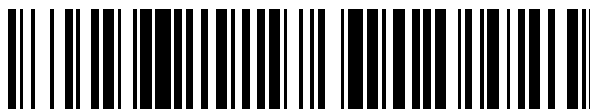


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 651**

51 Int. Cl.:

A61L 24/10 (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61L 27/18 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2007 E 07110777 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 1870115**

54 Título: **Composiciones de liberación inmediata para el tratamiento de daños tisulares**

30 Prioridad:

22.06.2006 US 472520

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

28.03.2014

73 Titular/es:

REGENTIS BIOMATERIALS LTD. (100.0%)
2 Ha'llan Street, P.O.B. 260, North Industry Zone
Or-Akiva 30600, IL

72 Inventor/es:

SELIKTAR, DROR y
ALMANY, LIORA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 451 651 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

Composiciones de liberación inmediata para el tratamiento de daños tisulares

5 Campo y antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a composiciones según lo definido en las reivindicaciones para el tratamiento de trastornos asociados con el daño tisular.

- 10 Más detalladamente, la presente invención se refiere a una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno caracterizado por un daño tisular, composición que comprende PEG unido a fibrinógeno desnaturalizado y que está formulada para la liberación inmediata de un producto de escisión enzimática de dicho fibrinógeno desnaturalizado, comprendiendo dicho producto actividad terapéutica, en la que dicha liberación inmediata se efectúa usando una formulación no reticulada, es decir, no sometida a una reacción de polimerización de radicales
- 15 libres, que tiene una proporción molar de PEG:fibrinógeno desnaturalizado de 2:1 a 350:1. La composición está formulada preferentemente para la administración local o sistémica. La enzima se selecciona preferentemente del grupo que consiste en plasmina, colagenasa y tripsina. El producto de escisión enzimática es preferentemente como el expuesto en la SEC ID N° 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8. El PEG se selecciona preferentemente del grupo que consiste en acrilato de PEG (PEG-Ac) y vinilsulfona de PEG (PEG-VS). El PEG-Ac se selecciona preferentemente del grupo que
- 20 consiste en PEG-DA, multiacrilato de PEG en estrella de 4 brazos y multiacrilato de PEG en estrella de 8 brazos. El PEG-DA es preferentemente un PEG-DA de 4 kDa, PEG-DA de 6 kDa, PEG-DA de 10 kDa y/o PEG-DA de 20 kDa.

- La ingeniería tisular, es decir, la generación *in vitro* de nuevos tejidos vivos, se usa ampliamente para remplazar tejidos enfermos, traumatizados y otros tejidos no sanos. La estrategia clásica de la ingeniería tisular utiliza células vivas y un almacén básico para el cultivo celular (Langer y Vacanti, 1993; Nerem y Seliktar, 2001). Por lo tanto, la estructura de almacén intenta imitar la estructura natural del tejido que se está reemplazando y proporcionar un soporte funcional temporal para las células (Griffith L. G., 2002).
- 25

- Los almacenes de ingeniería tisular se fabrican o bien a partir de materiales biológicos o de polímeros sintéticos. Los polímeros sintéticos tales como polietilenglicol (PEG), hidroxipatita/policaprolactona (HA/PLC), ácido poliglicólico (PGA), ácido poli-L-láctico (PLLA), polimetilmetacrilato (PMMA), polihidroxialcanoato (PHA), poli-4-hidroxibutirato (P4HB), polipropilén fumarato (PPF), dimetacrilato de polietilenglicol (PEG-DMA), fosfato beta-tricálcico (beta-TCP) y politetrafluoroetileno (PTFE) no biodegradable proporcionan un control preciso sobre las propiedades físicas del material (Drury y Mooney, 2003).
- 30

- Los métodos comunes de fabricación de almacenes están basados en espumas de polímeros sintéticos. Sin embargo, la migración celular en el interior de los almacenes sintéticos está limitada por la ausencia de oxígeno y el suministro de nutrientes. Para superar dichas limitaciones, se han desarrollado nuevas estrategias que utilizan fabricaciones sólidas de forma libre y arquitectura vascular interna (Revisado en Sachlos E. y Czernuszka J. T., 2003; *Eur. Cell Mater.* 5: 29-39). Asimismo, también se emplean métodos de liofilización para crear estructuras tridimensionales únicas con distinta porosidad y permeabilidad. Sin embargo, la creación de poros en estos materiales es un procedimiento agresivo que implica el uso de condiciones tóxicas que eliminan la posibilidad de moldear previamente las construcciones tisulares con células vivas. Por lo tanto, muchos de los materiales prefabricados están sometidos a una siembra de células no uniforme y a poblaciones de células no homogéneas dentro de las construcciones. Además, generalmente, los materiales se degradan desigualmente durante el proceso de cultivo tisular, creando un tejido muy anisotrópico con una cinética de crecimiento modificada.
- 35
- 40
- 45

- Los almacenes fabricados con PEG son muy biocompatibles (Merrill y Salzman, 1983) y presentan características físicas versátiles basándose en su porcentaje en peso, longitud de la cadena molecular y densidad de reticulación (Temenoff J. S. *et al.*, 2002). Además, los hidrogeles de PEG pueden tener una transición controlada de líquido a sólido (gelificación) en presencia de suspensión celular (Elbert y Hubbell, 2001). Por otra parte, la reacción de gelificación del PEG (es decir, PEGilación) se puede llevar a cabo en condiciones no tóxicas en presencia de un fotoiniciador (Elisseff J. *et al.*, 2000; Nguyen y West, 2002) o mezclando una solución reactiva bifásica de PEG funcionalizado y reticulando los constituyentes (Lutolf y Hubbell, 2003).
- 50
- 55

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

- 60 Por otro lado, los almacenes de origen natural tales como colágeno, fibrina, alginato, ácido hialurónico, gelatina y celulosa bacteriana (CB) proporcionan señales biofuncionales y presentan diversas interacciones celular. Por ejemplo, la fibrina, un sustrato natural de remodelación tisular (Herrick S., *et al.*, 1999), contiene diversos dominios de señalización celular tales como un sustrato de degradación por proteasas (Werb Z., 1999) y dominios de adhesión celular (Herrick S., 1999). Sin embargo, debido a que dichos materiales biológicos presentan múltiples señales intrínsecas (por ejemplo, regulación de la adhesión celular, proliferación, fenotipo celular, producción de matriz y actividad enzimática), su uso como almacenes en la regeneración tisular a menudo produce una regulación
- 65

anómala de los sucesos celulares (Hubbell, 2003). Además, los armazones naturales suelen ser mucho más débiles tras la reconstitución en comparación con la resistencia del material biológico original, y se puede ejercer un escaso control para mejorar sus propiedades físicas.

- 5 Otro inconveniente de los armazones naturales (por ejemplo, colágeno y fibrina) para la modificación por ingeniería genética de tejidos es el control limitado sobre las propiedades físicas de la red polimérica. Por ejemplo, el colágeno reconstituido sufre fibrillogénesis y auto-ensamblaje para formar una red interpenetrante de fibrillas a escala nanométrica que se asocian libremente entre sí mediante interacciones inespecíficas, tales como enlaces de hidrógeno. En comparación con las fibras de colágeno altamente organizadas y reticuladas enzimáticamente de la estructura del tejido normal, la red interpenetrante de las fibrillas presenta una baja resistencia física y porosidad tisular súper-fisiológica. Por otra parte, la configuración específica de las fibrillas combinada con la estructura de poros abiertos de la red interpenetrante deja la estructura de la proteína fácilmente accesible y susceptible a las proteasas de libre difusión del tejido huésped circundante o sistema de cultivo celular. Esto a menudo produce el deterioro incontrolado y prematuro del armazón en presencia de proteasas secretadas por las células. Las discrepancias en la estructura y función de los hidrogeles proteicos reconstituidos en comparación con los naturales instan al desarrollo de sistemas de armazón biomiméticos para su implementación en muchas aplicaciones prácticas de ingeniería tisular.

- Hasta la fecha, se ha desarrollado una serie de técnicas para la modificación y mejora de las propiedades fisicoquímicas de los hidrogeles proteicos reconstituidos que les impiden una rápida degradación. Los hidrogeles de colágeno y fibrina se pueden procesar mediante la liofilización de la construcción para aumentar la resistencia a la tracción y el módulo de tracción de la red proteica. Sin embargo, la liofilización requiere una etapa de congelación previa a la fabricación que elimina la posibilidad de gelificar el polímero en presencia de células y también elimina los beneficios de la polimerización *in situ*. El proceso de liofilización también afecta a la arquitectura molecular de la red polimérica, alterando la malla de nano-fibras y convirtiéndola en una estructura de esponja macro-porosa. Se han propuesto otras técnicas para mejorar las propiedades físicas de los hidrogeles naturales, manteniendo a la vez la estructura de nano-fibras basándose en las reticulaciones covalentes, incluyendo el uso de aldehídos, carbodiimidas [Park S. N., Park J. C., Kim H. O., Song M. J., Suh H. "Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking". *Biomaterials*. Feb. de 2002; 23(4):1205-12] y *N*-hidroxisuccinimidias (NHS) en presencia de aminoácidos [Ma L., Gao C., Mao Z., Zhou J., Shen J. "Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges". *Biomaterials*. Julio de 2004; 25(15): 20 2997-3004; Ma L., Gao C., Mao Z., Zhou J., Shen J. "Biodegradability and cell-mediated contraction of porous collagen scaffolds: the effect of lysine as a novel crosslinking bridge". *J Biomed Mater Res A*. 1 de noviembre de 2004; 71(2):334-42]. Todos los procedimientos de reticulación ofrecen algunas mejoras de la estabilidad física del armazón, pero lo hacen mediante la introducción de una etapa de fabricación tóxica que requiere extensos lavados y aumenta la probabilidad de que las toxinas residuales del armazón afecten a la actividad celular.

- La degradación proteolítica de los armazones de proteínas también se puede retrasar mediante la protección de la estructura proteica de la red polimérica usando la unión covalente de un polímero de blindaje tal como poli(etilenglicol) (PEG). Por ejemplo, la modificación de proteínas mediante la unión de una o más cadenas de PEG (PEGilación) se ha aplicado con mucho éxito para aumentar la semivida en plasma de péptidos terapéuticos o fármacos de proteínas [Veronese F. M., "Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions". *Biomaterials*. Marzo de 2001; 22(5):405-17]. Basándose en un razonamiento similar, la PEGilación podría ser una buena estrategia para el diseño de biomateriales a base de proteínas en la medida en que las cadenas de PEG pueden ralentizar la biodegradación enzimática del armazón proteico PEGilado. Al mismo tiempo, las cadenas de PEG son no tóxicas, no inmunogénicas, altamente hidrosolubles, y ya están aprobados por la FDA en una serie de diferentes indicaciones clínicas (Veronese, 2005). Las proteínas comunes usadas en el diseño de armazones tales como el colágeno y la fibrina se pueden pegar fácilmente usando modificaciones de grupos amino o tiol de la estructura proteica para producir un conjugado de proteína-polímero. El PEG protege la superficie de la proteína de los agentes degradantes mediante impedimentos estéricos sin bloquear toda la función biológica natural de la molécula de proteína estructural (Veronese 2005).

- Recientemente, se han desarrollado armazones híbridos. Un material de armazón híbrido combina las características estructurales del material sintético con la biofuncionalidad del material natural (Leach J. B., *et al.*, 2004; Leach y Schmidt, 2005). Con este fin, se han propuesto varios métodos de preparación de armazones con la biofuncionalidad natural y las propiedades físicas de los polímeros sintéticos. Sin embargo, la mayoría de estas metodologías de "híbridos" no están a la altura de la producción de un biomaterial con amplia biofuncionalidad intrínseca y una amplia selección de propiedades físicas; principalmente debido a que solo emplean un único elemento biofuncional en el diseño de los materiales. Por ejemplo, estudios previos describen la preparación de armazones que consisten en elementos biodegradables injertados en la estructura de una red de hidrogel sintético. Los hidrogeles se prepararon a partir de PEG sintético que fue reticulado con oligopéptidos cortos que contenían sustratos enzimáticos capaces de ser proteolíticamente degradados por enzimas secretadas por células [Lutolf *et al* (2003); Gobin y West (2002)]. Además, para aumentar la biofuncionalidad de dichos hidrogeles, se injertaron motivos de adhesión sintéticos tales como las secuencias RGD [Lutolf *et al* (2003)] o VEGF (Seliktart *et al*; 2004, Zisch A. H., *et al.*, 2003; *FASEB J.* 17: 2260-2. Epub 16 de octubre de 2003) en la estructura de PEG. Sin embargo,

el uso de dichos armazones (en los que PEG es el componente principal) estaba limitado por la bio-retroalimentación insuficiente y/o las respuestas celulares a largo plazo que son esenciales para la estabilidad fenotípica.

