento de promoción de queratinocitos, tales como EGF o FGF-7 (KGF). Con respecto a los carcinomas del tracto aerodigestivo superior (por ejemplo, durante la otorrinolaringología o la medicina de oído, nariz y garganta) según lo mencionado anteriormente, los queratinocitos aplicados con los hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos de la invención se obtienen típicamente del denominado "colgajo del antebrazo". En este caso se retira un trozo la piel entera de una parte de la cara interna del antebrazo, y se cultivan *in vitro* los fibroblastos del tejido conjuntivo y las queratinocitos epiteliales. Dado que los pacientes con dichos tumores sufren típicamente una mala cicatrización de las heridas y muestran, por tanto, un tejido de granulación correspondientemente problemático, el tratamiento de dichos pacientes y la colocación de apósitos quirúrgicos se producen ventajosamente con la administración de manera "escalonada" de los hidrogeles de PEG disolubles sensibles a impulsos de la invención que contienen células epiteliales y fibroblastos. Dichos hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos de la invención "escalonados" pueden contener células epiteliales y fibroblastos, bien en uno o dos hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos diferentes según lo definido en la presente memoria como un "sándwich". Dicho "sándwich" se puede preparar, por ejemplo, precultivando las células según lo definido en la presente memoria, por ejemplo, fibroblastos, inicialmente en la superficie, a la que entonces se puede denominar "superficie inferior", mientras que los queratinocitos, sembrados con un retraso temporal de un día, crecen en la "superficie superior" del hidrogel. Las interacciones de ambos tipos de células a través de factores de crecimiento difundibles produce la formación de epitelio estratificado con el tiempo, aunque ambos tipos de células carecen de contactos directos de célula a célula. Ventajosamente, dichos hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos de la invención "escalonados", también denominados hidrogeles

de PEG disolubles sensibles a estímulos de tipo "sándwich", proporcionan preferentemente la nutrición del tejido epitelial preformado debido a la interacción con los fibroblastos a través de factores de crecimiento difundibles. Con este enfoque, la curación de heridas bajo oclusión del epitelio muestra un mejor resultado con respecto al epitelio preformado puro. En este caso, se pueden incorporar factores de crecimiento angiogénicos tales como VEGF en el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención, que influyen positivamente en la neovascularización del tejido de la herida o el tejido de granulación tras la degradación del gel.

Otras aplicaciones clínicas ventajosas adicionales de los hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos de la invención, preferentemente en forma de medicamento, dispositivo médico o producto médico, incluyen la prevención de la cresta alveolar tras la extracción dental en un paciente por tratar. Dichas aplicaciones pueden contribuir de manera decisiva a que la aplicación de los implantes dentales sea estética y funcionalmente satisfactoria en medicina dental y odontología. En Alemania, se extraen más de 14 millones de piezas dentales al año. Tras la extracción o la pérdida dental, el soporte dental de la pieza perdida se colapsa en mayor o menor medida (atrofia). Por consiguiente, se pueden observar diferentes grados de pérdida ósea o atrofia en este contexto. Con una atrofia del hueso alveolar, el aspecto estético puede verse afectado. Aún peor, los requisitos previos para la implantología y la posterior rehabilitación protésica se deterioran. Por lo tanto, en general, se necesitan medidas aumentativas para mejorar la función y el aspecto estético y, por lo tanto, se suelen aumentar los gastos económicos y el volumen de trabajo quirúrgico con respecto a los procedimientos quirúrgicos invasivos. En consecuencia, la aplicación específica de los hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos de la invención directamente después de la extracción o la pérdida de la pieza dental representa una herramienta rentable y adecuada para evitar dichos gastos y tratamientos posteriores.

Otras aplicaciones clínicas ventajosas adicionales de los hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos de la invención, preferentemente en forma de medicamento, dispositivo médico o producto médico, incluyen el tratamiento de enfermedades de la córnea humana en un paciente por tratar. Dichas aplicaciones se pueden llevar a cabo en el tratamiento de enfermedades de la córnea, es decir, epitelio, tejido conjuntivo/fibroblastos y endotelio. En las enfermedades del limbo ("insuficiencia de células madre del limbo"), el vaso que porta epitelio opaco del tejido conjuntivo (conjuntiva) crece en la córnea transparente, produciendo típicamente ceguera en el paciente afectado. El tratamiento convencional de dichas enfermedades típicamente requiere un reemplazo de las células madre del limbo, que representan las células precursoras de epitelio de la córnea transparente. En los casos de enfermedades de un solo lado del limbo, el tratamiento se puede llevar a cabo mediante la transferencia de tejido vital del limbo del ojo no afectado al ojo afectado. En los casos de enfermedad ambilateral, dicho tratamiento no es posible y es mucho más problemático. En estos casos, siempre que quede función limbal al menos en un ojo, se puede cultivar una capa de células confluentes en una matriz de soporte adecuada tal como los hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos de la invención basados en una muestra de células pequeñas. La capa de células confluentes se puede transferir después al ojo afectado. Hasta la fecha, se ha usado una membrana amniótica humana o un gel de fibrina como matriz de soporte, donde el número de células en proliferación (células madre) obtenido de la muestra de extracto celular representaba el aspecto más crítico de dicho cultivo *ex vivo*. Desafortunadamente, las observaciones a largo plazo revelaron número bajos de células madre en ambas matrices de soporte usadas actualmente, es decir, la membrana amniótica humana o el gel de fibrina. Lo más probable es que esto se deba a que ninguna de estas matrices de soporte proporcionan el entorno extracelular óptimo para dichas células madre. En consecuencia, estas células madre no pueden formar un nicho requerido para un crecimiento celular óptimo. En este contexto, los hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos de la invención proporcionan un entorno óptimo debido a sus propiedades adaptables a nivel individual, que se pueden diseñar con respecto a la necesidad de estas células madre.

Otras aplicaciones clínicas de los hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos de la invención, preferentemente en forma de dispositivo médico, incluyen el tratamiento de enfermedades del endotelio de la córnea. Una aplicación específica en este contexto es, por ejemplo, el tratamiento de la distrofia endotelial de la córnea de Fuchs. En esta enfermedad, pero también en el contexto de otras enfermedades, se produce una reducción drástica de las células del endotelio corneal debido a la apoptosis que conduce a una córnea opaca. La presente terapia incluye el trasplante de córnea, incluyendo el trasplante o la sustitución de todas las capas de la córnea. Un tratamiento alternativo incluye la sustitución de las células enfermas mediante un trasplante específico de la capa endotelial de un donante. Dado que el material del trasplante no es material HLA idéntico, el injerto de tejido puede ser rechazado, produciendo un daño significativo de la capa endotelial. En este contexto, los hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos de la invención ofrecen la posibilidad de extraer las células endoteliales del paciente por tratar y enriquecer estas células endoteliales similares a las anteriores mediante el cultivo de una capa de células confluentes en una matriz de soporte adecuada, tal como los hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos de la invención basados en una muestra de células pequeñas. Una vez más, los hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos de la invención proporcionan un entorno óptimo para estas células debido a sus propiedades adaptables a nivel individual, que se pueden diseñar con respecto a la necesidad de estas células madre. Las células se pueden transferir después junto con el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención como vehículo a la parte posterior de la córnea, evitando así el rechazo del injerto.

El hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención, preferentemente en forma de medicamento, dispositivo médico o producto médico, se puede usar además, por ejemplo, en apósitos para quemaduras, parches

hemostáticos, en el tratamiento de lesiones, en apósitos quirúrgicos, para el tratamiento de heridas, para la regeneración de tejidos blandos y duros, por ejemplo, en el campo de la implantología, para el tratamiento de heridas de la cavidad oral, por ejemplo, debido a enfermedades tumorales, en el campo de la oftalmología, en el campo de los defectos periodontales, incluyendo el ligamento periodontal, etc., para la preparación de un implante celular para regenerar o reconstruir, íntegra o parcialmente, los tejidos dañados o enfermos o eliminados, en particular, músculos, miocardio, tejido conjuntivo, huesos, tendones o ligamentos, tejido hepático, renal, córnea, dermis o epidermis, tejido cartilaginoso articular, para la preparación de un implante de células del sistema nervioso central como las células neuronales para regenerar o reconstruir, íntegra o parcialmente, el tejido neuronal, en particular, tejido del sistema nervioso central, tejido nervioso tal como el tejido neuronal, dañado como consecuencia de la enfermedad de Parkinson, o daños de la médula espinal o patologías oncológicas o enfermedad de Alzheimer, tejido nervioso tal como el tejido neuronal, eliminado o ablacionado tras una operación quirúrgica. Los hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos de la invención se pueden usar además como dispositivos de administración de fármacos, matrices de células aplicaciones *in vitro*, *in vivo* y/o *ex vivo*, para la preparación de modelos de tejido y como matrices de trasplante de células.

De acuerdo con otra realización específica, el objeto subyacente de la presente invención se resuelve además mediante el uso del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención en el tratamiento de enfermedades, estados patológicos o tratamientos en general según lo definido anteriormente en la presente memoria como se ha mencionado anteriormente. Más preferentemente, el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención según lo definido en la presente memoria se puede usar en la preparación de un medicamento, un dispositivo médico o un producto médico para el tratamiento de enfermedades según lo definido anteriormente.

De acuerdo con la realización específica final, el objeto subyacente de la presente invención se resuelve además mediante kits, preferentemente, kits de partes, que comprenden el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención, opcionalmente, componentes adicionales para su incorporación en el hidrogel de PEG según lo definido anteriormente y, opcionalmente, instrucciones de uso. Dichos kits se pueden usar en el tratamiento de enfermedades, estados patológicos o tratamientos en general según lo definido en la presente memoria y como se ha mencionado anteriormente. El kit comprende preferentemente los diferentes componentes en diferentes partes del kit, por ejemplo, una parte soluble que comprende el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención y, al menos, una o más partes que comprenden uno o más de los componentes adicionales.

En la presente invención, si no se indica lo contrario, las diferentes características de las alternativas y las realizaciones se pueden combinar entre sí. Además, la expresión "que comprende" no se interpretará en el sentido de "que consiste en", si no se menciona específicamente. Sin embargo, en el contexto de la presente invención, la expresión "que comprende" se puede sustituir con la expresión "que consiste en", cuando sea aplicable.