- 5 Otros intentos de aumentar la biofuncionalidad de los armazones incluyen la fabricación de precursores similares a las proteínas por ingeniería genética de 100 aminoácidos que contienen, entre otras cosas, varios sustratos y sitios de adhesión de la proteasa (Halstenberg *et al.* 2002; *Biomacromolecules*, 3: 710-23). Sin embargo, el aumento del tamaño de los precursores de proteínas y la presencia de grupos tiol requerida para la reacción de PEGilación complicaron la purificación y la solubilización de los precursores durante el proceso de fabricación de los armazones.
- 10 Además, al igual que los materiales biosintéticos a base de PEG, los armazones de precursores de proteínas diseñados por ingeniería genética no proporcionaron suficiente biofuncionalidad para permitir la estabilidad a largo plazo.

- 15 El presente inventor ha descubierto previamente que los armazones híbridos biosintéticos compuestos de una estructura de fibrinógeno que está reticulada con cadenas laterales de polietilenglicol (PEG) funcional son excelentes armazones, biodegradables, que se pueden usar para aplicaciones de regeneración tisular.

- 20 El presente inventor ha descubierto ahora que el armazón anterior se somete a la actividad proteolítica e hidrolítica del ambiente celular en el sitio de implante provocando la liberación sostenida de productos de degradación de fibrinógeno desnaturalizado PEGilado. Estos productos de degradación de fibrinógeno desnaturalizado PEGilado tienen propiedades inductoras similares a los productos de degradación de fibrina naturales con la ventaja adicional de la modificación de PEG, que proporciona protección frente a la rápida eliminación desde el sitio de implante local y el cuerpo.

25 **Sumario de la invención**

La presente invención se define por las reivindicaciones.

- 30 Más detalladamente, la presente invención se refiere a una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno caracterizado por un daño tisular, composición que comprende PEG unido a fibrinógeno desnaturalizado y que está formulada para la liberación inmediata de un producto de escisión enzimática de dicho fibrinógeno desnaturalizado, comprendiendo dicho producto actividad terapéutica, en la que dicha liberación inmediata se efectúa usando una formulación no reticulada, es decir, no sometida a una reacción de polimerización de radicales libres, que tiene una proporción molar de PEG:fibrinógeno desnaturalizado de 2:1 a 350:1. La composición está
- 35 formulada preferentemente para la administración local o sistémica. La enzima se selecciona preferentemente del grupo que consiste en plasmina, colagenasa y tripsina. El producto de escisión enzimática es preferentemente como el expuesto en la SEC ID N° 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8. El PEG se selecciona preferentemente del grupo que consiste en acrilato de PEG (PEG-Ac) y vinilsulfona de PEG (PEG-VS). El PEG-Ac se selecciona preferentemente del grupo que consiste en PEG-DA, multiacrilato de PEG en estrella de 4 brazos y multiacrilato de PEG en estrella de 8 brazos. El
- 40 PEG-DA es preferentemente un PEG-DA de 4 kDa, PEG-DA de 6 kDa, PEG-DA de 10 kDa y/o PEG-DA de 20 kDa.

En el presente documento, también se describe una composición objeto que comprende un polímero sintético unido a fibrinógeno desnaturalizado o una porción terapéutica de dicho fibrinógeno desnaturalizado.

- 45 También se describe en el presente documento un armazón que comprende la composición objeto.

También se describe en el presente documento un hidrogel que comprende la composición objeto.

- 50 De acuerdo con características adicionales de realizaciones descritas en el presente documento más adelante, dicho fibrinógeno desnaturalizado es fibrinógeno desnaturalizado fragmentado y en tanto que una concentración de dichas unidades de dicho hidrogel se selecciona de un intervalo del 0,5 al 35 %.

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

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

- 60 También se describe en el presente documento un dispositivo médico que comprende la composición objeto

- De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, el dispositivo médico es un dispositivo intracorpóreo.

- 65 De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, el dispositivo médico es un dispositivo extracorpóreo.

- De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, el dispositivo médico se selecciona del grupo que consiste en un dispositivo protésico, un marcapasos, una articulación artificial, un reemplazo de válvula cardíaca, un implante temporal, un implante permanente, una endoprótesis vascular, un injerto vascular, un dispositivo de anastomosis, una pinza, un dispositivo de reparación de aneurisma y un dispositivo embólico.
- También se describe en el presente documento una composición farmacéutica que comprende la composición objeto.
- También se describe en el presente documento un método para tratar un trastorno caracterizado por un daño tisular, método que comprende proporcionar, a un sujeto en necesidad de ello, una composición que comprende un polímero sintético unido a fibrinógeno desnaturalizado o una porción terapéutica de dicho fibrinógeno, estando dicha composición formulada para liberar dicha porción terapéutica de dicho fibrinógeno de una manera regulada farmacocinéticamente, tratando de este modo el trastorno caracterizado por daño o malformación tisular.
- De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, la composición objeto comprende además un agente farmacéutico.
- De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, dicha manera regulada farmacocinéticamente es la liberación inmediata de dicha porción terapéutica de dicho fibrinógeno.
- De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, dicha manera regulada farmacocinéticamente es la liberación sostenida de dicha porción terapéutica de dicho fibrinógeno.
- De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, dicha liberación sostenida de dicha porción terapéutica de dicho fibrinógeno es entre 1 semana y 200 semanas.
- De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, dicha composición está comprendida en un armazón, dispositivo médico, composición farmacéutica o un hidrogel.
- De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, dicha composición se formula para la administración local.
- De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, dicha composición se formula para la administración sistémica.
- De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, dicha porción terapéutica de dicho fibrinógeno desnaturalizado es un producto de escisión enzimática de dicho fibrinógeno desnaturalizado.
- De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, dicha enzima se selecciona del grupo que consiste en plasmina, colagenasa y tripsina.
- De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, dicha porción terapéutica de dicho fibrinógeno desnaturalizado es sintética.
- De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, dicha porción terapéutica de dicho fibrinógeno desnaturalizado es como se expone en SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8.
- De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, dicho polímero sintético se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), hidroxiapatita/policaprolactona (HA/PLC), ácido poliglicólico (PGA), ácido poli-L-láctico (PLLA), polimetilmetacrilato (PMMA), polihidroxialcanoato (PHA), poli-4-hidroxibutirato (P4HB), polipropilénfumarato (PPF), dimetacrilato de polietilenglicol (PEG-DMA), fosfato beta-tricálcico (beta-TCP) y politetrafluoroetileno (PTFE) no biodegradable.
- De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, dicho PEG se selecciona del grupo que consiste en acrilato de PEG (PEG-Ac) y vinilsulfona de PEG (PEG-VS).
- De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, dicho PEG-Ac se selecciona del grupo que consiste en PEG-DA, multiacrilato de PEG en estrella de 4 brazos y multiacrilato de PEG en estrella de 8 brazos.
- De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, dicho PEG-DA es un PEG-DA de 4 kDa, PEG-DA de 6 kDa, PEG-DA de 10 kDa y/o PEG-DA de 20 kDa.
- De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, una proporción molar de dicho PEG-DA con respecto a dicho fibrinógeno desnaturalizado o dicha porción terapéutica es de 2-400 a 1.

De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, una proporción molar de dicho PEG-DA con respecto a dicho fibrinógeno desnaturalizado o dicha porción terapéutica es de 25 a 1.

5 De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, una proporción molar de dicho PEG-DA con respecto a dicho fibrinógeno desnaturalizado o dicha porción terapéutica es de 75 a 1.

De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, una proporción molar de dicho PEG-DA con respecto a dicho fibrinógeno desnaturalizado o dicha porción terapéutica es de 150 a 1.

10 De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, dicha liberación inmediata se efectúa usando una formulación no reticulada que tiene una proporción molar de PEG:fibrinógeno desnaturalizado de aproximadamente 2:1-350:1.

15 De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, dicha liberación sostenida comprende una liberación lenta que se efectúa usando una formulación de hidrogel que tiene una proporción molar de PEG:fibrinógeno desnaturalizado de aproximadamente 100:1-350:1.

20 De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, dicha liberación sostenida comprende una liberación intermedia que se efectúa usando una formulación de hidrogel que tiene una proporción molar de PEG:fibrinógeno desnaturalizado de aproximadamente 25:1-100:1.

25 De acuerdo con otras características adicionales más de las realizaciones descritas, dicha liberación sostenida comprende una liberación rápida que se efectúa usando una formulación reticulada que tiene una proporción molar de PEG:fibrinógeno desnaturalizado de aproximadamente 10:1-25:1.

También se describe en el presente documento un artículo de fabricación que comprende un material de envasado y la composición identificada para el tratamiento de un trastorno caracterizado por un daño o una malformación tisular.

30 La presente invención aborda con éxito las eficacias de las configuraciones actualmente conocidas, proporcionando composiciones según lo definido en las reivindicaciones para inducir la regeneración tisular.

35 A menos que se defina lo contrario, todas las expresiones y los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos, y no pretenden ser limitantes.

Breve descripción de las figuras

40 En las figuras:

Las Fig. 1a-b son un esquema que representa la desnaturalización de moléculas de fibrinógeno purificado. El fibrinógeno heteromérico se compone de dos subunidades de tres cadenas cada una, unidas por anillos disulfuro. La reducción de los enlaces disulfuro y la desnaturalización del fibrinógeno en urea y beta-

45 mercaptoetanol produce 2 grupos de 3 cadenas de proteína desnaturalizada (se muestran 3 cadenas).

Las Fig. 2a-b son imágenes de SDS-PAGE proteicas de fragmentos de fibrinógeno desnaturalizado antes (Figura 2a) y después (Figura 2b) de la PEGilación. Cabe señalar que el fibrinógeno desnaturalizado en presencia de PEG-OH migra como tres cadenas independientes en el intervalo de peso molecular de 50-60 kDa (Figura 2a). Los fragmentos de fibrinógeno escindidos se observan por debajo del intervalo de peso molecular de 50 kDa (Figura 2b).

50 Las Fig. 3a-b son esquemas que muestran fibrinógeno PEGilado (completo, Figura 3a) y productos de la degradación del fibrinógeno (escindidos, Figura 3b). El polímero unido puede ser monofuncional, difuncional (mostrado) o multifuncional. Los grupos reactivos restantes del polímero se pueden usar para unir covalentemente los productos de degradación del fibrinógeno desnaturalizado o fibrinógeno desnaturalizado completo en una matriz tridimensional para el implante local.

Las Fig. 4a-b muestran la creación de una matriz de fibrinógeno PEGilado desnaturalizado que muestra la arquitectura molecular ilustrada esquemáticamente en la Figura 4a y el aspecto macroscópico de la Figura 4b.

Las Fig. 5a-d representan la cinética de degradación *in vitro* de precursor de fibrinógeno PEGilado desnaturalizado (completo) en productos de degradación por tripsina (Fig. 5a-b) y colagenasa (Fig. 5c-d).

60 Las Fig. 6a-j son fotografías que muestran la migración de células del músculo liso desde tejido del músculo liso a la matriz de hidrogel que contiene PEG-fibrinógeno. Se encapsularon construcciones de tejido de músculo liso en hidrogel de PEG-fibrinógeno y se visualizaron por microscopía de contraste de fase. La invasión celular desde el tejido denso (opaco) hacia los hidrogeles (transparentes) se observó varias horas después de moldeado del hidrogel y durante todo el experimento (Fig. 6a-c). Macroscópicamente, la construcción de tejido (flecha) se atrapó dentro del hidrogel de PEG-fibrinógeno (Fig. 6d-e). Cabe señalar que el hidrogel mantuvo su estabilidad estructural, incluso después de una semana en cultivo (Fig. 6f). La cinética de degradación y la cinética de

invasión se vieron afectadas por la composición relativa a la cantidad de PEG-DA y fibrinógeno desnaturalizado en hidrogel; las células se polarizaron más y se orientaron radialmente hacia el exterior desde la construcción de tejido a medida que invadían la matriz de PEG-fibrinógeno que contenía concentraciones más altas de PEG-DA de 10 kDa (Fig. 6g - 0 %; Fig. 6h - 0,5 %; Fig. 6i - 1,0 %; Fig. 6j - 2,0 %). Se obtuvieron micrografías de contraste de fase a una ampliación de 40 (barra de escala = 250 μ m);

Las Fig. 7a-d ilustran la invasión celular resultante de la actividad quimiotáctica de la degradación de hidrogeles de fibrinógeno PEGilado desnaturalizado. La Figura 7a muestra los datos de la cinética de invasión durante una semana de cultivo de células de músculo liso que invaden los hidrogeles de fibrinógeno PEGilado de 10 kDa fabricados con PEG-DA adicional. La Figura 7b muestra el resumen de los datos de la invasión de hidrogeles de fibrinógeno PEGilado de 6 kDa y 10 kDa durante una semana. Las Figuras 7c-d ilustran la invasión de células madre y células de cartílago en materiales de hidrogel que liberan productos de degradación de fibrinógeno PEGilado desnaturalizado. Cada imagen muestra un cultivo *in vitro* de explantes de tejidos naturales vivos atrapados tridimensionalmente dentro de una matriz de hidrogel denso. La Figura 7c muestra cuerpos embrionarios humanos (CE) cultivados durante 8 días demostrando el brote de las células madre embrionarias de los CE hacia la matriz de gel denso. La Figura 7d muestra explantes de cartílago (EC) cultivados durante 14 días que presentan invasión masiva de células desde el tejido nativo a la matriz de gel de encapsulación.

Las Fig. 8a-d son fotografías que muestran la generación de un defecto específico en la tibia de una rata. Figura 8a: se expuso la porción media de la tibia derecha del lado medial anterior mediante una incisión longitudinal; Figura 8b: se colocó un dispositivo de fijación externo proximal y distal a la sección media de la tibia; Figura 8c: se escindió un hueco de 7 mm en la porción situada entre las agujas proximal y distal del dispositivo de fijación; y la figura 8d: se insertó un tapón que contenía PEG-fibrinógeno en el sitio del defecto.

Las Fig. 9a-c son fotomicrografías que representan secciones longitudinales de defectos tibiales tratados con hidrogel en degradación intermedia tras 5 semanas de la operación. La extensión de hueso regenerado en el defecto específico varió de un puente parcial (Figuras 9 a-b) a total (Figura 9c) de las osteotomías del defecto (ost), y dependió altamente del patrón de erosión del material de hidrogel (Gel). Los restos del gel dieron paso a hueso regenerado (línea discontinua), que tenía el patrón de fibra laminar típico de las trabéculas óseas maduras y la médula grasa (MG). Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E);

Las Fig. 10a-b son fotomicrografías que representan el hueso subperiosteal y endosteal recién formado mostrado con hidrogel parcialmente degradado en una sección longitudinal de un tratamiento de degradación intermedia. Figura 10a: las trabéculas óseas, que se conectan entre sí, están bordeadas por osteoblastos cúbicos activos. Los espacios intertrabeculares están ocupados por una médula grasa (MG), que se extiende en el sitio del defecto desde el aspecto de la osteotomía medial (ost). Se observa una tapa cartilaginosa (flechas) en el extremo medial de la parte frontal del hueso regenerado con islotes de condrocitos hipertróficos. La tapa está encerrada por una capa delgada de tejido fibroso similar al pericondrio. Hay tejido fibroadiposo (FA) presente entre el hidrogel degradado y el hueso regenerado. Figura 10b: este campo (tomado a mayor aumento) muestra osificación endocondral (OEC) en la región cartilaginosa. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E);

Las Fig. 11a-b son fotomicrografías que representan la respuesta celular al implante de hidrogel que contiene PEG-fibrinógeno. La figura 11a muestra un tejido de granulación de serpiente en la parte delantera de la erosión del hidrogel (flechas continuas) con un infiltrado inflamatorio crónico inespecífico adyacente, que se compone principalmente de linfocitos (LR) y se acompaña por hueso recién formado (HN). En ciertas zonas de la superficie de contacto del tejido y el material, la respuesta se limita a una reacción inflamatoria inespecífica crónica de menor importancia (flecha discontinua). El hidrogel eosinófilo está ligeramente tañido y no muestra infiltración celular más allá de los límites de erosión de la matriz densa (gel). La figura 11b es una micrografía de gran aumento que muestra el tejido de granulación empalizador. Cabe señalar la reacción macrofágica (RM) de menor importancia.

Las Fig. 12a-d son imágenes que muestran la implantación del implante fibrinógeno desnaturalizado en defectos osteocondrales. La figura 12a muestra el aspecto macroscópico de cuatro defectos osteocondrales, de 6 mm de diámetro situados en el cóndilo femoral de la articulación femoro-tibiarrotuliana derecha. La Figura 12b muestra el implante de fibrinógeno desnaturalizado PEGilado polimerizado *in situ* en el defecto osteocondral. Las Figuras 12c-d muestran una escena de una sala de operaciones donde el cirujano inyecta la solución de polímero en el sitio del defecto y polimeriza la solución *in situ* usando una fuente de luz UV y una guía de luz de fibra óptica.

Las Fig. 13a-d son fotografías que muestran el aspecto macroscópico de los defectos osteocondrales el día de la operación (Figuras 13a-b) y los 4 meses siguientes, durante la recogida de tejidos. Se observa una superficie de cartílago articular (hialino) recién formada en los defectos tratados (1, 2, 5), mientras que el defecto de control vacío aparece drásticamente diferente. Figura 13a: muesca rotuliana el día de la operación; Figura 13b: cóndilo femoral el día de la operación; Figura 13c: muesca rotuliana 4 meses después de la operación; Figura 13d: cóndilo femoral 4 meses después de la operación.

Las Fig. 14a-d son cortes histológicos longitudinales de los defectos osteocondrales de 6 mm 4 meses después del implante. Los defectos bien se dejan vacíos (control vacío de la Figura 14a) o se tratan con hidrogeles de fibrinógeno PEGilado desnaturalizado (Figuras 14b-d) con diferentes concentraciones de PEG y fibrinógeno en cada tratamiento. Se muestra la histología para los tratamientos con (Figura 14b) proporción molar 150:1 de PEG con respecto al fibrinógeno, (Figura 14c) proporción molar 200:1 de PEG con respecto al fibrinógeno y (Figuras 14d) proporción molar 350:1 de PEG con respecto al fibrinógeno en el sitio del defecto. Todos los defectos tratados mostraron una impresionante regeneración tanto del cartílago como del hueso de alrededor del implante de fibrinógeno PEGilado de erosión. En todas las secciones histológicas de los defectos tratados, se observa el

gel acelular y se marca en medio de la sección tañida con H y E.

Las Fig. 15a-d son cortes histológicos longitudinales de los defectos osteocondrales de 6 mm 4 meses después del implante teñida por colágeno de tipo I usando anticuerpos monoclonales. Los defectos bien se dejan vacíos (control vacío de la Figura 15a) o se tratan con hidrogeles de fibrinógeno PEGilado desnaturalizado (Figuras 15b-d) con diferentes concentraciones de PEG y fibrinógeno en cada tratamiento. Se muestra la histología para los tratamientos con (Figura 15b) proporción molar 150:1 de PEG con respecto al fibrinógeno, (Figura 15c) proporción molar 200:1 de PEG con respecto al fibrinógeno y (Figuras 15d) proporción molar 350:1 de PEG con respecto al fibrinógeno en el sitio del defecto. Todos los defectos tratados mostraron una coloración positiva del nuevo hueso con colágeno de tipo I (color marrón).

Las Fig. 16a-d son cortes histológicos longitudinales de los defectos osteocondrales de 6 mm 4 meses después del implante teñidos por proteoglucanos usando tinción con safranina-o. Los defectos bien se dejan vacíos (control vacío de la Figura 16a) o se tratan con hidrogeles de fibrinógeno PEGilado desnaturalizado (Figuras 16b-d) con diferentes concentraciones de PEG y fibrinógeno en cada tratamiento. Se muestra la histología para los tratamientos con (Figura 16b) proporción molar 150:1 de PEG con respecto al fibrinógeno, (Figura 16c) proporción molar 200:1 de PEG con respecto al fibrinógeno y (Figuras 16d) proporción molar 350:1 de PEG con respecto al fibrinógeno en el sitio del defecto. Todos los defectos tratados mostraron tinción positiva del cartílago nuevo para los proteoglucanos (color rojo), en comparación con el control vacío que se tiñó. La tinción de proteoglucanos usando safranina-O (mancha roja es positiva) confirma la presencia de glucosaminoglucanos (GAG) en la superficie del cartílago recién formado.

Las Fig. 17a-d son cortes histológicos longitudinales de los defectos osteocondrales de 6 mm 4 meses después del implante teñidos con colágeno de tipo II usando anticuerpos monoclonales. Los defectos bien se dejan vacíos (control vacío de la Figura 17a) o se tratan con hidrogeles de fibrinógeno PEGilado desnaturalizado (Figuras 17b-d) con diferentes concentraciones de PEG y fibrinógeno en cada tratamiento. Se muestra la histología para los tratamientos con (Figura 17b) proporción molar 150:1 de PEG con respecto al fibrinógeno, (Figura 17c) proporción molar 200:1 de PEG con respecto al fibrinógeno y (Figuras 17d) proporción molar 350:1 de PEG con respecto al fibrinógeno en el sitio del defecto. Todos los defectos tratados mostraron tinción positiva del nuevo cartílago para el colágeno de tipo II (de color marrón), en comparación con el hueso nuevo que no se tiñó.

Las Fig. 18a-b son cortes histológicos de los defectos osteocondrales tratados con implantes de fibrinógeno PEGilado mostrados en la superficie de contacto del implante y el tejido después de 4 meses. La figura 18a muestra una capa delgada de un infiltrado inflamatorio que rodea el implante de erosión. Una imagen de mayor aumento de esta superficie de contacto (Figura 18b) muestra el implante, la respuesta inflamatoria, y las células de cartílago y hueso recién formados.

Las Fig. 19a-d son imágenes de gran aumento de la reparación del cartílago articular que muestran el cartílago hialino recién formado en los defectos tratados con fibrinógeno PEGilado (Figuras 19a-b) proporción molar 150:1 de PEG con respecto al fibrinógeno y (Figuras 19c-d) proporción molar 350:1 de PEG con respecto al fibrinógeno.

Las Fig. 20a-f muestran la integración de la zona del defecto con el cartílago hialino recién formado en el modelo de defectos osteocondrales en ovejas. La Figura 20a muestra las dimensiones originales de la zona del defecto que está marcada por flechas cortas. Las Fig. 20c-f muestran imágenes longitudinales de gran ampliación de toda la longitud del cartílago articular recién formado destacando la extensión y calidad de la cicatrización. La integración entre el cartílago nuevo y antiguo está marcada por flechas largas en la (Figura 20b) y (Figura 20f).

Las Fig. 21a-c son fotografías que muestran la encapsulación de un único ganglio radicular posterior (GRP) en un hidrogel de fibrinógeno PEGilado. La figura 21a ilustra que el GRP (flecha) es de aproximadamente 0,5 mm de diámetro y está situado en el centro de un hidrogel de fibrinógeno PEGilado de 10 mm de diámetro. La excrecencia radial se mide desde el límite exterior del GRP opaco hacia el interior del hidrogel transparente. Las mismas construcciones se muestran desde la vista superior (Figura 21b) y la vista lateral (Figura 21c).

Las Fig. 22a-d son microfotografías que muestran la excrecencia y la invasión celular características de los GRP en construcciones de hidrogel tridimensionales de fibrinógeno PEGilado. Las micrografías de contraste de fase (Figuras 22a y 22b) muestran la excrecencia tridimensional de neuritas (flecha) y células gliales (punta de flecha) que se extienden desde el GRP (D) en la construcción de hidrogel de fibrinógeno PEGilado transparente (P) tras dos días en cultivo. Las secciones histológicas teñidas con H y E (Figuras 22c y 22d) del GRP (oscuro) en la construcción de fibrinógeno PEGilado (clara) muestran neuritas (flecha) y células no neuronales (punta de flecha) que invaden los hidrogeles tras cuatro días en cultivo. Nota: Las imágenes de gran aumento (Figuras 22b y 22d) son regiones expandidas de las micrografías de menor aumento (Figuras 22a y 22c); en todas las imágenes, la barra de escala = 100 μ m.

Las Fig. 23a-f son imágenes de microscopio de fluorescencia de GRP encapsulados en construcciones de fibrinógeno PEGilado que confirman la presencia tanto de neuritas como de células de Schwann. Las secciones transversales de las construcciones de GRP fueron cultivadas durante cuatro días y se marcaron por triplicado con fluorescencia con tubulina β III (marcador de neuritas, Figuras 23a y 23d), s100 (marcador de células de Schwann, Figuras 23b y 23e) y tinción de contraste con DAPI (núcleos, azul). Las micrografías fusionadas (Figuras 23c y 23f) muestran la invasión tridimensional de las neuritas desde el GRP hacia la construcción de hidrogel, con células de Schwann asociadas muy estrechamente con las extensiones de neuritas (barra de escala = 50 μ m).

Las Fig. 24a-d son imágenes de microscopio fluorescente y gráficos que muestran que el factor de crecimiento nervioso tanto soluble libre como enredado (NGF SL y NGF EN) potencia la excrecencia tridimensional de las neuritas desde GRP encapsulados hacia los hidrogeles. Se marcaron las secciones de las construcciones de

GRP los cuatro días siguientes inmunofluorescentemente con tubulina β III (neuritas, rojo), s100 (células de Schwann, verde) y tinción nuclear con DAPI (azul) para caracterizar la invasión de los hidrogeles que contienen NGF SL (Figura 24a), NGF EN (Figura 24b), o sin NGF (NO NGF; Figura 24c). La ausencia de NGF (NO NGF) no potenció la excrecencia de neuritas, pero apoyó la excrecencia moderada de las células de Schwann. Los tratamientos con NGF soluble libre o enredado presentaron una impresionante excrecencia tanto de neuritas como de células de Schwann (barra de escala = 50 μ m).