#### Figuras:

Las siguientes figuras ilustrarán la invención anteriormente descrita más detalladamente.

**Figura 1:** muestra el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención con secuencias RGD y la incorporación de fibroblastos gingivales humanos en el hidrogel después de la microscopía de contraste de fase y la morfología específica de las células sembradas. Como se puede ver, los fibroblastos gingivales se extienden de manera continua sobre el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención con secuencias de RGD, conduciendo a un césped celular desarrollado de manera continua en un tiempo de incubación de 24 horas. En particular, se puede observar un aumento significativo del crecimiento celular para los fibroblastos gingivales, que mantienen su morfología natural en forma de huso. Por el contrario, las células sembradas en hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos con secuencias RGD no muestran un crecimiento continuo de las células en el tiempo de incubación de 24 horas. Estas células se repelen del gel y posteriormente se someten a apoptosis.

**Figura 2:** muestra el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención con secuencias RGD y la incorporación de fibroblastos gingivales humanos en el hidrogel después de la tinción con faloidina y los filamentos de actina formados de ese modo. Como se puede ver, los fibroblastos gingivales se extienden de manera continua sobre el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención con secuencias de RGD, conduciendo a un césped celular desarrollado de manera continua en un tiempo de incubación de 24 horas. En particular, se puede observar un aumento significativo del crecimiento celular para los fibroblastos gingivales, que mantienen su morfología natural en forma de huso. Por el contrario, las células sembradas en hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos con secuencias RGD no muestran un crecimiento continuo de las células en el tiempo de incubación de 24 horas. Estas células se repelen del gel y posteriormente se someten a apoptosis.

**Figura 3:** muestra el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención con secuencias RGD y la incorporación de fibroblastos gingivales humanos en el hidrogel después de la tinción con integrina b1 y la unión de las células a las secuencias RGD (contactos focales). Como se puede ver, los fibroblastos gingivales

se extienden de manera continua sobre el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención con secuencias RGD, conduciendo a un césped celular desarrollado de manera continua en un tiempo de incubación de 24 horas. En particular, se puede observar un aumento significativo del crecimiento celular para los fibroblastos gingivales, que mantienen su morfología natural en forma de huso. Por el contrario, las células sembradas en hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos con secuencias RGD no muestran un crecimiento continuo de las células en el tiempo de incubación de 24 horas. Estas células se repelen del gel y posteriormente se someten a apoptosis.

**Figura 4:** muestra una formación ejemplar del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de la invención, cuando se usa GyrB en la proteína de fusión multifuncional de la invención para modificar el gel de PEG subyacente. La formación del hidrogel de PEG se induce mediante la adición de sustrato de coumermicina, mientras que el hidrogel de PEG se puede volver a degradar de una manera controlada usando el compuesto antibiótico novobiocina.

**Figura 5:** muestra la secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos correspondiente de GyrB (11 1-220).

**Figura 6:** muestra la secuencia de ácido nucleico y la correspondiente secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión multimérica de la invención pRG107. Las subunidades son como se indican a continuación:

AA1: inicio de metionina  
 AA2: cisteína 1 para acoplarse a PEG-VS  
 AA3-221: GyrB (1-220)  
 AA222-233: motivo GRGDSP doble  
 AA234-239: marcador de hexahistidina  
 AA240: cisteína 2 para acoplarse a PEG-VS

**Figura 7:** muestra la secuencia de ácido nucleico y la correspondiente secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión multimérica de la invención pRG111. Las subunidades son como se indican a continuación:

AA1-129: dominio de unión a ZZ, derivado de pEZZ-18 (vector comercial, GE healthcare)  
 AA130-349: CyrB (1-220)  
 AA350-355: marcador de hexahistidina  
 AA356: cisteína para acoplarse a PEG-VS

**Figura 8:** muestra la secuencia de ácido nucleico y la correspondiente secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión multimérica de la invención pRG116. Las subunidades son como se indican a continuación:

Subunidades:  
 AA1-220: GyrB (1-220)  
 AA221-232: motivo GRGDSP doble  
 AA233-238: marcador de hexahistidina  
 AA239: cisteína 2 para acoplarse a PEG-VS

**Figura 9:** muestra la secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la proteína de fusión FGF-7-Fc-His. Las subunidades son como se indican a continuación:

Subunidades:  
 AA1-106: FGF-7 (=KGF)  
 AA107-122: conector de serina-glicina  
 AA123-354: dominio Fc  
 AA355-360: marcador de hexahistidina

### Ejemplos:

Los siguientes ejemplos ilustrarán la invención anteriormente descrita más detalladamente.

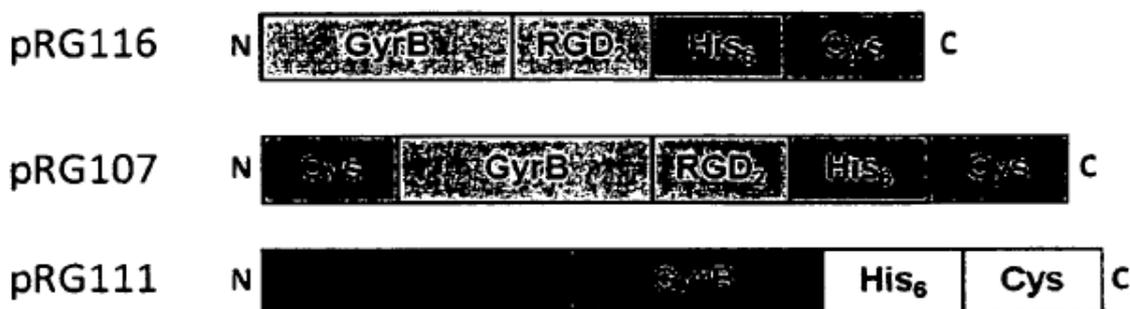
#### Ejemplo 1 – Síntesis y modificación de polímeros

Se sintetizó polietilenglicol de 8 brazos-vinilsulfona (PEG-VS, peso molecular 37,5 kDa) de acuerdo con Lutolf M. P., Hubbell J. A. 2003. "Synthesis and physicochemical characterization of end-linked poly(ethylene glycol)-co-peptide hydrogels formed by Michael-type addition". *Bio-macromolecules* 4(3):713-22) partiendo de PEG de ocho brazos-OH (Shearwater polymers, Huntsville, AL):

Se sintetizaron PEG de múltiples brazos-VS mediante el acoplamiento de PEG-OH con un exceso de divinilsulfona (Aldrich, Buchs, Suiza). El PEG-OH (aprox. 5 g) se usó bien como se recibió y disuelto directamente en 300 ml de diclorometano seco (previamente secado sobre tamices moleculares) o, en algunos casos, el PEG se secó por destilación azeotrópica en tolueno usando una trampa Dean Stark antes de iniciarse la reacción. Al PEG disuelto en diclorometano, se añadió NaH en atmósfera de argón, en un exceso de 5 veces frente a los grupos OH. Después de la evolución del hidrógeno, se añadió divinilsulfona muy rápidamente en un exceso de 50 a 100 veces frente a los grupos OH. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 3 días en atmósfera de argón con agitación constante. Tras ello, se neutralizó la solución de reacción con ácido acético concentrado, se filtró a través de papel hasta que se volvió transparente y se redujo hasta un volumen pequeño (aprox. 10 ml) por evaporación rotatoria. Se hizo precipitar el PEG mediante la adición gota a gota de la solución restante en éter dietílico enfriado en hielo. Se recuperó el polímero por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó al vacío. Luego se disolvió el polímero seco en 200 ml de agua desionizada que contenía aprox. 5 g de cloruro de sodio y se extrajo tres veces con 200 ml de diclorometano. Se secó esta solución con carbonato de sodio, y se volvió a reducir el volumen de nuevo por evaporación rotatoria. Finalmente, se volvió a hacer precipitar el producto y se lavó a fondo con éter dietílico para eliminar todo resto de divinilsulfona. Se secó el producto final al vacío y se almacenó en atmósfera de argón a -20 °C. La derivatización se confirmó con RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 3,6 ppm (estructura de PEG), 6,1 ppm (d, 1 H, =CH<sub>2</sub>), 6,4 ppm (d, 1 H, =CH<sub>2</sub>) y 6,8 ppm (dd, 1 H, -SO<sub>2</sub>CH=). Se encontró que el grado de conversión de grupos terminales, según lo mostrado por RMN, variaba del 95 al 98%. Se usó cromatografía de permeación en gel para confirmar que el material de partida (PEG-OH) y el PEG-VS terminalmente funcionalizado tienen distribuciones de peso molecular idénticas.

*Ejemplo 2 – Producción de las proteínas de fusión multifuncionales de la invención*

Se clonaron y expresaron las siguientes proteínas de fusión multifuncionales específicas (también determinadas en la presente memoria como variantes de GyrB):



El plásmido pRG116 contiene la secuencia N-terminal de girasa B de *E. coli* (aa 1-220), seguida de una secuencia RGD doble (2 x GRGDSP), un marcador de hexahistidina para la purificación y un residuo de cisteína para el acoplamiento a PEG-VS.

El plásmido pRG107 contiene además de pRG116, un residuo de cisteína N-terminal. El plásmido pRG111 contiene 2 dominios Z de unión a Fc sintéticos de la proteína A (ZZ, derivados del vector pEZZ-18, GE Healthcare) seguidos de la secuencia N-terminal de girasa B de *E. coli* (aa 1-220), un marcador de hexahistidina para la purificación y un residuo de cisteína para el acoplamiento a PEG-VS.

Se transformó el plásmido de expresión de GyrB correspondiente (pRG107, pRG111, pRG116) en BL21 STAR™ de *E. coli* (DE3) (Invitrogen, Carlsbad, CA, N° de cat. C601003) y se indujo la producción de proteínas a DO<sub>600</sub> = 1 con IPTG 1 mM durante 3 horas a 37 °C. Se volvieron a suspender los sedimentos celulares en PBS (40 ml por cada 1.000 ml de volumen de cultivo inicial, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0), se interrumpieron usando una prensa francesa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y se retiraron los desechos celulares por centrifugación a 30.000 xg durante 30 min. Se cargó el lisado celular aclarado en una columna Superflow de NTA-agarosa (Qiagen, Hilden, Alemania, N° de cat. 30210), que se lavó posteriormente con 10 volúmenes de columna de PBS, 10 volúmenes de columna de tampón de lavado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH 8,0) y se eluyó con 2 volúmenes de columna de tampón de elución (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 8,0). Al eluato, se añadió EDTA 500 mM a pH 8 hasta una concentración final de 10 mM.