La Figura 24d es un gráfico de líneas que ilustra que la longitud media de la extensión de neuritas ($\pm$ error estándar) en los tratamientos de NGF soluble libre (NGF SL) y en los tratamientos de NGF enredado (NGF EN) no es significativamente diferente entre los dos tratamientos ($P > 0,35$, $n = 6$).

Las Fig. 25a-u son micrografías de contraste de fase y gráficos que muestran que la composición de PEG-fibrinógeno controla la invasión y excrecencia de las neuritas. Se varió la composición del hidrogel usando diferentes cantidades de PEG y fibrinógeno durante el ensamblaje, incluyendo 30:1, 60:1, 120:1 y 180:1 (PEG:Fibrinógeno). Las figuras 25a-p son micrografías de contraste de fase que muestran el profundo impacto de PEG adicional sobre la morfología de la excrecencia tridimensional del GRP tras cuatro días (barra de escala = μ m). Las Figuras 25q-t son imágenes de gran aumento que muestra la excrecencia relativa de neuritas y células gliales en hidrogeles que tienen diferentes composiciones (barra de escala = 200 μ m). La Figura 25u es un gráfico lineal que muestra que la longitud media de la extensión de neuritas ($\pm$ error estándar) en cada tratamiento, medida directamente de las imágenes, no muestra ninguna diferencia significativa entre los tratamientos 30:1 y 60:1 ($P > 0,50$, $n = 9$), y un obstáculo importante para la excrecencia en los tratamientos 120:1 y 180:1 ($p < 0,01$, $n = 9$).

Las Fig. 26a-c son micrografías de contraste de fases que muestran la excrecencia desde el GRP hacia los hidrogeles preparados a partir de PEG-DA y PEG-fibrinógeno. Las construcciones se prepararon con geles de PEG-DA al 10 % (p/v) sin fibrinógeno (Figura 26a) y se compararon con construcciones de PEG-fibrinógeno (Figura 26b). Las extensiones de neuritas apenas eran visibles después de tres días en la construcción de PEG-DA en comparación con la invasión extensa observada en las construcciones de fibrinógeno PEGilado después de tres días. La invasión neuronal en hidrogeles de fibrinógeno PEGilado se eliminó en ausencia de NGF (Figura 26c), aunque se observaron otros tipos de células en el hidrogel después de tres días en cultivo. En todas las imágenes, la barra de escala = 200 μ m.

Descripción

La presente invención se refiere a nuevas composiciones según lo definido por las reivindicaciones que se pueden usar para el tratamiento del daño tisular.

Durante mucho tiempo se han aprovechado las tecnologías de materiales para aplicaciones de regeneración de tejidos. Los biomateriales usados en la regeneración tisular se componen de materiales naturales o biológicos, materiales sintéticos, y materiales compuestos biosintéticos o híbridos. Los materiales naturales tales como el colágeno y el fibrinógeno pueden ejercer señalización celular incontrolada e introducir la incertidumbre en la comunicación regulada entre el biomaterial y las células. Por otra parte, las características estructurales intrínsecas de los materiales biológicos no se pueden modificar fácilmente, limitando de este modo el control de las señales físicas recibidas por las células y los tejidos circundantes. Los armazones sintéticos se generan en su mayoría a partir de materiales biológicamente inactivos (inertes) que son fácilmente manipulables, lo que les convierte en ideales para la regulación de las interacciones físicas entre las células y los biomateriales en la superficie de contacto entre el biomaterial y el tejido. Sin embargo, los armazones sintéticos pueden participar inadvertidamente en la señalización biológica aleatoria causada por la absorción de las proteínas séricas, por ejemplo, y la posterior activación de las células a través del contacto con estas proteínas. Los materiales compuestos biosintéticos son una mezcla complementaria de materiales naturales y sintéticos diseñados para regular entre la señalización celular física y biológica del armazón.

El presente inventor ha descubierto previamente que los armazones híbridos biosintéticos compuestos de una estructura de fibrinógeno que está reticulada con cadenas laterales de polietilenglicol (PEG) funcional son excelentes armazones biodegradables que se pueden usar para aplicaciones de regeneración tisular (véase el documento WO2005/055800).

El presente inventor ha descubierto ahora que, una vez implantados los armazones anteriores, se someten a la actividad proteolítica e hidrolítica del entorno celular causando la liberación sostenida de productos de degradación de fibrinógeno desnaturizado PEGilado. Estos productos de degradación de fibrinógeno desnaturizado PEGilado tienen propiedades inductoras similares a las de los productos de degradación de fibrina natural con la ventaja añadida de la modificación de PEG (PEGilación) y que proporcionan protección frente a la rápida eliminación del sitio de implante local y del cuerpo. Dichas composiciones se pueden formular para la liberación de estos fragmentos de fibrina terapéuticamente activos de una manera regulada farmacocinéticamente, lo que permite el tratamiento de una miríada de enfermedades asociadas con el daño, la pérdida o la malformación tisular.

Por lo tanto, como se ilustra más adelante en el presente documento y en el apartado de ejemplos que figura a continuación, el presente inventor ha diseñado un precursor biosintético de fibrinógeno híbrido sometiendo fibrinógeno desnaturalizado escindido o completo a PEGilación, generando, posiblemente, una matriz tridimensional (3D) a partir del mismo (véase el Ejemplo 1). El presente inventor ha demostrado además que los productos de degradación liberados del almacén anterior tienen una actividad quimiotáctica, como se muestra en un ensayo de cultivo de tejidos *in vitro* (véase el Ejemplo 3). Los precursores de fibrinógeno se formularon con diversas proporciones de PEG:fibrinógeno desnaturalizado para controlar la liberación de los productos activos en el sitio del implante. Dichas formulaciones demostraron ser eficaces en la regeneración de hueso y cartílago en modelos animales de lesión (véanse los Ejemplos 4 y 5).

Por lo tanto, en el presente documento, se describe un método para tratar un trastorno caracterizado por daño tisular. El método comprende proporcionar, a un sujeto en necesidad de ello, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polímero sintético unido a fibrinógeno o una porción terapéutica del fibrinógeno, estando la composición formulada para la liberación de la porción terapéutica del fibrinógeno de una manera farmacocinéticamente regulada, tratando de este modo el sujeto que tiene el trastorno caracterizado por un daño tisular.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un sujeto animal, tal como un mamífero, preferentemente un sujeto humano.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" se refiere a aliviar o disminuir un síntoma asociado con un trastorno. Preferentemente, el tratamiento cura, por ejemplo, elimina sustancialmente, los síntomas asociados con el trastorno.

Como se usa en el presente documento, la expresión "trastorno caracterizado por un daño tisular" se refiere a un trastorno, una enfermedad o una afección que están causados por o asociados con un tejido que no funciona (es decir, tejido canceroso o precanceroso, tejido herido, tejido roto, tejido fracturado, tejido fibrótico o tejido isquémico); y/o pérdida de tejido (reducción de la cantidad de tejido funcional) tal como después de un trauma, una lesión o un desarrollo anormal (es decir, malformación, defecto estructural que se produce con poca frecuencia tal como el debido al desarrollo anormal que requiere la regeneración tisular). Preferentemente, el tejido es un tejido funcional tal como un tejido óseo, un tejido de cartílago, un tejido del tendón, ligamento, un tejido cardíaco, un tejido nervioso, o un tejido muscular.

Los ejemplos de trastornos caracterizados por un daño en los tejidos incluyen, pero sin limitación, daño del cartílago (articular, mandibular), cáncer de hueso, osteoporosis, fractura o deficiencia ósea, hiperparatiroidismo primario o secundario, osteoartritis, enfermedad o defecto periodontal, enfermedad osteolítica del hueso, daño tras cirugía plástica, daño tras implante ortopédico, daño tras implante dental, isquemia cardíaca, atrofia muscular y degeneración nerviosa.

Como se ha mencionado anteriormente, el sujeto recibe una composición que comprende un polímero sintético unido al fibrinógeno desnaturalizado o una porción terapéutica del fibrinógeno desnaturalizado.

Como se usa en el presente documento, "fibrinógeno desnaturalizado" se refiere a cada una de las 6 cadenas que componen el fibrinógeno que se forma por cualquier modo de desnaturalización específica (disulfuro) e inespecífica (enlace de hidrógeno) tal como por desnaturalización térmica, liofilización, desnaturalización alcalina y desnaturalización mediada por quelantes (por ejemplo, EGTA) [Haddeland (1995) *Thromb Res.* 77:329-36]. El fibrinógeno desnaturalizado puede comprender una cadena de fibrinógeno completa o una porción terapéutica de la misma.

Como se usa en el presente documento, "una porción terapéutica de fibrinógeno" se refiere a una porción de fibrinógeno que es suficiente para mediar una actividad de fibrinógeno, tal como la proliferación celular, la angiogénesis o la actividad antiinflamatoria.

La longitud de aminoácidos de la porción terapéutica de fibrinógeno puede variar, pudiendo ser de al menos 3 aminoácidos de longitud (por ejemplo, 3-20, 3-50, 3-100, 3-200, 3-300, 3-400, 3-500 aminoácidos).

En las SEC ID N°: 1-8, se proporcionan ejemplos de porciones terapéuticas de fibrinógeno (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N°: 5.427.918, 5.473.051, 5.919.754, y las solicitudes de patente de EE.UU. N°: 20030109431, 20050020809, 20040126758, 20040029157).

Las porciones terapéuticas de fibrinógeno se pueden generar por escisión enzimática del fibrinógeno usando una o más enzimas que escindan el fibrinógeno. Los ejemplos de dichas enzimas incluyen, pero sin limitación, plasmina, colagenasa y tripsina. Véase el Ejemplo 2 del apartado de ejemplos que figura más adelante.

Como alternativa, las porciones terapéuticas de fibrinógeno desnaturalizado se pueden generar mediante un producto químico proteolítico tal como bromuro de cianógeno y 2-nitro-5-tiocianobenzoato.

Como otra alternativa, las porciones terapéuticas de fibrinógeno desnaturalizado se pueden generar usando técnicas sintéticas o recombinantes que son bien conocidas en la materia.

Los péptidos sintéticos se pueden preparar mediante métodos clásicos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de técnicas de fase sólida convencionales. Los métodos convencionales incluyen la síntesis en fase sólida exclusiva, métodos de síntesis en fase sólida parcial, condensación de fragmentos, síntesis en solución clásica e incluso la tecnología del ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149 (1963), incorporado en el presente documento por referencia. Los procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida son bien conocidos en la técnica y están descritos además por John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young, "Solid Phase Peptide Syntheses" (II Ed., Pierce Chemical Company, 1984).

Independientemente del método empleado, una vez generadas las porciones terapéuticas, se pueden usar en un lote que comprenda una mezcla de porciones terapéuticas con o sin porciones inactivas, o como alternativa, aislarlas o purificarlas (por ejemplo, pureza médica, por ejemplo, pureza superior al 95 %). A este respecto, se apreciará que aunque algunas moléculas pueden no tener un efecto terapéutico, dichas moléculas todavía pueden servir en combinación con aquellas que tengan un efecto terapéutico, como parte del vehículo en una formulación, tal como se describe con mayor detalle más adelante en el presente documento. El ensayo de la actividad terapéutica de los productos de fibrinógeno se puede efectuar usando métodos que son bien conocidos en la técnica tales como la proliferación celular o el ensayo de migración, descritos detalladamente en el apartado de ejemplos que figura más adelante.

Por lo tanto, los productos terapéuticos se pueden purificar por cromatografía preparativa líquida de alto rendimiento [Creighton T. (1983) "Proteins, structures and molecular principles". W. H. Freeman and Co. N.Y.], electroforesis en gel, pudiéndose confirmar su composición mediante secuenciación de aminoácidos.

Como se ha mencionado, el fibrinógeno desnaturalizado o las porciones del mismo están unidos (es decir, unidos covalentemente) a un polímero sintético. Los métodos para unir covalentemente polímeros sintéticos a fibrinógeno son bien conocidos en la técnica y se describen en el Ejemplo 1 del apartado de ejemplos.

Ejemplos no limitantes de polímeros sintéticos también descritos en el presente documento incluyen polietilenglicol (PEG) (PM medio de 200; P3015, SIGMA), hidroxiapatita/policaprolactona (HA/PLC) [Choi, D., *et al.*, 2004, *Materials Research Bulletin*, 39: 417-432; Azevedo M. C., *et al.*, 2003, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 14 (2): 103-7], ácido poliglicólico (PGA) [Nakamura T., *et al.*, 2004, *Brain Res.* 1027 (1-2): 18-29], ácido poli-L-láctico (PLLA) [Ma Z., *et al.*, 2005, *Biomaterials*, 26 (11): 1253-9], metacrilato de polimetilo (PMMA) [PM medio de 93.000, Aldrich Cat. N° 370037; Li C., *et al.*, 2004, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 15 (1): 85-9], polihidroxialcanoato (PHA) [Zinn M., *et al.*, 2001, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53 (1): 5-21; Sudesh K., 2004, *Med. J. Malaysia*, 59 Sup. B: 55-6], poli-4-hidroxibutirato (P4HB) [Dvorin E. L. *et al.*, 2003, *Tissue Eng.* 9 (3): 487-93], polipropilénfumarato (PPF) [Dean D., *et al.*, 2003, *Tissue Eng.* 9 (3): 495-504; He S., *et al.*, 2000, *Biomaterials*, 21 (23): 2389-94], dimetacrilato de polietilenglicol (PEG-DMA) [Oral E. y Peppas N. A. J., 2004, *Biomed. Mater. Res.* 68A(3): 439-47], fosfato beta-tricálcico (beta-TCP) [Dong J., *et al.*, 2002, *Biomaterials*, 23 (23): 4493-502] y politetrafluoroetileno (PTFE) no biodegradable [Jernigan T. W., *et al.*, 2004, *Ann. Surg.* 239 (5): 733-8; descripción 73840].

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

Por consiguiente, se puede usar un diacrilato de PEG de 6-14 kDa.

Se apreciará que el extremo OH de la molécula de PEG se puede hacer reaccionar con un grupo químico tal como acrilato (Ac) o vinilsulfona (VS) que convierte la molécula de PEG en PEG funcionalizado, es decir, PEG-Ac o PEG-VS. Preferentemente, la molécula de PEG usada en la presente invención es PEG-Ac. Como alternativa, el PEG se puede modificar con un grupo piridildisulfuro, un grupo maleimida o un grupo yodoacetamida. Otros grupos funcionales incluyen carbonatos tales como carbonato de benzotriazol y carbonato de succinimidilo [véase la revisión realizada por Veronese F. y Paust G., "Drug Discovery Reviews", 30 vol 10 (21), noviembre de 2005].

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

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

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

Como se muestra en el Ejemplo 1 del apartado de ejemplos que figura más adelante, el presente inventor utiliza diversas isoformas de PEG-diacrilato (PEG-DA) para preparar moléculas de PEG funcionalizadas.

Como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, la composición precursora anterior (es decir, polímero sintético unido a fibrinógeno desnaturalizado o una porción terapéutica del mismo) se formula para la liberación de la porción terapéutica del fibrinógeno de una manera regulada farmacocinéticamente. Cualquier experto habitual en la materia escogerá la formulación de acuerdo con el uso previsto.

La farmacocinética de la porción terapéutica de fibrinógeno (es decir, la acción de la porción terapéutica en el organismo durante un período de tiempo) puede regirse por los siguientes parámetros a modo de ejemplo: proporción de polímero sintético:fibrinógeno, formación de la matriz 3D, uso del fibrinógeno desnaturalizado completo o porciones terapéuticas del mismo, modo de administración. Cada parámetro puede afectar a la actividad biológica del fragmento de fibrinógeno liberado, la cinética de liberación, la velocidad de eliminación del organismo y la respuesta inmunogénica del factor terapéutico.

La siguiente Tabla 1 proporciona ejemplos de formulaciones para diversas indicaciones (también se proporcionan realizaciones más preferidas indicadas por, por ejemplo)

Velocidad de liberación	Semanas tras la administración	Usos/ indicaciones	Modo de administración	Formulación	Proporción molar entre el PEG y el fibrinógeno desnaturalizado
Lenta	10-150	Hueso, cartílago, cardíaco, neuronal	Implante, polimerización <i>in situ</i>	Hidrogel	100:1-1.000:1 por ejemplo, 100:1-350:1
Intermedia	2-10	Hueso, músculo	Implante, polimerización <i>in situ</i>	Hidrogel	20:1-100:1
Rápida	1-2	Tratamiento de infección local en piel, hueso, intersticio	Polimerización <i>in situ</i>	Reticulada	10:1-25:1
Inmediata	1	Lesiones de tamaño no crítico	Inyección <i>in situ</i>	Composición no reticulada	2:1-1.000:1, por ejemplo, 2:1-350:1

A continuación, se describen los diferentes parámetros que afectan a la farmacocinética:

Formación de la matriz 3D: la reticulación de las moléculas precursoras de polímero-proteína del presente documento puede afectar a la farmacocinética de la porción terapéutica. Dicha reticulación se puede realizar *in vitro*, *ex vivo* y/o *in vivo*.

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

La fotoiniciación puede tener lugar usando un agente de fotoiniciación (es decir, un fotoiniciador) tal como óxido de bis(2,4,6-trimetilbenzoi)fenilfosfina (BAPO) (Fisher J. P. *et al.*, 2001; *J. Biomater. Sci. Polym.* Ed. 12: 673-87), 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPA) (Witte R. P. *et al.*, 2004; *J. Biomed. Mater. Res.* 71A(3): 508-18), camforquinona (CQ), 1-fenil-1,2-propanodiona (PPD) (Park Y. J. *et al.*, 1999, *Dent. Mater.* 15(2): 120-7; Gamez E., *et al.*, 2003, *Cell Transplant.* 12 (5): 481-90), el complejo organometálico Cp'₂Pt(CH₃)(3) (Cp' = eta(5)-C(5)H(4)CH(3)) (Jakubek V. y Lees A. J., 2004; *Inorg. Chem.* 43 (22): 6869-71), 2-hidroxi-1-[4-(hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona (Irgacure 2959) (Williams C. G., *et al.*, 2005; *Biomaterials.* 26 (11): 1211-8), metacrilato de dimetilaminoetilo (DMAEMA) (Priyawan R., *et al.*, 1997; *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 8 (7): 4614), 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (Lee Y. M. *et al.*, 1997; *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 8(9): 537-41), benzofenona (BP) (Wang Y. y Yang W. 2004; *Langmuir.* 20(15): 6225-31), flavina (Sun G., y Anderson V. E. 2004; "Electrophoresis", 25 (7-8): 959-65).

La reacción de fotoiniciación se puede realizar usando una variedad de longitudes de onda incluyendo longitudes de onda UV (190-365 nm) y luz visible (400-1.100 nm) y a diversas intensidades lumínicas. Se apreciará que para las aplicaciones *ex vivo* o *in vivo*, el fotoiniciador y las longitudes de onda usados son preferentemente no tóxicos y/o no peligrosos para la salud.

5 Por ejemplo, la molécula precursora de PEG-fibrinógeno se puede reticular por fotoiniciación en presencia de Igracume™ 2959 y una iluminación de luz UV no tóxica (por ejemplo, 5 minutos a una longitud de onda de 365 nm, 4-5 mW/cm² de intensidad).

10 Se apreciará que, aunque las moléculas de fibrinógeno PEGilado de la presente invención se pueden reticular sin la adición de una molécula reticulante, la reticulación de acuerdo con la presente invención también puede utilizar una molécula capaz de reticular los precursores de polímero-proteína. Dichas moléculas reticulantes pueden ser, por ejemplo, PEG, PEG-DA, multiacrilato de PEG y/o PEG-VS.

15 La reticulación se puede efectuar de modo que los precursores de polímero-proteína de la presente invención se disuelven en una solución basada en agua y luego se someten dichas soluciones a reticulación (por ejemplo, usando fotoionización) para formar un armazón de hidrogel. El hidrogel se somete a las condiciones de erosión *in vivo* y libera las porciones terapéuticas de fibrinógeno desnaturalizado.

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

30 El hidrogel se puede generar a partir de fibrinógeno desnaturalizado completo PEGilado o fibrinógeno fragmentado PEGilado (porciones terapéuticas). Generalmente, el peso molecular y la longitud del PEG injertado influyen en el grado de solubilidad de la proteína PEGilada, es decir, una longitud y/o un peso molecular mayor/es del PEG produce/n un aumento en la solubilidad de la proteína PEGilada. Se apreciará que la solubilidad de la proteína PEGilada también está influida por la presencia de fibrinógeno completo o escindido. La concentración de las
35 moléculas precursoras del hidrogel es de entre el 0,5 y el 35 %, cuando se usa fibrinógeno completo PEGilado, la concentración de las moléculas precursoras del hidrogel es de entre el 0,5 y el 5 % (dependiendo del PM y de la longitud del PEG injertado usado para PEGilar la proteína) y cuando se usa fibrinógeno fragmentado PEGilado, la concentración de las moléculas precursoras del hidrogel es de entre el 5 y el 35 % (dependiendo del PM y de la longitud del PEG usado para PEGilar la proteína).

Proporción de polímero sintético:fibrinógeno: la proporción molar entre el polímero sintético (por ejemplo, PEG) y el fibrinógeno descrito en el presente documento puede afectar a la farmacocinética de la composición. Por lo tanto, el exceso de polímero sintético daría lugar a la unión de los grupos funcionales del polímero (por ejemplo, PEG-DA)
45 con todos los sitios de unión potenciales del fibrinógeno, de manera que la reticulación se traduciría en una malla más densa con un patrón de liberación más lenta. Por otro lado, la unión de solo dos moléculas del polímero sintético con cada molécula de la proteína (es decir, una proporción molar de 2:1) daría lugar a un menor número de sitios de reticulación y una mayor biodegradabilidad del armazón. Por lo tanto, se espera que una proporción molar más alta (es decir, el exceso de polímero) produzca una menor biodegradabilidad debido al posible enmascaramiento de los sitios de degradación de la proteína. Los expertos en la materia son capaces de ajustar la proporción molar entre el polímero sintético y la proteína para obtener la formulación deseada con las características físicas y biológicas óptimas.

Por ejemplo, ya que cada molécula de fibrinógeno incluye 29-31 sitios potenciales que se pueden unir a PEG, la
55 molécula precursora de PEG-fibrinógeno se puede preparar usando un amplio intervalo de proporciones molares. La proporción molar usada en el presente documento puede ser de 2-400 (PEG) a 1 (fibrinógeno), 30-300 (PEG) a 1 (fibrinógeno), 100-200 (PEG) a 1 (fibrinógeno), o 130-160 (PEG) a 1 (fibrinógeno). Como se muestra en el Ejemplo 1 del apartado de ejemplos que figura más adelante, una proporción molar entre PEG-DA y el fibrinógeno es de 145 (PEG) a 1 (fibrinógeno). En caso de que la proporción molar sea superior a 29-31 (PEG) a 1 (fibrinógeno), algunos de los PEG se pueden unir indirectamente al fibrinógeno a través de moléculas de PEG unidas a fibrinógeno.

El fibrinógeno usado en el presente documento puede ser fibrinógeno desnaturalizado completo (es decir, sin escindir) o fibrinógeno fragmentado, que se puede obtener usando, por ejemplo, la escisión con CNBr.

65 El fibrinógeno se puede purificar fácilmente a partir de plasma sanguíneo humano usando técnicas de purificación de proteínas convencionales. Los componentes purificados se pueden someter a tratamientos antivirales. Tanto el

tratamiento con calor como los tratamientos con disolvente/detergente se usan comúnmente en la producción de fibrinógeno. El fibrinógeno usado en el presente documento puede ser puro, aunque puede haber otros componentes. Así pues, los productos también pueden contener ácido tranexámico, aprotinina o factor XIII. El fibrinógeno se encuentra disponible en el mercado en Baxter y Omrix.

Vías de administración: la farmacocinética de las composiciones descritas en el presente documento se puede ver afectada por el modo de administración. De ahí que las composiciones farmacéuticas que comprenden las porciones terapéuticas de fibrinógeno como principio activo o en una forma de profármaco se pueden formular para la administración local o sistémica.

Las técnicas para la formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en la última edición de "Remington Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Las vías adecuadas de administración pueden incluir, por ejemplo, la administración oral, rectal, transmucosa, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

Como alternativa, la composición farmacéutica se puede administrar de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante la inyección de la composición farmacéutica directamente en una región de tejido de un paciente.

Las composiciones descritas en el presente documento se pueden fabricar mediante procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, elaboración de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

Así pues, las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente memoria descriptiva se pueden formular de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes, que facilitan el procesamiento de los principios activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración seleccionada.

Para la inyección, los principios activos de la composición farmacéutica se pueden formular en soluciones acuosas, por ejemplo, en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosa, en la formulación, se usan penetrantes apropiados para la barrera que se ha de atravesar. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto descrito en el presente documento incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el fin pretendido. Más específicamente, una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de principios activos (por ejemplo, una construcción de ácido nucleico) eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de un trastorno (por ejemplo, isquemia) o prolongar la supervivencia del sujeto que está siendo tratado.