*Ejemplo 3 – Ensamblaje del hidrogel*

Antes del acoplamiento de las proteínas de fusión multifuncionales de la invención con el polímero de PEG-VS, se redujeron las proteínas de fusión multifuncionales de la invención usando un agente reductor, preferentemente con TCEP. Esta etapa evita que el resto de tiol reaccione con un enlace disulfuro y es necesaria para realizar el acoplamiento de las proteínas de fusión multifuncionales de la invención con PEG-VS. Tras hacer reaccionar las proteínas de fusión multifuncionales de la invención con el agente reductor, es preferible purificarlas para eliminar o al menos eliminar sustancialmente el agente reductor, con el fin de evitar la interferencia del agente reductor, por ejemplo, TCEP, con las proteínas de fusión multifuncionales reducidas y/o el polímero de PEG-VS durante la reacción de acoplamiento.

En este contexto, se añadió un exceso molar de 20 veces de TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina, Sigma Aldrich, St Louis, MO, N° de cat. C4706) al correspondiente eluato proteico, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente, se cambió el tampón de las muestras de proteínas reducidas por PBS, EDTA 2 mM pH 8, mediante 2 separaciones en una columna de exclusión por tamaño (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, N° de cat 43233) y se concentró hasta una concentración de 150  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  por ultrafiltración (MWCO de 10 kDa, Sartorius, Göttingen, Alemania, N° de cat. VS0202) en atmósfera de nitrógeno continua.

Los hidrogeles se prepararon mezclando 5 cantidades molares de GyrB<sub>116</sub> reducida con 1 cantidad molar de GyrB<sub>107</sub> reducida hasta una concentración final de proteína de 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Se añadió GyrB<sub>111</sub> reducida hasta una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Entonces se mezcló la solución de proteínas con coumermicina (Sigma Aldrich, St Louis, MO, N° de cat. C9270, 50 mg/ml en DMSO) a una relación molar de GyrB:coumermicina = 2:1. Tras la incubación a T.A. durante 1 h, se añadió PEG-VS en una relación molar de GyrB:grupos VS = 1:1. La formación del hidrogel se realizó mediante la incubación a 37 °C en una atmósfera humidificada durante 10 h.

*Ejemplo 4 – Incorporación del factor de crecimiento*

Los factores de crecimiento se producen en células de mamífero HEK293-T con una hexahistidina C-terminal y un marcador Fc. A través de su subunidad Fc, el factor de crecimiento se puede incorporar en el hidrogel mediante la unión al dominio ZZ de GyrB<sub>111</sub>. Tras la adición de novobiocina que conduce a la disolución del hidrogel, también se liberará el factor de crecimiento.

*Ejemplo 5 – Experimentos de adhesión celular*

Para evaluar la capacidad de adhesión celular optimizada del hidrogel con funcionalidad RGD desarrollado, se sembraron dos tipos de células de la cavidad oral, fibroblastos gingivales humanos (hGF) y queratinocitos gingivales humanos inmortalizados (IHGK), a una densidad celular de  $5 \times 10^4$  por hidrogel y se cultivaron durante 24 horas en condiciones convencionales de cultivo celular. La documentación del comportamiento del crecimiento celular y la morfología se realizaron mediante microscopía de contraste de fase (PCM). La configuración experimental incluye la comparación de los dos tipos diferentes de células cultivadas en los hidrogeles con o sin funcionalización RGD. La PCM de los hidrogeles sin secuencias RGD reveló una morfología atípica para hGF e IHGK. Ambos tipos de células parecían menos adheridas a la superficie del hidrogel según lo indicado por su morfología y mostraron una tasa de proliferación muy baja, que fue corroborada por la formación de solo islas de células pequeñas (Fig. 1, columna izquierda). En claro contraste, el comportamiento celular en los hidrogeles con secuencias RGD (funcionalización RGD) ilustró que este tipo de modificación produce un entorno confortable para los tipos de células en estudio. Más detalladamente, hGF e IHGK mostraron su morfología celular natural y, al contrario de las células que crecieron en hidrogeles sin secuencias RGD, mostraron un aumento drástico de la tasa de proliferación, lo que se evidenció por una alfombra celular casi completa revelada por el modo PCM (Fig. 1, columna derecha). Para verificar la adhesión apropiada de las células y la morfología celular normal, se fijaron hGF e IHGK cultivados en ambas configuraciones de hidrogel de (+/- RGD) con paraformaldehído y se sometieron a protocolos de inmunotinción. Para ilustrar la morfología celular, se trataron las células con el colorante de tinción (faloidina) que se intercala específicamente en los filamentos de actina del citoesqueleto. La comparación del patrón de tinción rojo fluorescente de hGF e IHGK en las configuraciones de hidrogel (+/- RGD) confirmó la observación de la microscopía de contraste de fase y reveló la morfología redondeada irregular de las células en los hidrogeles sin secuencias RGD (Fig. 2, columna izquierda). Por el contrario, hGF e IHGK cultivados en hidrogeles + secuencias RGD mostraron de nuevo su morfología celular normal, que se puso de relieve por la observación de la orientación de los filamentos de actina en la periferia de las células (Fig. 2, columna derecha).

Las secuencias RGD son puntos de adhesión celular de la matriz extracelular y son constituyentes del colágeno de tipo I y la fibronectina de las moléculas de la matriz. Las células pueden adherirse a estas secuencias RGD a través de ciertas subunidades de integrinas, entre las que se incluye la subunidad de integrina  $\beta 1$ . Por lo tanto, se analizó la distribución de la subunidad de integrina  $\beta 1$  en hGF y IHGK sembrados en las dos configuraciones de hidrogel de (+/- RGD). La comparación de la distribución de la señal verde fluorescente específica de la integrina  $\beta 1$  reveló de nuevo la acumulación en la periferia de las células en la configuración de hidrogel +RGD, que apunta a la adhesión celular apropiada, la formación de contactos focales y el desarrollo de una morfología celular normal (Fig. 3, columna

derecha). Por el contrario, la distribución de la integrina  $\beta 1$  en las células cultivadas en la configuración de hidrogel -RGD sugiere que las células no pueden encontrar puntos de adhesión apropiados en la superficie y, por lo tanto, se mantienen con una morfología redonda irregular (Fig. 3, columna izquierda). Por otra parte, la señal verde fluorescente específica de  $\beta 1$  permaneció muy débil, lo que apunta a una disminución de la expresión de la integrina  $\beta 1$  debida a la falta de sitios de adhesión (Fig. 3, columna izquierda). En resumen, la incorporación de secuencias RGD en el hidrogel representa una optimización del dispositivo médico de la invención con respecto a la proliferación y la adhesión de hGF e IHGK.

**Listado de secuencias**

10  
15  
20  
25  
30  
35  
40

- <110> universitätsklinikum Freiburg
- <120> Hidrogeles de PEG disolubles sensibles a estímulos biofuncionalizados
- <130> UF01P002EP
- <160> 53
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 660
- <212> ADN
- <213> Escherichia coli
- <220>
- <221> misc\_feature
- <223> Secuencia de nucleótidos que codifica GyrB
- <400> 1

```

atgtcgaatt cttatgactc ctccagtatc aaagtcctga aagggctgga tgcggtgcgt      60
aagcgcgccg gtatgtatat cggcgacacg gatgacggca ccggtctgca ccacatggta      120
ttcagagtg tagataacgc tatcgacgaa gcgctcgcgg gtcactgtaa agaaattatc      180
gtcaccattc acgccgataa ctctgtctct gtacaggatg acgggcgcgg cattccgacc      240
ggtattcacc cgaagaggg cgtatcggcg gcggaagtga tcatgaccgt tctgcacgca      300
ggcggtaaat ttgacgataa ctctataaaa gtgtccggcg gtctgcacgg cgttggtggt      360
tcggtagtaa acgccctgtc gcaaaaactg gagctggtta tccagcgcga gggtaaaatt      420
caccgtcaga tctacgaaca cgggtgtacc caggccccgc tggcggttac cggcgagact      480
gaaaaaacgg gcacatggt gcgtttctgg cccagcctcg aaaccttcac caatgtgacc      540
gagttcgaat atgaaattct ggcgaaacgt ctgcgtgagt tgctgttcct caactccggc      600
gtttccattc gtctgcgcga caagcgcgac ggcaaagaag accacttcca ctatgaaggc      660

```

- <210> 2
- <211> 220
- <212> PRT
- <213> Escherichia coli
- <400> 2

Met Ser Asn Ser Tyr Asp Ser Ser Ser Ile Lys Val Leu Lys Gly Leu  
 1 5 10 15

Asp Ala Val Arg Lys Arg Pro Gly Met Tyr Ile Gly Asp Thr Asp Asp  
 20 25 30

Gly Thr Gly Leu His His Met Val Phe Glu Val Val Asp Asn Ala Ile  
 35 40 45

Asp Glu Ala Leu Ala Gly His Cys Lys Glu Ile Ile Val Thr Ile His  
 50 55 60

Ala Asp Asn Ser Val Ser Val Gln Asp Asp Gly Arg Gly Ile Pro Thr  
 65 70 75 80

Gly Ile His Pro Glu Glu Gly Val Ser Ala Ala Glu Val Ile Met Thr  
 85 90 95

Val Leu His Ala Gly Gly Lys Phe Asp Asp Asn Ser Tyr Lys Val Ser  
 100 105 110

Gly Gly Leu His Gly Val Gly Val Ser Val Val Asn Ala Leu Ser Gln  
 115 120 125

Lys Leu Glu Leu Val Ile Gln Arg Glu Gly Lys Ile His Arg Gln Ile  
 130 135 140

Tyr Glu His Gly Val Pro Gln Ala Pro Leu Ala Val Thr Gly Glu Thr  
 145 150 155 160

Glu Lys Thr Gly Thr Met Val Arg Phe Trp Pro Ser Leu Glu Thr Phe  
 165 170 175

Thr Asn Val Thr Glu Phe Glu Tyr Glu Ile Leu Ala Lys Arg Leu Arg  
 180 185 190

Glu Leu Ser Phe Leu Asn Ser Gly Val Ser Ile Arg Leu Arg Asp Lys  
 195 200 205

Arg Asp Gly Lys Glu Asp His Phe His Tyr Glu Gly  
 210 215 220

<210> 3  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia peptidica RGD

<400> 3

Arg Gly Asp  
 1

5  
<210> 4  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Secuencia peptídica RGD