Se apreciará que las composiciones descritas en el presente documento se pueden unir a o incluir en dispositivos médicos tales como los usados para la potenciación de la cicatrización de heridas después del implante o la potenciación de sedimentación celular en el implante.

Los ejemplos de dispositivos médicos que se pueden usar en el presente documento incluyen, pero sin limitación, dispositivos intracorpóreos o extracorpóreos (por ejemplo, catéteres), implantes temporales o permanentes, endoprótesis, injertos vasculares, dispositivos de anastomosis, dispositivo protésico, marcapasos, dispositivos de reparación de aneurisma, dispositivos embólicos y dispositivos implantables (por ejemplo, ortopédicos (por ejemplo, una articulación artificial) e implantes ortodontales), dispositivos de reparación de aneurisma y similares. Otros dispositivos que se pueden usar se describen en la solicitud de patente de EE.UU. N° 20050038498.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz es competencia de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Para cualquier preparación usada en los métodos descritos en el presente documento, la dosis o la cantidad terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos *in vitro* y de cultivo celular. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir una concentración o título deseado. Dicha información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los principios activos descritos en el presente documento se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos *in vitro* y de cultivo celular, y estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosis para su uso en seres humanos. La dosis puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de

administración y la dosis pueden ser seleccionadas por cada médico en vista del estado del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl, E. *et al.* (1975), "The Pharmacological Basis of Therapeutics", capítulo 1, pág.1.)

5 La cantidad de la dosis y los intervalos de administración se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles en plasma o cerebrales del principio activo suficientes para inducir o suprimir el efecto biológico (es decir, la concentración eficaz mínima, CEM). La CEM variará para cada preparación, pero se puede estimar a partir de datos *in vitro*. Las dosis necesarias para alcanzar la CEM dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Se pueden usar ensayos de detección para determinar las concentraciones en plasma.

10 Dependiendo de la gravedad y de la capacidad de respuesta del trastorno que se va a tratar, la dosificación puede ser de una sola o de una pluralidad de administraciones, durando el tratamiento de varios días a varias semanas, o hasta que se efectúe la cicatrización o se consiga la disminución del estado patológico.

15 La cantidad de una composición que se vaya a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se esté tratando, de la gravedad de la afección, del modo de administración, del juicio del médico que prescribe, etc.

20 Si se desea, las composiciones descritas en el presente documento se pueden presentar en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el principio activo. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o de plástico, tal como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de una nota en una forma prescrita por un organismo gubernamental que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, que refleje la aprobación por parte del organismo de la forma de las composiciones para la administración a seres humanos o animales. Dicha nota puede incluir, por ejemplo, el etiquetado aprobado por la FDA estadounidense para los fármacos que requieren receta o un prospecto del producto aprobado. Las composiciones que comprenden una preparación descrita en el presente documento formulada en un vehículo farmacéuticamente aceptable también se pueden preparar, colocarse en un envase apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada, como se ha detallado anteriormente.

30 Para mejorar la eficacia terapéutica, las composiciones descritas en el presente documento (por ejemplo, hidrogel) se pueden cargar con cualquier agente farmacéutico de interés. La velocidad de liberación se controla farmacocinéticamente mediante las formulaciones fabricadas a medida anteriores. Los métodos de carga de hidrogeles con productos farmacéuticos son bien conocidos en la técnica [véase, por ejemplo, la inclusión de fármacos en hidrogeles de albúmina de suero bovino descrita en Gayet y Fortier (1995) *Art. Cells. Blood Subs. And Immob. Biotech.* 23(5), 605-611].

40 Así pues, por ejemplo, las composiciones descritas en el presente documento pueden incluir componentes que no sean reactivos con la composición (por ejemplo, hidrogel). Los ejemplos de dichos componentes no reactivos pueden incluir fármacos tales como desinfectantes, agentes quimioterapéuticos, agentes antimicrobianos, agentes antivirales, hemostáticos, antiflogísticos, anestésicos, analgésicos o suplementos nutricionales; biopolímeros tales como péptidos, derivados de proteínas plasmáticas, enzimas o mezclas de los mismos. En otras palabras, los componentes no reactivos con el hidrogel se pueden combinar con la composición de hidrogel para proporcionar estabilidad o protección de estos componentes. Dicha composición combinada se puede preparar, por ejemplo, por disolución o suspensión de los componentes no reactivos en el medio acuoso que se vaya a usar para la gelificación antes de efectuar la gelificación.

50 Si se desea, las composiciones descritas en el presente documento se pueden presentar en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitarias (por ejemplo, 100 mg) tales como para el uso personalizado que contiene el principio activo (por ejemplo, moléculas precursoras que aún no están reticuladas tales como fibrinógeno desnaturalizado PEGilado) y, opcionalmente, medios desechables estériles para la administración (por ejemplo, jeringa) y para la iluminación (por ejemplo, cubiertas de iluminador). El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o de plástico, tal como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de una nota en una forma prescrita por un organismo gubernamental que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, que refleje la aprobación por parte del organismo de la forma de las composiciones para la administración a seres humanos o animales. Dicha nota puede incluir, por ejemplo, el etiquetado aprobado por la FDA estadounidense para los fármacos que requieren receta o un prospecto del producto aprobado. Las composiciones que comprenden una preparación descrita en el presente documento formulada en un vehículo farmacéuticamente aceptable también se pueden preparar, colocarse en un envase apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada, como se ha detallado anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Ejemplos

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

5 En general, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook *et al.*, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology", Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994);
 10 Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vol. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); las metodologías expuestas en las patentes de EE.UU. N°: 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III
 15 cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology", Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. 20 (1994); Stites *et al.* (eds), "Basic and Clinical Immunology" (VIII Edición), Appleton & Lange, Norwalk, C. T. (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen extensamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N°: 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074;
 20 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego,
 25 CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todo incorporado por referencia como si se expusiera en su totalidad en el presente documento. A lo largo del presente documento, se proporcionan otras referencias generales. Se cree que los procedimientos que figuran en los documentos de referencia son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector. Toda la información contenida en los mismos se incorpora en el presente documento por referencia.

EJEMPLO 1

Preparación de precursores

35 La molécula proteica de fibrinógeno transmitida por la sangre se usa para crear una molécula precursora híbrida para la regeneración de tejidos [Dikovsky *et al.*, *Biomaterials* 27(8), 14-96-506, 2006; Almany y Seliktar, *Biomaterials*, 26(15), 2467-77, 2005]. El fibrinógeno es el precursor de la proteína de coagulación sanguínea comúnmente conocida, la fibrina. La molécula de fibrinógeno contiene un conjunto de señales biológicas de señalización celular específicas de la remodelación celular, que incluyen la secuencia de adhesión celular Arg-Gly-Asp (RGD) y un
 40 sustrato de la degradación de la proteasa [Herrick, *Int J Biochem Cell Biol.*, 31 (7) 741-6, 1999]. Las moléculas de fibrinógeno se transforman en un precursor híbrido biosintético usando cuatro etapas secuenciales: 1) desnaturalización del fibrinógeno; 2) escisión (opcional); 3) PEGilación; y 4) formación de la matriz 3D (opcional). A continuación, se detalla cada una de estas etapas.

45 **Etapla 1: Desnaturalización del fibrinógeno:** se preparó fibrinógeno desnaturalizado mediante la incubación de fibrinógeno purificado en una solución de reducción que contenía un gran exceso de urea. En la Figura 1b, se representa un fibrinógeno desnaturalizado. En síntesis, se disolvió fibrinógeno bovino purificado (Sigma-Aldrich, St Louis, EE.UU.) en solución salina tamponada con urea-fosfato 8 M (PBS) a una concentración de 3,5 mg/ml de solución. A continuación, se añadió clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP•HCl, Sigma, St. Louis, EE.UU.) a
 50 la solución de fibrinógeno en una proporción molar de TCEP con respecto a las cisteínas de fibrinógeno de 1,5:1. Los 29-31 restos de cisteína presentes en la secuencia de la proteína fibrinógeno se desnaturalizaron durante 30 minutos en un recipiente agitado a temperatura ambiente. Se visualizaron los fragmentos de fibrinógeno desnaturalizados usando SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie® (Figuras 2a-b).

55 **Etapla 2: Escisión de fibrinógeno:** tras la desnaturalización del fibrinógeno, se escindió proteolíticamente la solución mediante bromuro de cianógeno (CNBr). Básicamente, se disolvió el fibrinógeno desnaturalizado (Sigma, Steinheim, Alemania) de la etapa 1 en una solución de ácido fórmico al 70 % que contenía 17 mg/ml de bromuro de cianógeno (Aldrich) y se incubó durante una noche a oscuras a 25 °C. A continuación, se sometieron los fragmentos de fibrinógeno escindidos a diálisis en solución salina tamponada con fosfato 50 mM (PBS) a un pH = 7,4 durante 2
 60 días a 4 °C con un cambio de dos veces al día del tampón para eliminar todo el CNBr y ácido fórmico de la solución. Los fragmentos sometidos a diálisis se almacenaron en PBS a 4 °C antes de la siguiente etapa del procedimiento de preparación de los precursores. Se visualizaron los fragmentos de fibrinógeno usando SDS-PAGE para confirmar la presencia de productos de degradación (Figura 2b).

65 **Etapla 3: PEGilación del fibrinógeno desnaturalizado:** se unió el fibrinógeno escindido o el fibrinógeno completo no escindido a polímero de poli(etilenglicol) (PEG) monofuncional o multifuncional usando una reacción de adición

de tipo Michael entre los grupos finales funcionales del polímero de PEG y los tioles reducidos del producto de fibrinógeno desnaturalizado. El esquema de reacción de PEGilación efectuado en el presente documento usó diacrilato de PEG lineal (PEG-DA) (6 kDa o 10 kDa, Fluka Chemika GmbH, Buchs, Suiza). Se añadió una solución de PEG-DA (280 mg/ml) en PBS 50 mM y urea 8 M, y se hizo reaccionar durante 3 horas con el fibrinógeno desnaturalizado escindido o no escindido (de la etapa 1 y/o 2). La proporción molar de PEG con respecto a las

5 cisteínas de fibrinógeno es de 5:1 o superior, usando PEG-DA lineal, de 6 kDa y 10 kDa. Se hizo precipitar la proteína PEGilada mediante la adición de 4 volúmenes de acetona (Frutarom, Haifa, Israel). Se disolvió el precipitado de nuevo a una concentración de 10 mg/ml de proteína en PBS que contenía urea 8 M y se sometió a diálisis frente a PBS 50 mM a 4 °C por 2 días cambiando dos veces al día la PBS (Spectrum, corte de PM de 12-

10 14 kDa). Para establecer la concentración de PEG-fibrinógeno total, se liofilizaron 0,5 ml de la solución precursora durante una noche y se pesaron. Se determinó la concentración neta de fibrinógeno usando un ensayo de proteínas BCA™ convencional (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) y se compararon las cantidades relativas de producto PEGilado total (peso seco) con respecto al contenido de fibrinógeno (resultado del BCA™). Se usó una escala de eficacia de PEGilación para determinar el porcentaje de PEGilación del producto proteico. La escala asume el 100 %

15 de PEGilación cuando los 29 tioles libres de las moléculas de fibrinógeno (166 kDa en total) se unen a los PEG funcionalizados. En las Figuras 3a-b, se muestran ilustraciones esquemáticas de fibrinógeno PEGilado.

Etapas 4: Formación de la matriz 3D: la proteína de fibrinógeno desnaturalizado modificado con polímeros (escindida o completa) se puede administrar directamente mediante la inyección de los precursores de forma local o

20 sistémica, o como alternativa, mediante la creación de una matriz 3D para la administración local sostenida de los productos de degradación del fibrinógeno en el tejido circundante en una aplicación de tratamiento específico del sitio. El uso de una matriz 3D para este fin se realiza mediante la inmovilización del fibrinógeno PEGilado en una matriz biocompatible existente, o bien creando una matriz de hidrogel 3D a partir de los precursores PEGilados mediante la polimerización de los grupos terminales reactivos adicionales del polímero.

25 A continuación, se presenta un ejemplo en el que se usa química fotorreactiva para crear hidrogeles de fibrinógeno PEGilado desnaturalizado. El fibrinógeno desnaturalizado modificado con PEG (escindido o completo) se forma en una red de polímero sólido mediante la reticulación entre los grupos funcionales libres del PEG-DA. Estos hidrogeles se fabrican a partir de una solución precursora de fibrinógeno PEGilado desnaturalizado mediante una reacción de

30 polimerización en cadena de radicales de grupos terminales de acrilato. La solución precursora PEGilado purificada (polímero PEGilado al 2-3 % (p/v)) contiene grupos acrilato libres aproximadamente 2 µM para la reticulación. Se puede añadir más PEG-DA (6 kDa o 10 kDa) para aumentar la densidad de reticulación de la red de proteína PEGilada, así como para minimizar el impedimento estérico que puede generar una baja gelificación (Gnanou *et al.*, "Macromolecules", 20, 1662 -1671, 1987).

35 En resumen, se mezcló la solución precursora con solución madre de fotoiniciador al 1 % (v/v) preparada con Irgacure™ 2959 al 10 % p/v (Ciba Specialty Chemicals, Tarrytown, Nueva York) en etanol al 70 % y agua desionizada. Se colocó la solución bajo una luz UV (365 nm, 100 mW/cm²) durante 5 min para polimerizar. En las Figuras 4a-b, se muestran la estructura molecular y el aspecto de los hidrogeles.

40 EJEMPLO 2

Degradación del fibrinógeno PEGilado desnaturalizado

45 La degradación del fibrinógeno PEGilado desnaturalizado o fragmentado en productos de degradación de fibrinógeno PEGilado se verificó experimentalmente usando un ensayo de degradación *in vitro*. Básicamente, se forman fragmentos de fibrinógeno PEGilado desnaturalizado/fragmentado en una matriz para volver a crear una matriz 3D, que se puede implantar en un defecto de un sitio específico.

50 En estos experimentos, se usan diversas variaciones de los fragmentos de fibrinógeno PEGilado, incluyendo la proteína escindida y completa, con PEG-DA bien 6-kDa o 10 kDa unido a la proteína. La degradación por parte de la proteasa del fibrinógeno PEGilado desnaturalizado se mide colorimétricamente mediante la evaluación de la liberación de los productos de degradación de fibrinógeno PEGilado en el sobrenadante durante los experimentos. Se tapan con tapones cilíndricos tubos de silicona de 5 mm de diámetro de alícuotas de 100 µl de solución

55 precursora de PEG-fibrinógeno que contiene fotoiniciador. La degradación se cuantifica mediante el marcaje del fibrinógeno PEGilado con eosina-Y, que se une con alta afinidad al fibrinógeno, y la cuantificación de la liberación del fibrinógeno resultante de la disolución enzimática de la matriz 3D. A medida que se van disociando los productos de degradación del fibrinógeno solubles de la matriz, se cuantifican estos fragmentos liberados mediante mediciones espectrofotométricas en una solución tampón superpuesta.

60 Materiales y resultados experimentales

Moldeo de fibrinógeno PEGilado: se efectúa como se ha descrito anteriormente.

65 **Degradación del fibrinógeno:** se tiñeron muestras 3D de fibrinógeno PEGilado en 5 mg/ml de solución de eosina-Y (Sigma-Aldrich, St Louis, EE.UU.) durante 2 días, se lavaron y se transfirieron a 2 ml bien de 0,01 mg/ml de solución

de tripsina o 0,1 mg/ml de solución de collagenasa (Worthington, St. Louis, EE.UU.) que contenía PBS 50 mM y azida de sodio al 0,1 %. Se midieron los valores de absorbancia por espectrofotometría a 516 nm cada 30 minutos durante 3 horas. Tras el último punto temporal, se disoció por hidrólisis cada hidrogel, y se registraron los valores de absorbancia como una degradación del 100 %.

5

Resultados

Las Figuras 5a-d representan los resultados de experimentos de degradación que demuestran que el porcentaje de degradación de los precursores de PEG-fibrinógeno (es decir, la proporción de liberación de PEG-fibrinógeno con respecto al PEG-fibrinógeno total) se vio afectado por el peso molecular del PEG injertado, la composición de PEG con respecto a fibrinógeno y la configuración molecular del fibrinógeno desnaturalizado (completo o escindido). Se muestra la degradación de los precursores de PEG-fibrinógeno en collagenasa (0,1 mg/ml, Figuras 5c-d) o tripsina (0,01 mg/ml, Figuras 5a-b).

Los datos cinéticos revelan que los precursores preparados con PEG de 10 kDa, se liberan más rápido de la matriz que los precursores preparados con PEG de 6 kDa. La adición de PEG-DA a la solución precursora produjo una cinética de degradación significativamente más lenta ($n = 5$, $p < 0,01$). El cambio del peso molecular de PEG de 6 kDa a 20 kDa dio lugar a la degradación acelerada en presencia de 0,05 mg/ml de tripsina ($n = 6$, $p < 0,05$, datos no mostrados). Se evaluó la respuesta de los precursores PEGilados a diferentes concentraciones de enzima mediante la medición de la degradación en diluciones en serie de la collagenasa o tripsina después de 30 minutos de incubación (no se muestra). Los resultados de estos experimentos confirman la relación dependiente de la dosis entre de la cinética de degradación de los precursores PEGilados y las concentraciones de enzima. Los resultados también se verificaron mediante la degradación de fragmentos de fibrinógeno PEGilado y se analizaron usando SDS-PAGE (datos no mostrados), que reveló fragmentos más pequeños de productos de degradación PEGilados en comparación con los precursores PEGilados no degradados.

25

EJEMPLO 3

Ensayo de cultivo de tejidos

30

La liberación mediada por la proteasa de los productos de fibrinógeno PEGilado desnaturalizado a partir de materiales 3D intactos puede tener un profundo efecto quimiotáctico en cultivos de tejidos *in vitro* de diversos tipos. Se supone que cuando se liberan de la matriz 3D, los productos de degradación del fibrinógeno PEGilado desnaturalizado pueden facilitar la invasión quimiotáctica de las células, incluyendo las células vasculares de músculo liso, los condrocitos y las células madre embrionarias, en la matriz 3D que contiene el fibrinógeno PEGilado unido. Por lo tanto, se ensayó el potencial quimiotáctico de los productos de degradación del fibrinógeno PEGilado desnaturalizado mediante un ensayo *in vitro* de cultivo tisular diseñado en parte para esta tarea.

35

Ensayo de quimiotaxis: se empleó un ensayo de invasión celular usando tejido de músculo liso encapsulado por una matriz de fibrinógeno PEGilado (PEG de 10 kDa). Se introdujeron construcciones de tejido denso compuestas por geles de colágeno sembrados en células de músculo liso en los hidrogeles de PEG-fibrinógeno. Las construcciones de tejido de músculo liso se crearon a partir de una solución de 5 x DMEM, FBS al 10 %, solución de colágeno de tipo I reconstituido en ácido acético 0,02 N (2 mg/ml) y NaOH 0,1 M con células musculares lisas dispersas (3×10^6 células/ml, las células se aislaron a partir de explantes de tejido aórtico bovino de acuerdo con protocolos convencionales [Seliktar *et al.*, *Ann Biomed Eng.*, 28(4), 351-62, 2000]. Se colocaron los geles de colágeno en 300 μ l de solución precursora de PEG-fibrinógeno (con fotoiniciador) en una placa de 48 pocillos y se expusieron a luz UV durante 5 minutos. Los hidrogeles polimerizados encapsularon el tejido durante el proceso de gelificación. Se suplementaron las construcciones de tejido encapsuladas con 600 microlitros de medio de cultivo que contenía DMEM (Gibco), Pen-Strep y suero fetal bovino (FBS, Gibco). Se colocaron construcciones en una incubadora de temperatura controlada y CO₂, reponiéndose el medio cada dos días. Se formaron imágenes diarias de las células con un microscopio de contraste de fase para determinar el nivel de migración celular desde el borde del tejido y en el hidrogel de PEG-fibrinógeno. Se realizó la tinción histológica para la morfología celular [hematoxilina y eosina (H y E)] con el fin de evaluar la morfología de las células invasoras.

45

50

Se realizaron experimentos con explantes de cartílago usando métodos similares a los del tejido muscular liso. En este caso, se aislaron cortes de 1 mm de explantes de cartílago articular de articulaciones de rodilla de ovejas y se sumergieron en la solución precursora antes de su polimerización con luz UV (365 nm, 700 μ W/cm²). Se cultivaron los explantes encapsulados, reponiéndose el medio dos veces a la semana y formando imágenes periódicas como se ha detallado anteriormente. Se realizó la tinción histológica para proteoglicanos (safranina-O), la morfología celular (H y E) y la inmunotinción para el colágeno de tipo I y tipo II con el fin de evaluar el fenotipo de los condrocitos invasores y la muestra explantada.

60

Resultados

Las Figuras 6a-j muestran la invasión celular del tejido vascular en matriz de hidrogel que contiene PEG-fibrinógeno. Inicialmente, las células de músculo liso se encontraban contenidas dentro de la construcción de gel de colágeno

65

(Figura 6a). Varias horas después del moldeo, las células comenzaron a degradar proteolíticamente la matriz y liberar productos de degradación de fibrinógeno PEGilado. El efecto quimiotáctico de los péptidos provocó una invasión celular masiva en la densa matriz de PEG-fibrinógeno que rodeaba la masa de tejido (Figura 6b), que se prolongó en el transcurso del período de cultivo durante el que más fibrinógeno PEGilado fue degradado proteolíticamente por las enzimas secretadas por las células (Figura 6c). Cabe señalar que, durante las primeras 96 horas de cultivo, la velocidad de degradación e invasión celular fueron casi constantes y proporcionales al peso molecular de los precursores de PEG-fibrinógeno (datos no mostrados). Tras este período, la degradación y la invasión en la matriz fue más agresiva, como se indica por un fuerte aumento de la velocidad de invasión celular tras una semana (aumento del 91 %, $n = 5$, $p < 0,01$, Figura 7a). En general, la velocidad de degradación e invasión celular en los hidrogeles de PEG-fibrinógeno de 10 kDa fue significativamente superior a la velocidad de degradación e invasión producida en los hidrogeles de 6 kDa ($n = 4$, $p < 0,05$) (Figura 7b). El PEG-DA adicional usado para polimerizar la red de hidrogel alteró de manera significativa la velocidad de degradación e invasión celular en la matriz que contenía fibrinógeno PEGilado desnaturalizado (Figuras 6a-j, Figura 7a-b).

Otros tipos de tejidos mostraron respuestas similares cuando se encapsularon en la matriz degradable anterior. Los estudios que usan tanto células madre embrionarias como explantes de tejido de cartílago ilustraron la respuesta quimiotáctica de ambos tipos de tejidos hacia los productos de degradación PEGilados (Figuras 7c-d, respectivamente).

EJEMPLO 4

Osteogénesis in vivo mediada por productos de degradación de fibrinógeno PEGilado

Se estudiaron las propiedades osteoinductoras de los productos de degradación de fibrinógeno PEGilado desnaturalizado en la regeneración ósea en un defecto óseo en un sitio específico.

Materiales y procedimientos experimentales

Fabricación del implante: se colocaron tapones cilíndricos acelulares en tubos de silicona de 3 mm de diámetro usando alícuotas de 88 μ l de precursor de PEG-fibrinógeno mediante una reacción de fotopolimerización de grupos terminales de acrilato. Se añadió más PEG-DA (3 % o 5 % p/v) a la solución precursora con el fin de reducir la susceptibilidad de la estructura de fibrinógeno PEGilado hacia la degradación proteolítica (Tabla 2 que figura a continuación). La proporción final de PEG con respecto al monómero de fibrinógeno fue de 25:1, 100:1 y 150:1 para el PEG-DA al 0 %, PEG-DA al 3 % y PEG-DA al 5 %, respectivamente. Estas diferentes composiciones corresponden a hidrogeles de degradación rápida, intermedia y lenta (respectivamente) como se indica en la siguiente Tabla 2. Se mezcló la solución precursora con solución madre de fotoiniciador al 0,1 % (v/v) que consistía en IrgacureTM 2959 al 10 % p/v (generosamente donado por Ciba Specialty Chemicals, Tarrytown, Nueva York) en etanol al 70 % y agua desionizada. Se colocó la solución bajo luz UV (365 nm, 40-50 mW/cm²) durante 5 min para realizar la polimerización. Los hidrogeles previamente moldeados se almacenaron en PBS 50 mM que contenía penicilina-estreptomina al 2 % (Biological Industries, Israel) durante 5 horas antes del implante.