10  
<400> 4

**Arg Gly Asp Ser**  
**1**

15  
<210> 5  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Secuencia peptídica RGD

20  
<220>  
<221> REPETICIÓN  
<222> (1)..(4)  
<223> número de repeticiones = 1-10  
  
25  
<400> 5

**Arg Gly Asp Ser**  
**1**

30  
<210> 6  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
35  
<220>  
<223> Secuencia peptídica RGD

<400> 6

**Gly Arg Gly Asp**  
**1**

40  
<210> 7  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
45  
<220>  
<223> Secuencia peptídica RGD

50  
<400> 7

**Arg Gly Asp Val**  
**1**

55  
<210> 8  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
60  
<220>  
<223> Secuencia peptídica RGD

<400> 8

**Arg Gly Asp Thr**  
**1**

5 <210> 9  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia peptídica RGD

<400> 9

**Gly Arg Gly Asp Gly**  
**1 5**

15 <210> 10  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Secuencia peptídica RGD

25 <400> 10

**Gly Arg Gly Asp Ser**  
**1 5**

30 <210> 11  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Secuencia peptídica RGD

<400> 11

**Gly Arg Gly Asp Tyr**  
**1 5**

40 <210> 12  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Secuencia peptídica RGD

50 <400> 12

**Gly Arg Gly Asp Phe**  
**1 5**

55 <210> 13  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia peptídica RGD

5 <400> 13

**Tyr Arg Gly Asp Ser**  
**1 5**

10 <210> 14  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia peptídica RGD

<400> 14

**Tyr Arg Gly Asp Gly**  
**1 5**

20 <210> 15  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Secuencia peptídica RGD

<400> 15

30

**Tyr Gly Arg Gly Asp**  
**1 5**

35 <210> 16  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Secuencia peptídica RGD

<400> 16

**Gly Arg Gly Asp Ser Pro**  
**1 5**

45 <210> 17  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Secuencia peptídica RGD

<400> 17

55

**Gly Arg Gly Asp Ser Gly**  
**1 5**

5  
<210> 18  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Secuencia peptídica RGD

10  
<400> 18

**Gly Arg Gly Asp Ser Pro**  
**1 5**

15  
<210> 19  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Secuencia peptídica RGD  
  
20  
<400> 19

**Gly Arg Gly Asp Ser Tyr**  
**1 5**

25  
<210> 20  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
30  
<220>  
<223> Secuencia peptídica RGD  
  
<400> 20

**Gly Arg Gly Asp Val Tyr**  
**1 5**

35  
  
40  
<210> 21  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Secuencia peptídica RGD  
  
45  
<400> 21

**Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys**  
**1 5**

50  
<210> 22  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
55  
<220>  
<223> Secuencia peptídica RGD  
  
<400> 22

**Cys Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys**  
**1 5**

5 <210> 23  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia peptídica RGD  
<400> 23

**Cys Gly Arg Gly Asp Ser Tyr**  
**1 5**

15 <210> 24  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Secuencia peptídica RGD  
<400> 24

**Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser**  
**1 5**

25 <210> 25  
<211> 10  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Secuencia peptídica RGD

40 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> ACETILACIÓN  
<400> 25

**Cys Gly Gly Asn Gly Glu Pro Arg Gly Asp**  
**1 5 10**

45 <210> 26  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Secuencia peptídica RGD  
<400> 26

**Tyr Arg Ala Tyr**  
**1**

55 <210> 27

<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia peptídica RGD

10

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN

<400> 27

Gly Cys Gly Tyr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly  
 1 5 10

15

<210> 28  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Secuencia peptídica RGD

25

<400> 28

Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro  
 1 5 10

30

<210> 29  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35

<220>  
 <223> Secuencia peptídica RGD

40

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN

<400> 29

Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Gly  
 1 5 10

45

<210> 30  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> Secuencia peptídica RGD

55

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> bAla

60

<220>  
 <221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)  
<223> Dpr

<400> 30

5

**Ala Xaa Glu Pro Arg Gly Asp Asn Tyr Arg Cys**  
**1 5 10**

<210> 31  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Secuencia peptídica RGD

15

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (5)..(5)  
<223> Variante de D-aminoácido de fenilalanina

20

<400> 31

**Lys Arg Gly Asp Phe**  
**1 5**

25

<210> 32  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30

<220>  
<223> Secuencia peptídica RGD

35

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> x = Pen = Penicilina

<400> 32

**Gly Xaa Gly Arg Gly Asp Ser Pro Cys Ala**  
**1 5 10**

40

<210> 33  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45

<220>  
<223> Secuencia peptídica RGD

50

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Variante de D-aminoácido de valina

55

<400> 33

**Val Arg Gly Asp Glu**  
**1 5**

<210> 34  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> marcador de purificación  
 <400> 34  
 10  
**Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys**  
**1 5**  
 <210> 35  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> marcador de purificación  
 20  
 <400> 35  
**Tyr Pro Tyr Asp Val Pro**  
**1 5**  
 <210> 36  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> marcador de purificación  
 30  
 <400> 36  
**Ile Leu Lys Lys Ala Thr Ala Tyr Ile Leu**  
**1 5 10**  
 35  
 <210> 37  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> marcador de purificación  
 <400> 37  
 45  
**Ile Leu Lys Lys Ala Thr Ala Tyr Ile Leu**  
**1 5 10**  
 <210> 38  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> dominio ZZ

<400> 38

Ala Lys His Gln Ala Lys Cys Asn Ile Cys Lys Glu Cys Pro Ile Ile  
1 5 10 15

Gly Phe Arg Tyr Arg Ser Leu Lys His Phe Asn Tyr Asp Ile Cys Gln  
20 25 30

Ser Cys Phe Phe Ser Gly Arg  
35

5

<210> 39

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> dominio ZZ

15

<400> 39

Ala Lys His Gln Ala Lys Cys Asn Ile Cys Lys Glu Cys Pro Ile Val  
1 5 10 15

Gly Phe Arg Tyr Arg Ser Leu Lys His Phe Asn Tyr Asp Val Cys Gln  
20 25 30

Ser Cys Phe Phe Ser Gly Arg  
35

20

<210> 40

<211> 128

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> dominio ZZ

<400> 40

Ala Gln His Asp Glu Ala Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln  
 1 5 10 15  
 Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln  
 20 25 30  
 Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala  
 35 40 45  
 Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50 55 60  
 Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
 65 70 75 80  
 Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln  
 85 90 95  
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
 100 105 110  
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Asn Ser Ser  
 115 120 125

- 5 <210> 41
- <211> 4
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> secuencia espaciadora peptídica
- <220>
- <221> REPETICIÓN
- <222> (1)..(4)
- <223> número o repeticiones = 1 a 5
- 15 <400> 41

Ser Gly Gly Gly  
 1

- 20 <210> 42
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
- <223> secuencia espaciadora peptídica
- <220>
- <221> REPETICIÓN
- <222> (1)..(5)
- <223> número o repeticiones = 1 a 5
- <400> 42

Ser Gly Gly Gly Gly  
 1 5

35

ES 2 423 798 T3

5 <210> 43  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> secuencia espaciadora peptídica

10 <220>  
 <221> REPETICIÓN  
 <222> (1)..(6)  
 <223> número o repeticiones = 1 a 5

15 <400> 43

Ser Gly Gly Gly Gly Gly  
 1 5

20 <210> 44  
 <211> 723  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos de pRG107  
 <400> 44

<b>atgtgctcga attccttatga ctccctccagt atcaaagtcc tgaaagggct ggatgcggtg</b>	<b>60</b>
<b>cgtaagcgcc cgggtatgta taccggcgac acggatgacg gcaccgggtct gcaccacatg</b>	<b>120</b>
<b>gtattcgagg tggtagataa cgctatcgac gaagcgcctcg cgggtcactg taaagaaatt</b>	<b>180</b>
<b>atcgtcacca ttcacgccga taactctgtc tctgtacagg atgacgggcg cggcattccg</b>	<b>240</b>
<b>accggtattc acccggaaga gggcgtatcg gcggcggaag tgatcatgac cgttctgcac</b>	<b>300</b>
<b>gcaggcggta aatttgacga taactcctat aaagtgtccg gcgggtctgca cggcgttggt</b>	<b>360</b>
<b>gtttcggtag taaacgccct gtcgcaaaaa ctggagctgg ttatccagcg cgagggtaaa</b>	<b>420</b>
<b>attcaccgtc agatctacga acacgggtgta ccgcaggccc cgctggcggg taccggcgag</b>	<b>480</b>
<b>actgaaaaaa ccggcaccat ggtgcgtttc tggcccagcc tcgaaacctt caccaatgtg</b>	<b>540</b>
<b>accgagttcg aatatgaaat tctggcgaaa cgtctgcgtg agttgtcgtt cctcaactcc</b>	<b>600</b>
<b>ggcgtttcca ttcgtctgcg cgacaagcgc gacggcaaaag aagaccactt ccactatgaa</b>	<b>660</b>
<b>ggcggccgtg gcgatagccc tggtcgtggt gactctccac atcatcacca tcaccattgc</b>	<b>720</b>
<b>tga</b>	<b>723</b>

30 <210> 45  
 <211> 240  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Secuencia proteica de pRG107  
 <400> 45

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

5 <210> 46  
 <211> 1071  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos de pRG111

ES 2 423 798 T3

<400> 46

```

atggcgcaac acgatgaagc cgtagacaac aaattcaaca aagaacaaca aaacgcgttc      60
tatgagatct tacatttacc taacttaaac gaagaacaac gaaacgcctt catccaaagt      120
ttaaagatg  acccaagcca aagcgctaac cttttagcag aagctaaaaa gctaaatgat      180
gctcaggcgc cgaaagtaga caacaaattc aacaaagaac aacaaaacgc gttctatgag      240
atcttacatt tacctaactt aaacgaagaa caacgaaacg cttcatcca aagtttaaaa      300
gatgacccaa gccaaagcgc taacctttta gcagaagcta aaaagctaaa tgatgctcag      360
gcgccgaaag tagacgcgaa ttcgagcatg tcgaattctt atgactcctc cagtatcaaa      420
gtcctgaaag ggctggatgc ggtgcgtaag cgcccgggta tgtatatcgg cgacacggat      480
gacggcaccg gtctgcacca catggtattc gaggtgtag ataacgctat cgacgaagcg      540
ctcgcggggtc actgtaaaga aattatcgtc accattcacg ccgataactc tgtctctgta      600
caggatgacg ggcgcggcat tccgaccggt attcaccgag aagagggcgt atcggcggcg      660
gaagtgatca tgaccgttct gcacgcaggc ggtaaatttg acgataactc ctataaagtg      720
tccggcggtc tgcacggcgt tgggttttcg gtagtaaacg ccctgtcgca aaaactggag      780
ctggttatcc agcgcgaggg taaaattcac cgtcagatct acgaacacgg tgtaccgcag      840
gccccgctgg cggttaccgg cgagactgaa aaaaccggca ccatggtgag tttctggccc      900
agcctcgaaa cttcaccaa tgtgaccgag ttcgaatatg aaattctggc gaaacgtctg      960
cgtgagttgt cgttcctcaa ctccggcgtt tccattcgtc tgcgcgacaa gcgcgacggc     1020
aaagaagacc acttccacta tgaaggccat catcaccatc accattgctg a             1071
    
```

5 <210> 47  
 <211> 356  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia proteica de pRG111  
 <400> 47

```

Met Ala Gln His Asp Glu Ala Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln
 1                5                10                15

Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu
                20                25                30
    
```

15

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

ES 2 423 798 T3

Phe Thr Asn Val Thr Glu Phe Glu Tyr Glu Ile Leu Ala Lys Arg Leu  
 305 310 315 320

Arg Glu Leu Ser Phe Leu Asn Ser Gly Val Ser Ile Arg Leu Arg Asp  
 325 330 335

Lys Arg Asp Gly Lys Glu Asp His Phe His Tyr Glu Gly His His His  
 340 345 350

His His His Cys  
 355

5 <210> 48  
 <211> 720  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos de pRG116  
 <400> 48

atgtcgaatt cttatgactc ctccagtatc aaagtcctga aagggctgga tgcggtgcgt 60  
 aagcgccccg gtatgtatat cggcgacacg gatgacggca cgggtctgca ccacatggta 120  
 ttcgaggtgg tagataacgc tatcgacgaa gcgctcgcgg gtcactgtaa agaaattatc 180  
 gtcaccattc acgccgataa ctctgtctct gtacaggatg acgggcgcg g cattccgacc 240  
 ggtattcacc cggaagaggg cgtatcggcg gcggaagtga tcatgaccgt tctgcacgca 300  
 ggcggtaaat ttgacgataa ctctataaaa gtgtccggcg gtctgcacgg cgttggtgtt 360  
 tcggtagtaa acgccctgtc gcaaaaactg gagctgggta tccagcgcg gggtaaaatt 420  
 caccgtcaga tctacgaaca cgggtgtacc gaggccccgc tggcggttac cggcgagact 480  
 gaaaaaacgg gcaccatggt gcgtttctgg cccagcctcg aaaccttcac caatgtgacc 540  
 gagttcgaat atgaaattct ggcgaaacgt ctgcgtgagt tgtcgttcct caactccggc 600  
 gtttccattc gtctgcgca caagcgcgac ggcaaagaag accacttcca ctatgaaggc 660  
 ggccgtggcg atagccctgg tcgtggtgac tctccacatc atcaccatca ccattgctga 720

15 <210> 49  
 <211> 239  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia proteica de pRG116  
 <400> 49

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

<210> 50  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

5

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> factor de crecimiento FGF-7

10

ES 2 423 798 T3

<400> 50

Met His Lys Trp Ile Leu Thr Trp Ile Leu Pro Thr Leu Leu Tyr Arg  
1 5 10 15  
Ser Cys Phe His Ile Ile Cys Leu Val Gly Thr Ile Ser Leu Ala Cys  
20 25 30  
Asn Asp Met Thr Pro Glu Gln Met Ala Thr Asn Val Asn Cys Ser Ser  
35 40 45  
Pro Glu Arg His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Glu Asp Ile  
50 55 60  
Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp  
65 70 75 80  
Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Ser  
85 90 95  
Lys Gly Asn Tyr Asn Gly Pro Lys Val Ala  
100 105

5

<210> 51  
<211> 1083  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Secuencia de nucleótidos de FGF-7-FC-His

15

<400> 51

ES 2 423 798 T3

```

atgcacaaat ggatactgac atggatcctg ccaactttgc tctacagatc atgctttcac      60
attatctgtc tagtgggtac tatatcttta gcttgcaatg acatgactcc agagcaaatg      120
gctacaaatg tgaactgttc cagccctgag cgacacacaa gaagttatga ttacatggaa      180
ggagaggata taagagtgag aagactcttc tgtcgaacac agtggtacct gaggatcgat      240
aaaagaggca aagtaaaagg gacccaagag atgaagaata attacagtaa gggtaactat      300
aacggtccta aggtagcgag tggtaggagc ggttcaggcg gaggtggctc tggcggtggc      360
ggatcgccca gagggcccac aatcaagccc tgctctccat gcaaatgccc agcacctaac      420
ctcgaggggtg gaccatccgt cttcatcttc cctccaaaga tcaaggatgt actcatgatc      480
tccctgagcc ccatagtcac atgtgtggtg gtggatgtga gcgaggatga cccagatgtc      540
cagatcagct ggtttgtgaa caacgtggaa gtacacacag ctacagacaca aacccataga      600
gaggattaca acagtactct ccgggtggtc agtgccctcc ccatccagca ccaggactgg      660
atgagtggca aggcgttcgc atgcgcggtc aacaacaaag acctcccagc gcccacgag      720
agaaccatct caaaacccaa agggtcagta agagctccac aggtatatgt cttgcctcca      780
ccagaagaag agatgactaa gaaacaggtc actctgacct gcatggtcac agacttcatg      840
cctgaagaca tttacgtgga gtggaccaac aacgggaaaa cagagctaaa ctacaagaac      900
actgaaccag tcctggactc tgatggttct tacttcatgt acagcaagct gagagtggaa      960
aagaagaact gggtaggaaag aatagctac tcctgttcag tgggccacga gggctctgcac     1020
aatcaccaca cgactaagag cttctcccgg actccgggta aacaccatca ccatcaccat     1080
tga

```

<210> 52

<211> 360

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia proteica de FGF-7-FC-His

<400> 52

5

10

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



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

## REIVINDICACIONES

1. Hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos que comprende una matriz de polímeros de PEG, que están modificados para contener al menos una proteína de fusión multifuncional, proteína de fusión multifuncional que comprende como componentes un péptido de unión al sustrato (SBP), un péptido de unión a RGD repetitivo, preferentemente un marcador para la purificación y al menos un conector N- y/o C-terminal; donde la al menos una proteína de fusión multifuncional está unida covalentemente al polímero de PEG, donde el péptido de unión al sustrato (SBP) está seleccionado de entre la secuencia N-terminal de la subunidad B de la ADN girasa de *Escherichia coli* (GyrB), de la secuencia N-terminal de la subunidad B de la ADN girasa de *Escherichia coli* de acuerdo con SEC ID N° 2 o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 80% de identidad con la secuencia de acuerdo con SEC ID N° 2, o de entre proteínas FKBP, F<sub>M</sub>, ToxT, DHFR, Cyp, E, PIP, TetR, ArgR, ArsR, HucR, FRB, estreptavidina, avidina, neutravidina, receptor de hormona esteroide, una hormona esteroide o una proteína de unión a heparina; donde el conector N- y/o C-terminal está seleccionado de entre un resto que contiene tiol, un aminoácido modificado con tiol o que contiene tiol, una cisteína, una homocisteína, un tiol acoplado a maleimida, un resto de vinilsulfona, secuencias peptídicas, enlaces peptídicos, una HaloTag, una SNAP-tag, una CLIP-tag, un enlace de reacción de transglutaminasa, aminoácidos o entidades de formación de quelatos NTA o una polihistidina de unión a un ión metálico multivalente, y donde la formación del gel se realiza uniendo el péptido de unión al sustrato (SBP) con su sustrato específico.
2. El hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de acuerdo con la reivindicación 1, donde el péptido de unión a RGD repetitivo tiene la fórmula (RGD<sub>n</sub>), donde n es 1, 2, 3, 4 o 5, y donde la secuencia RGD está seleccionada de entre una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEC ID N° 3 a 33, o una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 80%, preferentemente al menos un 90%, más preferentemente al menos un 95% e incluso más preferentemente al menos un 97,5% de identidad con la secuencia de acuerdo con cualquiera de SEC ID N° 3 a 33.
3. El hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, donde el polímero de PEG es un PEG estrella de múltiples brazos, preferentemente un polímero de PEG estrella de 3 a 15 brazos.
4. El hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, donde el polímero de PEG está modificado para permitir un enlace covalente (reticulación) con al menos una proteína de fusión multifuncional a través de un enlace tioéter.
5. El hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, donde el marcador para la purificación está seleccionado de entre un marcador His<sub>6</sub>, un marcador FLAG, un marcador HA o un marcador MYC.
6. El hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, donde la proteína de fusión multifuncional comprende como componentes un péptido de unión al sustrato (SBP), un péptido de unión a RGD repetitivo (RGD<sub>n</sub>), un marcador para la purificación y al menos un resto conector N- y/o C-terminal.
7. El hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, donde el hidrogel de PEG está además modificado con una proteína de fusión que comprende como componentes un péptido de unión al sustrato (SBP), un dominio ZZ, un marcador para la purificación y al menos un conector N- y/o C-terminal y/o una proteína de fusión que comprende como componentes un factor de crecimiento, opcionalmente un conector, opcionalmente un dominio F<sub>c</sub> y opcionalmente un marcador para la purificación.
8. El hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, donde están incorporadas células en el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos seleccionadas de entre células madre, células madre humanas, células madre adultas, células madre embrionarias, células madre diseñadas o no diseñadas mediante ingeniería genética, células madre primarias o inmortalizadas, células madre mesenquimales, osteoblastos, cementoblastos, células de fibroblastos derivadas de tejidos conjuntivos, fibroblastos gingivales, cutáneos y corneales, solos o junto con fibroblastos del ligamento periodontal, fibroblastos del ligamento periodontal, queratinocitos, queratinocitos gingivales, queratinocitos de la cavidad oral y del tracto aerodigestivo superior, así como de la piel o de la superficie ocular, células del sistema nervioso central, células neuronales, células endoteliales de tejido vascular y comeal, pericitos, miocitos, adipocitos, astrocitos y melanocitos.
9. El hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, donde están incorporados componentes adicionales en el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos seleccionados de entre células, proteínas, polipéptidos, factores de crecimiento, proteasas, antibióticos, anticuerpos, polímeros antimicrobianos y antiflogísticos permitidos clínicamente no esteroides, incluyendo derivados de (i) ácido acetilsalicílico, (ii) ácido arilpropiónico, (iii) ácido arilacético, (iv) ácido indolacético, (v) ácido antranílico y Oxicams, e inhibidores selectivos de la COX-2.

10. Método para la preparación del hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar al menos una proteína de fusión multifuncional según lo definido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9;
- b) mezclar la al menos una proteína de fusión multifuncional de acuerdo con la etapa a) con un sustrato para la proteína de unión al sustrato (SBP) según lo definido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9;
- c) añadir la mezcla obtenida de acuerdo con la etapa b) a un polímero de PEG según lo definido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, formando de este modo el hidrogel de PEG.

11. El hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso como un medicamento, un dispositivo médico o un producto médico.

12. Hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en implantología, dermatología en el tratamiento de carcinomas del tracto aerodigestivo superior, durante la otorrinolaringología o medicina de oído, nariz y garganta, para el tratamiento de heridas de la cavidad oral, para el tratamiento de heridas de la cavidad oral debidas a enfermedades tumorales, durante la cirugía oral y maxilofacial, para la prevención de la cresta alveolar tras la extracción dental, en el tratamiento de defectos periodontales, incluyendo el ligamento periodontal, para el tratamiento de enfermedades en el campo de la oftalmología, para el tratamiento de enfermedades de la córnea (humana) en un paciente por tratar, preferentemente, de la capa endotelial o epitelial de la córnea, y para el tratamiento de la distrofia endotelial de la córnea de Fuchs, para el uso en apósitos para quemaduras, parches hemostáticos, en el tratamiento de lesiones, en apósitos quirúrgicos, para el tratamiento de heridas, para la regeneración de tejido blando y duro, en el campo de la implantología, para la preparación de un implante celular para regenerar o reconstruir, íntegra o parcialmente, tejidos dañados o extirpados, para la preparación de un implante de células del sistema nervioso central como células neuronales para regenerar o reconstruir, íntegra o parcialmente, tejido neuronal, o como dispositivos de administración de fármacos o matrices celulares para aplicaciones *in vitro*, *in vivo* y/o *ex vivo*.

13. Kits, preferentemente de partes, que comprenden el hidrogel de PEG disoluble sensible a estímulos según lo definido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, opcionalmente, componentes adicionales para la incorporación en el hidrogel de PEG según lo definido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9 y, opcionalmente, instrucciones de uso.

14. Proteína de fusión multifuncional según lo definido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

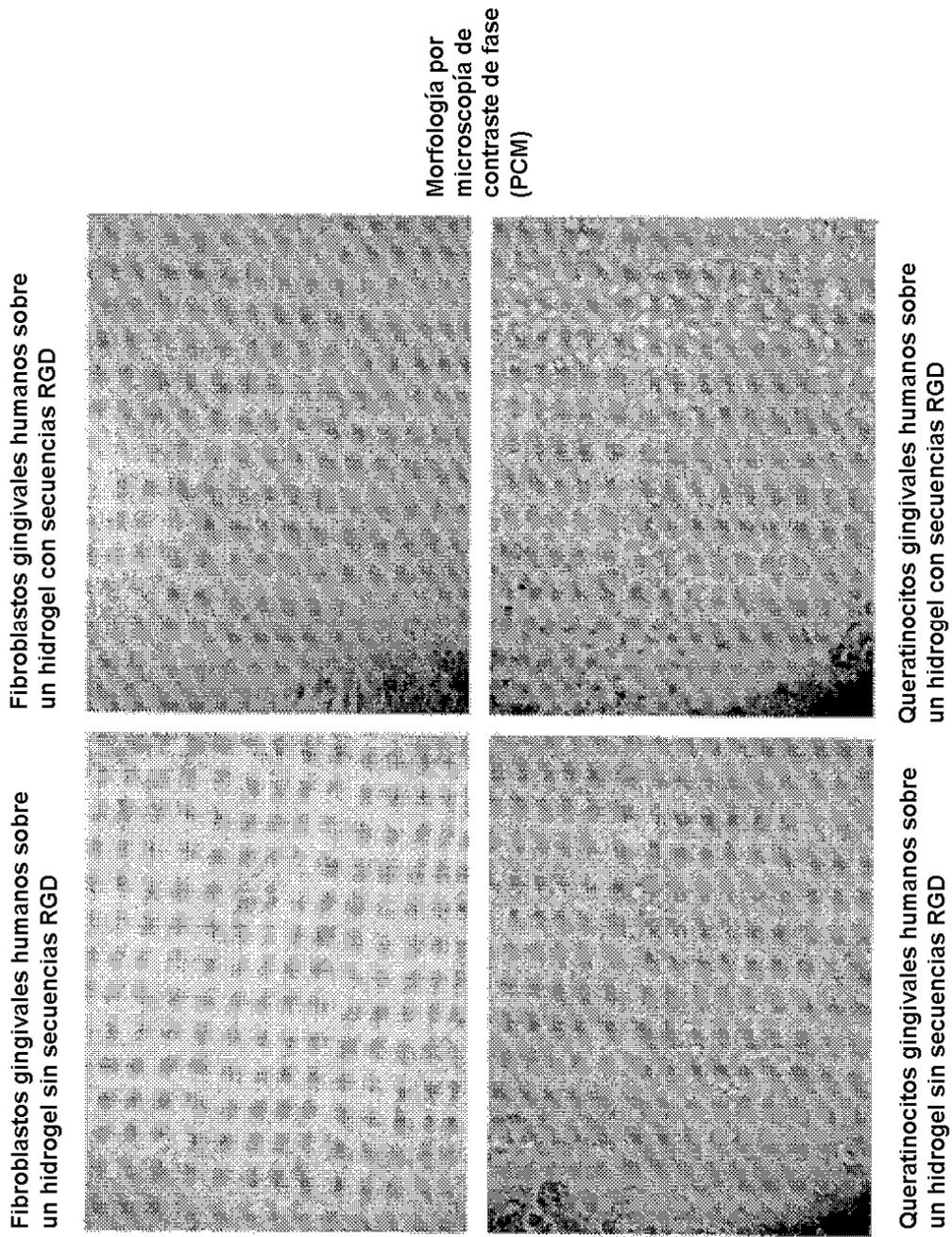


Figura 1

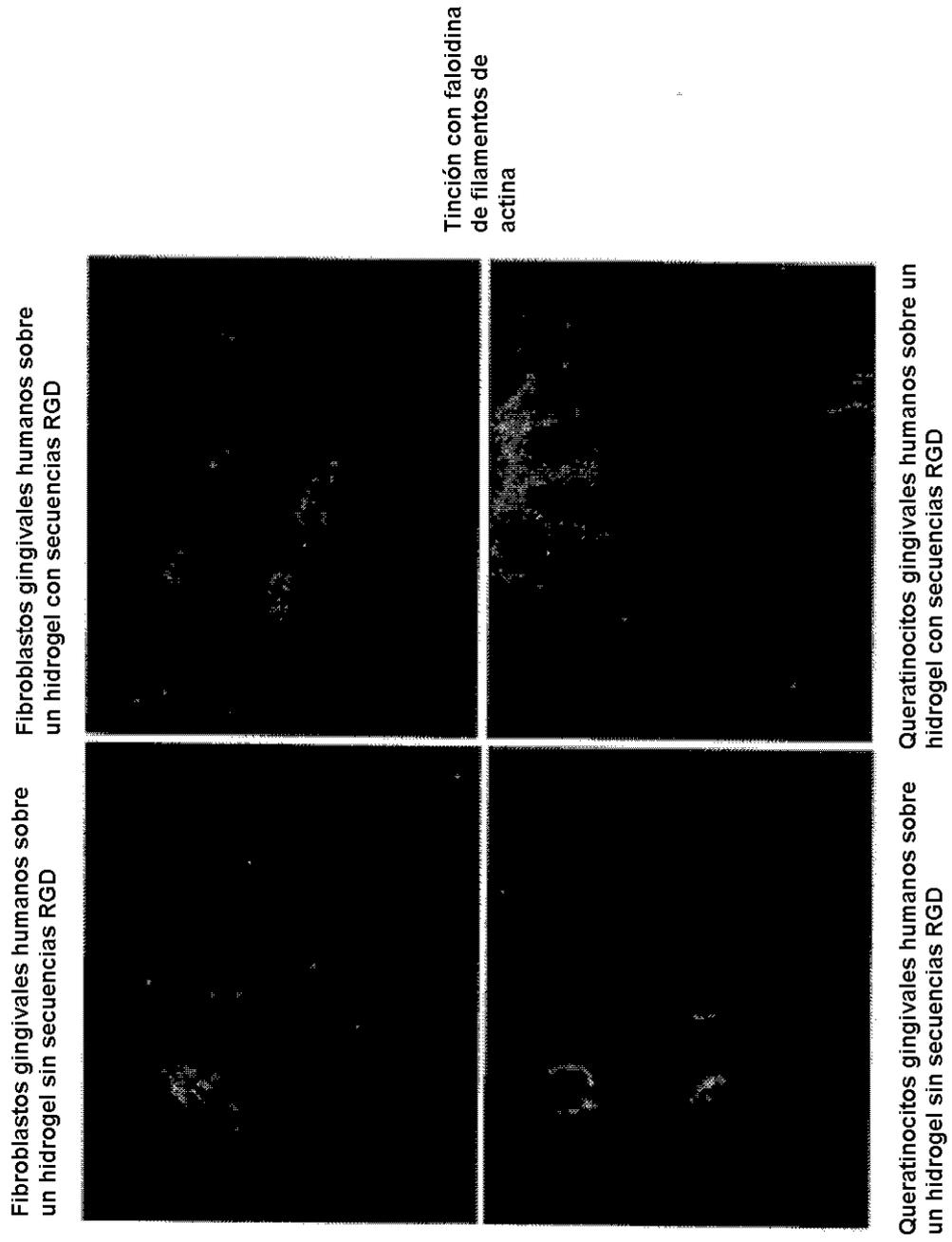


Figura 2

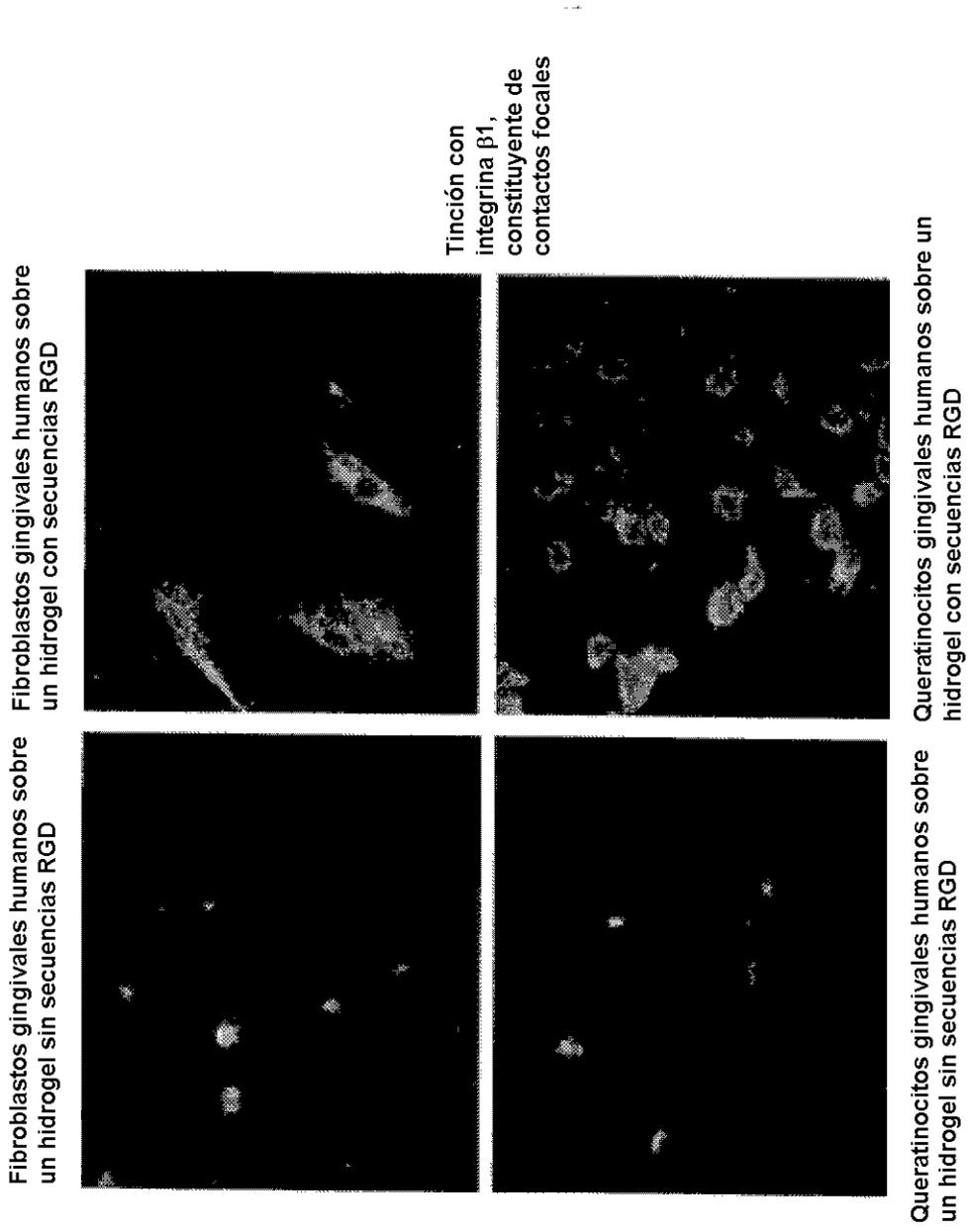


Figura 3

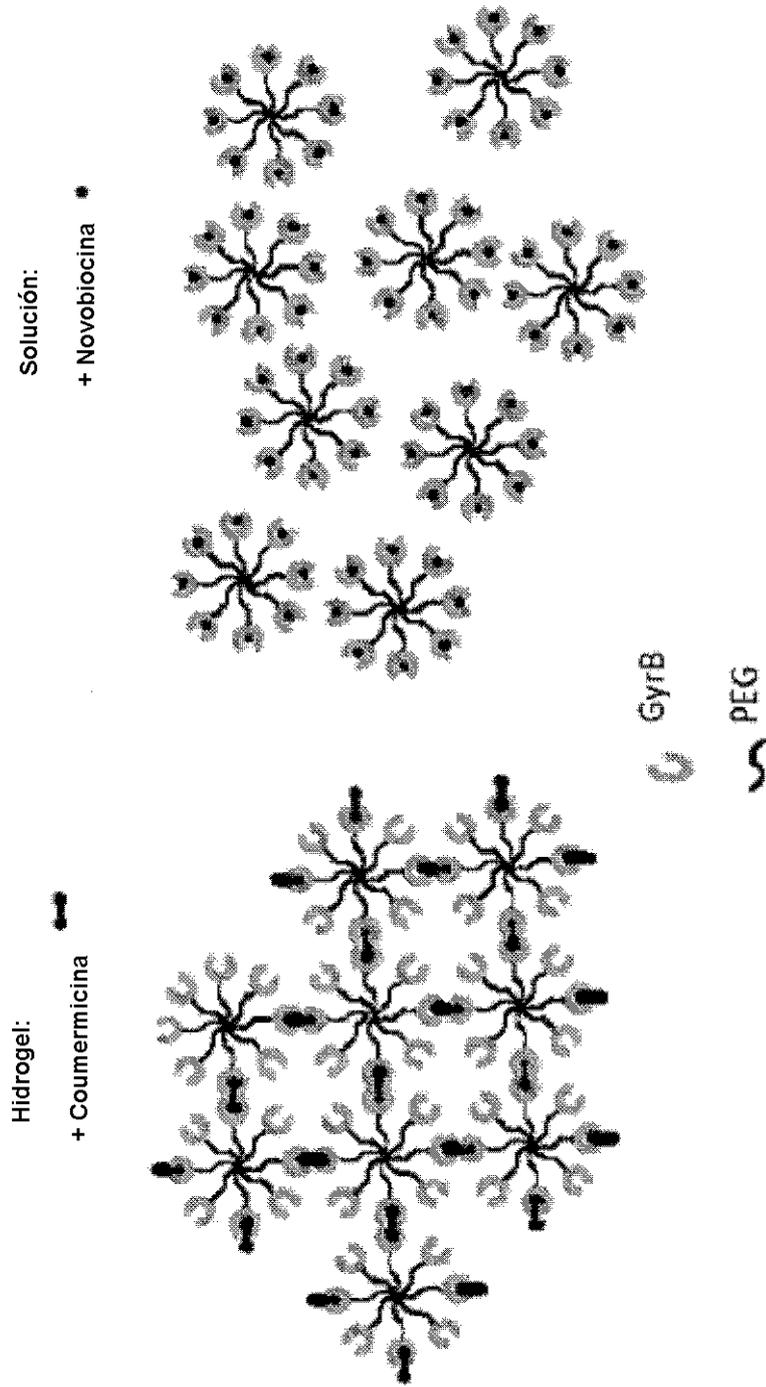


Figura 4

**GyzB**

**Secuencia de nucleótidos:**

ATGTCGAATTCTTATGACTCCTCCAGTATCAAAGTCCTGAAAGGGCTGGA  
TGCGGTGCGTAAGCGCCCGGGTATGTATATCGGGCAGACCGGATGACGGCA  
CCGGTCTGCACCACATGGTATTCGAGGTGGTAGATAACCGCTATCGACGAA  
GGCTCGCGGGTCACTGTAAGAAATTATCGTCACCATTACGCGCGATAA  
CTCTGTCTCTGTACAGGATGACGGCGCGGCATTCCGACCGGTATTCACC  
CGGAGAGGGCGTATCGGGCGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGCACGCA  
GGCGGTAAATTTGACGATAACTCCTATAAAGTGTCCGGCGGTCTGCACGG  
CGTTGGTGTTCGGTAGTAAACGCCCTGTCCGCAAAAACCTGGAGCTGGTTA  
TCCAGCGCGAGGGTAAATTCACCGTCAGTCTACGAACACGGTGTACCG  
CAGGCCCGCTGGCGGTTACCGCGGAGACTGAAAAAACCGGCACCATGGT  
GCGTTTCTGGCCCAGCCTCGAAACCTTCACCAATGTGACCGAGTTCGAAT  
ATGAAATTCGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTGTGTTTCTCAACTCCGGC  
GTTCCATTCGTCTGCGCGACAAGCGCGACGGCAAAGAAGACCACTCCA  
CTATGAAGGC

**Secuencia proteica:**

MSNSYDSSSIKVLKGLDAVRKRFGMYIGDIDDGTGLHHMVFEVVDNAIDEALA  
GHCKEIIVTIHADNSVSVQDDGRGIPTGIHP EEGVSAAEVINTVLHAGGKFDD  
NSYKVSGLHGVGVSVVNALSQKLELVIQREGKIHROIYEHGVFOAPLAVTGE  
TEKTGTMVRFWFSLETFTNVTEFEYEILAKRLRELSFLNSGVSIRLRDKRDGK  
EDRFHYEG

**Figura 5**

hRC107

**Secuencia de nucleótidos:**

ATGTGCTCGAATTCCTTATGACTCCTCCAGTATCAAAGTCCTGAAASGGCT  
GGATGCGGTGCGTAAGCGCCCCGGGTATGTATATCGGGCGACACGGATGACG  
GCACCGGTCTGCACCACATGGTATTCGAGGTGGTAGATAACGCTATCGAC  
GAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAAAGAAATTATCGTCACCATTACGCCGA  
TAACTCTGTCTGTGTACAGGATGACGGGGCGGSCATTCGGACCGGTATTC  
ACCCGGAAGAGGGCGTATCGGGCGGCGAAGTGATCATGACCGTCTGCAC  
GCAGGCGGTAAATTTGACGATAACTCCTATAAAGTGTCCGGCGGTCTGCA  
CGGCGTTGGTGTITCGGTAGTAAACGCCCTGTCCGCAAAAACGGAGCTGG  
TTATCCAGCGCGAGGGTAAAATTCACCGTCAGATCTACGAACACGGTGTA  
CCGCGAGGCCCGCTGGCGGTTACCGGCGAGACTGAAAAAACGGSCACCAT  
GGTGCGTTCCTGGCCCAGCCTCGAAACCTTCACCAATGTGACCGAGTTCG  
AATATGAAATTCCTGGCGAAACGTCTGCGTGTAGTTGTGCTTCCTCAACTCC  
GGCGTTTCCATTTCGTCTGCGCGACAAGCGCGACGGCAAAGAAGACCACTT  
CCACTATGAAGGCGGCCGTGGCGATAGCCCTGGTCSTGGTGACTCTCCAC  
ATCATCACCATCACCATTGCTGA

**Figura 6**

**PRG107**

**Secuencia proteica:**

MCSNSYDSSSIKVLKGLDAVRKRPGMYIGDTDDGTGLHHMVFEVVDNAIDEAL  
AGHCKEIIVTIHADNSVSVQDDGRGIPTGIHPPEGVSAAEVIMTVLHAGGKFD  
DNSYKVSGLHGVSVVNALSQKLELVIQREGKIHRQIYEHGVPQAPLAVTG  
ETEKTGTMVREWPSLETFTNVTEFEYEILAKRLRELSFLNSGVSIRLRDKRDG  
KEDHFFHYEGGRGDS PGRGDS PHHHHHNC

**Subunidades:**

AA1: inicio de metionina  
AA2: cisteína 1 para acoplarse a PEG-VS  
AA3-221: GyrB (1-220)  
AA222-233: motivo GRGDSP doble  
AA234-239: marcador de hexahistidina  
AA240: cisteína 2 para acoplarse a PEG-VS

**Figura 6 (Continuación)**

**PRG111**

**Secuencia de nucleótidos:**

ATGEGCAACACGATGRAGCCGTAGACAACAAATTC AACAAAGAACAACA  
AAACGCGTTCTATGAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAAC  
GAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGCGCTAAC  
CTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGA  
CAACAAATTC AACAAAGAACAACAACGCGTTCTATGAGATCTTACATT  
TACCTAACTTAAACGAAGAACAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAA  
GATGACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAA  
TGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACGCGAATTCGAGCATGTGGAATCTT  
ATGACTCCTCCAGTATCAAAGTCCTGAAAGGGCTGGATGCGGTGCGTAAG  
CGCCCGGGTATGTATATCGGCGACACGGATGACGGCACCGGTCTGCACCA  
CATGGTATTCGAGGTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTC  
ACTGTAAAGAAATTATCGTCCACCATTCACGCCGATAACTCTGTCTCTGTA  
CAGGATGACGGGCGCGGCATTCGACCGGTATTCACCCGGAAGAGGGCGT  
ATCGGCGGCGGAAGTGATCATGACCGTTCTGCACGCAGGCGGTAATTTG  
ACGATAACTCCTATAAAGTGTCCGGCGGTCTGCACGGCGTTGGTGTTCG  
GTAGTAAACGCCCTGTGCAAAAACCTGGAGCTGGTTATCCAGCGCGAGGG  
TAAATTCACCGTCAGATCTACGAACACGGTGTACCGCAGGCCCCGCTGG  
CGGTTACCGGCGAGACTGAAAAAACCGGCACCATGGTGCCTTCTGGCCC  
AGCCTCGAAACCTTCACCAATGTGACCGAGTTCGAATATGAAATCTGGC  
GAAACGCTCTGCGTGTGAGTTGTGCTTCCTCAACTCCGGCGTTTCCATTGTC  
TGCGCGACAAGGCGGACGGCAAAGAAGACCCTTCCACTATGAAGGCCAT  
CATCACCATCACCTTGCTGA

Figura 7

**PRG111**

**Secuencia proteica:**

MAQHDEAVONKFNKEQQNAFYELHLLENLNNEEQRNAPIQSLKDDPSQSANLLA  
EAKKLNDAQAPKVDNKNKEQQNAFYELHLLENLNNEEQRNAPIQSLKDDPSQS  
ANLLAEAKKLNDAQAPKVDANS SMSNSYDSSSIKVLKGLDAVRKRFGMYIGDT  
DDGTGLHHMVFEVVDNAIDEALAGHCKEIIVTIHADNSVSVQDDGRGIPTGIH  
PEEGVSAAEVIMTVLHAGGKFDNSYKVSGLHGVSVVNALSQKLELVIQR  
EGKIHRRQIYENGVPOAPLAVTGETEKTGTMVRFWPSLETFTNVTEFEYEILAK

**Subunidades:**

AA1-129: dominio de unión a ZZ, derivado de pEZZ-18 (vector comercial, GE healthcare)  
AA130-349: CyrB (1-220)  
AA350-355: marcador de hexahistidina  
AA356: cisteína para acoplarse a PEG-VS

**Figura 7 (Continuación)**

**PRG116**

**Secuencia de nucleótidos:**

ATGTCGAATTCTTATGACTCCTCCAGTATCAAAGTCCTGAAAGGGCTGGA  
TGGGGTGGCTAAGCGCCCGGGTATGTATATCGGGGACACGGATGACGGCA  
CCGGTCTGCACCACATGCTATTCGAGGTGGTAGATAACGCTATCGACGAA  
GGCTCGCGGGTCACTGTAAAGAAATTATCGTCACCATTACGCGCGATAA  
CTCTGTCTCTGTACAGGATGACGGGCGGGCATTCCGACCGGTATTCACC  
CGGAAGAGGGCGTATCGGGCGGCGAAGTGATCATGACCGTTCTGCACGCA  
GGCGGTAAATTTGACGATAACTCCTATAAAGTGTCCGGCGGTCTGCACGG  
CSTTGGTGTTTCGGTAGTAAACGCCCTGTTCGCAAAAACCTGGAGCTGGTTA  
TCCAGCGCGAGGGTAAATTCACCGTCAGATCTACGAACACGGTGTACCG  
CAGGCCCGCTGGCGGTTACCGGCGAGACTGAAAAAACCGGCACCATGGT  
GCSTTTCTGGCCAGCCTCSAAACCTTCACCAATGTGACCGAGTTCGAAT  
ATGAAATTCGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTGTCTGTTCCCTCAACTCCGGC  
GTTTCCATTCGTCTGCGCGACAAGCGCGACGGCAAAGAAGACCACCTTCCA  
CTATGAAGGCGGCCGTGGCGATAGCCCTGGTCTGTTGACTCTCCACATC  
ATCACCATCACCATTGCTGA

**Secuencia proteica:**

MSNSYDSSSIKVLKGLDAVRKRPGRMYIGDTDDGTGLHMHVFEVVDNAIDEALA  
GHCKEIIVTIHADNSVSVQDDGRGIPGTGIHPEDGVSAAEVIMTVLHAGGKFDD  
NSYKVSGLHGVGVSVVNALSQKLELVIQREGKIHROIYEHGVPQAPLAVTGE  
TEKTGTMVRFWPSLETFTNVTEFEYEILAKRLRELSFLNSGVSIRLRDKRDGK  
EDHFHYEGGRGDS PGRGDS PHHHHHC

**Subunidades:**

- AA1-220: GyrB (1-220)
- AA221-232: motivo GRGDSP doble
- AA233-238: marcador de hexahistidina
- AA239: cisteína 2 para acoplarse a PEG-VS

**Figura 8**

**FGF-7-Fc-His:**

**Secuencia de nucleótidos:**

ATGCACAAATGGATACTGACATGGATCCTGCCAACTTTGCTCTACAGATC  
ATGCTTTCACATTATCTGTCTAGTGGGTAATAATCTTTAGCTTGCAATG  
ACATGACTCCAGAGCAAATGGCTACAAATGTGAACTGTTCCAGCCCTGAG  
CGACACACAAGAAGTTATGATTACATGGAAGGAGAGGATATAAGAGTGAG  
AAGACTCTTCTGTGCAACACAGTGGTACCTGAGGATCGATAAAAAGAGGCA  
AAGTAAAAGGGACCCAAGAGATGAAGAATAATTACAGTAAGGGTAACTAT  
AACGGTCCFAAGGTAGCGAGTGGTGGAGGCGGTTCCAGGCGGAGGTGGCTC  
TGGCGGTGGCGGATCGCCCAGAGGGCCCAATCAAGCCCTGTCCCTCCAT  
GCAAATGCCAGCACCTAACCTCGAGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTC  
CCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCAC  
ATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCT  
GGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGA  
GAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCACTGCCCTCCCCATCCAGCA  
CCAGGACTGGATGAGTGGCAAGCCGTTTCGCATGCGCGGTCAACAACAAAG  
ACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGSTCAGTA  
AGAGCTCCACAGGTATATSTCTTGCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAA  
GAAACAGGTCACCTCTGACCTGCATGGTCAACAGACTTCATGCCTGAAGACA  
TTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAAC  
ACTGAACCACTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCT  
GAGAGTGGAAAAGAAGAAGTGGCTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTCAG  
TGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGG  
ACTCCGGGTAAACACCATCACCATCACCATTGA

**Figura 9**

**FGF-7-Fc-His:**

**Secuencia proteica:**

MHKWILTWILPTLLYRSCFHIIICLVGTISLACNDMTPEQMATNVNCSSPERHT  
RSYDYMEGEDIRVRRLFCRTQWYLRLDKRGKVKGTQEMKNNYSKGNYNPKVA  
SGGGGSGGGGSGGGGS PRGPTIKPCPPCKCPAPNLEGGPSVFI FPPKIKDVLN  
ISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVSA  
LPIQHODWMSGKAFACAVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEM  
TKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTPEVLDSGGSYFMYSKLR  
VEKKNWVERNSYSVSVHEGLNHHHTTKSFSRTPGKHHHHHH

**Subunidades:**

AA1-106: FGF-7 (=KGF)

AA107-122: conector de serina-glicina

AA123-354: dominio Fc

AA355-360: marcador de hexahistidina

**Figura 9 (Continuación)**