Implante en ratas: antes de iniciar los experimentos realizados, se obtuvo la aprobación de la Junta de Revisión Institucional de la Facultad de Medicina Rappaport del Technion, Instituto de Tecnología de Israel, y todos los experimentos se llevaron a cabo de conformidad con las directrices establecidas por el Comité Technion de cuidado de animales. Durante los 5 días previos a la operación, se dejó que las ratas hembra Sprague-Dawley (32 animales en total) de edades comprendidas entre 3 y 4 meses, con un peso de aproximadamente 250 g, se aclimataran a la vida en la jaula. Durante este período, se controló el peso del animal para asegurar la estabilidad y la adaptación adecuada. Los animales fueron alimentados con comida de laboratorio regular y tuvieron acceso a agua corriente a discreción. Se anestesiaron con una combinación de 120 mg/kg de ketamina y 17 mg/kg de xilazina. Durante el procedimiento quirúrgico, se colocó el animal en una placa caliente para mantener la temperatura corporal (y prevenir la hipotermia). Se afeitó la tibia derecha y se limpió con una solución de tinción de povidina. Se abrió la parte media de la tibia derecha del lado medial anterior mediante una incisión longitudinal. Se colocó un dispositivo de fijación externa proximal y distal a la sección media de la tibia de acuerdo con los protocolos publicados [Srouji *et al*, *Cell Tissue Bank*, 5(4), 223-30, 2004]. En síntesis, se introdujeron dos agujas en los segmentos proximal (21G) y distal (23G) de la tibia y se conectaron a dos aparatos de fijación externa con el fin de estabilizar el hueso (Figuras 8a-d). Se abrió un hueco de 7 mm con una sierra de disco de alta velocidad en la parte situada entre las agujas proximal y distal de los dispositivos de fijación. El peroné ipsilateral se dejó intacto. Se insertó un tapón de PEG-fibrinógeno (3 mm de diámetro y 7 mm de longitud) en el sitio del defecto, y se envolvieron el perostio circundante, así como el tejido fibroso subyacente y se suturó para fijar el tapón en su sitio (Figura 8d). Se suturó la herida de incisión con un hilo quirúrgico de nylon. Se administraron a las ratas antibióticos profilácticos (0,1 g/100g de ampicilina). Se hizo una radiografía poco después de la cirugía y posteriormente se evaluaron a intervalos semanales con un equipo de rayos X. Se alojaron en jaulas amplias para dejar que deambularan de manera relativamente libre durante todo el período de seguimiento postoperatorio. Al final del período de evaluación de 5 semanas, se sacrificaron las ratas con CO₂ y se extrajeron los huesos de tibia derecha para su evaluación histológica.

Resultados

Se diseñaron hidrogeles que comprendían fibrinógeno PEGilado con diversos grados de resistencia proteolítica a base de composición de poli(etilenglicol) y fibrinógeno para la cinética de liberación lenta, intermedia y rápida de los productos de degradación. Se implantaron los hidrogeles en defectos específicos de la tibia de ratas sin factores osteoinductores adicionales, suponiendo que la matriz desplazaría el coágulo de fibrina normal, manteniendo a la vez un efecto de cicatrización similar en el sitio del defecto por una duración más prolongada mediante la liberación de la degradación de productos de fibrinógeno PEGilado desnaturalizado. Los resultados histológicos y de rayos X que se describen detalladamente más adelante en el presente documento han confirmado que, tras 5 semanas del implante, el alcance y la distribución de hueso recién formado en el defecto se correlaciona fuertemente con el patrón de erosión del material implantado y la posterior liberación del fibrinógeno PEGilado degradado en torno al tejido. Si se compara con la pseudoartrosis de los animales de control no tratados, las ratas en las que se implantaron los materiales de PEG-fibrinógeno de degradación intermedia mostraron osteoneogénesis. Estos datos apoyan la sugerencia de que la liberación de productos de degradación de fibrinógeno PEGilado desnaturalizado proporciona propiedades inductoras. En este modelo de defecto óseo de un sitio específico, la liberación sostenida de productos de degradación de fibrinógeno PEGilado desnaturalizado facilita la respuesta osteogénica en el sitio de la lesión.

Tabla 2: Resumen de cohortes de tratamiento

Grupo	Degradación	Proporción de PEG:Fibrinógeno de la composición	Velocidad de degradación en 0,01 mg/ml de tripsina (% de pérdida de peso/min ^{1/2})	Velocidad de degradación en 0,1 mg/ml de colagenasa (% de pérdida de peso/min ^{1/2})
Control	N/D	Hueco vacío	N/D	N/D
1	Rápida	25:1	6,960	7,878
2	Intermedia	100:1	1,168	1,928
3	Lenta	150:1	0,292	0,351

Análisis específicos efectuados para corroborar el efecto osteoinductor de las composiciones de la presente invención

Análisis histológico: tras una evaluación radiográfica final, se extirpó cuidadosamente la tibia derecha de cada rata en su totalidad. Se fijaron las muestras en solución tamponada neutra de formalina al 10 % durante 10 días y luego se descalcificaron en ácido fórmico al 10 % durante 10 días. Se recortaron las muestras para que incluyeran el sitio del implante y el tejido óseo adyacente a cada lado del defecto. Tras enjuagar en PBS, se deshidrataron las muestras a concentraciones crecientes de etanol en agua desionizada (70 % al 100 %). Se embebieron las muestras en bloques extra-grandes de parafina, que se seccionaron a 6 µm, se fijaron en portaobjetos de vidrio recubiertos con poli-1-lisina, y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E).

Osteogénesis resultante: se observó radiográficamente el hueso recién formado en los defectos específicos de la tibia tan pronto como tres semanas después de la operación. Al comparar con las ratas de control, se hicieron evidentes grandes cantidades de hueso nuevo en los defectos de los animales del tratamiento 2 durante 5 semanas (datos no mostrados). Esto contrastó con la falta de hueso detectable radiográficamente en los defectos del tratamiento 1 (de degradación rápida), del tratamiento 3 (de degradación lenta) y de las ratas de control. El examen histológico confirmó que las ratas tratadas con el tratamiento 2 de degradación intermedia presentaron la osteoneogénesis más extensa y generalizada en y cerca del sitio del defecto. Las secciones longitudinales teñidas con H y E de las tibias revelaron que la medida de hueso regenerado en los defectos de un sitio específico varió del puente parcial a total del hueco (Figuras 9a-c). Se observó osteoneogénesis tanto en el aspecto endosteal como en el subperióstico. Al observar bajo luz polarizada, el patrón birrefringente del hueso cortical preexistente con fibras laminares contrastó fuertemente con el de las trabéculas óseas de tejido fibroso, características del tejido óseo recién depositado. El hueso subperióstico recién formado en los sitios de osteotomía era contiguo a las trabéculas óseas, que estaban en su mayor parte bordeadas por osteoblastos cuboidales en su parte frontal interior. El hueso formado endostealmente también era contiguo a las trabéculas recién formadas, que se extendían hasta el sitio del defecto. Había islas adipocíticas dispersas aleatoriamente entre las trabéculas del hueso de tejido fibroso recién formado. En tan solo algunas muestras, la cavidad medular contenía parte del tejido fibroso proximal al sitio de la osteotomía.

En los casos en los que hubo puente óseo total del defecto de un sitio específico, el implante había sido totalmente reabsorbido y reemplazado por hueso de fibras laminares con un patrón atípico de Havers, esencialmente, hueso osteonal. El hueso recién formado estaba ininterrumpido de un extremo al extremo opuesto de las osteotomías (Figura 9c), y consistía en hueso de tipo compacto de fibras laminares birrefringente con un número moderado de vasos dentro del sistema de Havers (datos no mostrados), característico del hueso maduro. En los casos en los que no hubo más que un puente parcial del defecto, a menudo había osificación endocondral de los islotes

cartilagosos. A modo de ejemplo, la Figura 10a ilustra una tapa endocondral típica situada en el aspecto medial de la parte delantera de regeneración: había condrocitos hipertróficos focalmente presentes en la tapa cartilaginosa, que estaba encerrada por un tejido fibroso de tipo pericondrio delgado con fibrocitos maduros orientados en paralelo en su borde delantero (Figuras 10a-b).

Mecanismo de neoosteogénesis: como se ha mostrado anteriormente, solo el tratamiento de hidrogel de PEG-fibrinógeno de degradación intermedia (tratamiento 2) causó una extensa formación de nuevo hueso en el sitio del defecto óseo. Sin embargo, a juzgar solo por los hallazgos histológicos, es evidente que el material de fibrinógeno PEGilado está dotado de propiedades osteoinductoras y que los macrófagos que erosionan la matriz que contiene fibrinógeno PEGilado desnaturalizado liberan lentamente productos de degradación de fibrinógeno PEGilado desnaturalizado osteoinductores para actuar como un frente de erosión para que se produzca osteoneogénesis en cuanto los geles den paso lentamente al hueso de nueva generación. Hay coincidencia con las observaciones de que los hidrogeles de rápida degradación no proporcionan una liberación sincronizada con la velocidad de cicatrización natural en un defecto óseo de un sitio específico de rata que, por lo general, requiere de 4 a 5 semanas para cicatrizar completamente. Es importante señalar que en el presente estudio, la composición del gel se seleccionó deliberadamente para que coincidiera con la velocidad de degradación óptima y la cinética de cicatrización de este tipo de lesión. A pesar de que los geles de degradación lenta y rápida son subóptimos para este tipo de lesión, es la capacidad de regular la degradación y liberar los productos de degradación de fibrinógeno PEGilado lo que permite a la presente tecnología tratar cualquier número de diferentes tipos de lesiones en los seres humanos.

Se observó que los fragmentos liberados desde el hidrogel de PEG-fibrinógeno facilitan una respuesta osteogénica prolongada dentro del defecto de un sitio específico. En particular, una liberación sostenida de los productos de degradación de fibrinógeno PEGilado desnaturalizado explica el alcance de la respuesta osteogénica en el grupo de ratas del tratamiento 2. Existen muchas pruebas de que los productos de degradación del fibrinógeno y de la fibrina son potentes agonistas de la cicatrización de heridas [Thompson *et al.*, *J Pathol*, 165(4), 311-8, 1991; Rybarczyk *et al.*, *Blood*, 102(12), 4035-43, 2003], especialmente en lo que se refiere a las células endoteliales [Lorenzet *et al.*, *Thromb Haemost*, 68(3), 357-53, 1992; Bootle-Wilbraham *et al.*, *Angiogenesis*, 4(4), 269-75, 2001] y fibroblastos [Gray *et al.*, *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 12(6), 684-90, 1995; Gray *et al.*, *J Cell Sci.*, 104(Pt2), 409-13, 1993]. De hecho, se ha demostrado que la fibrina induce una respuesta osteogénica en los defectos óseos llenos de materiales osteoconductores [Le Guehennec *et al.*, *J Mater Sci Mater Med*, 16(1), 29-35, 2005; Abiraman *et al.*, *Biomaterials*, 23(14), 3023-31, 2002; Kania *et al.*, *J Biomed Mater Res.*, 43 (1), 38-45, 1998]. Por otra parte, si los fragmentos de fibrinógeno no poseen cualidades osteoinductoras, cabría esperar un resultado similar a lo demostrado por otros investigadores que utilizan las matrices de increscencia biomiméticas inertes sin factores de crecimiento añadidos. Pratt *et al.* han publicado que los hidrogeles de erosión miméticos de la fibrina son incapaces de soportar la formación de hueso nuevo cuando ocupan un defecto de la bóveda craneal de tamaño específico en ausencia de BMP-2 osteoinductor [Pratt *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 86(1), 27-36, 2004]. Del mismo modo, Lutolf *et al.* han demostrado resultados similares empleando una matriz de increscencia biosintética mimética del colágeno sin BMP-2 osteoinductor [Lutolf *et al.*, *Nat Biotechnol*, 21(5), 513-8, 2003]. En comparación, el grado de osteoneogénesis usando hidrogeles que contenían PEG-fibrinógeno sin factores de crecimiento osteoinductor añadidos solo se puede explicar por un papel osteoinductor de los productos de degradación del fibrinógeno PEGilado en la medida en que es poco probable que el componente de PEG tenga cualidades osteoinductoras.

La osteoneogénesis sin precedentes observada en el presente estudio se atribuye a los fragmentos liberados de productos de degradación de fibrinógeno PEGilado y no necesariamente a la matriz intacta. Una presentación sostenida de fragmentos de fibrinógeno PEGilado ligeramente osteogénicos podría ser responsable de la respuesta osteogénica prolongada durante las 5 semanas del período de cicatrización. Esta explicación coincide con el hecho de que la mayoría de la osteoneogénesis producida en los defectos del tratamiento 2 se produce al menos a varios cientos de micrómetros de la superficie de erosión de los hidrogeles (Figura 11a), estando esta rodeada constantemente por un infiltrado inflamatorio. Incluso los hidrogeles de degradación lenta (tratamiento 3) inducen una cierta respuesta osteogénica suave alrededor del implante, presumiblemente a causa de los fragmentos liberados de fibrinógeno PEGilado (datos no mostrados). Desde este punto de vista, no hay evidencia de osteoneogénesis en los animales tratados con hidrogel de degradación rápida (tratamiento 1), lo que sugiere que la disolución rápida de los fragmentos de fibrinógeno PEGilado no permite una adecuada formación de hueso nuevo.

EJEMPLO 5

Condrogénesis in vivo mediada por productos de degradación del fibrinógeno PEGilado

Se estudiaron las propiedades osteoinductoras de productos de degradación de fibrinógeno PEGilado desnaturalizado en la regeneración del cartílago en un defecto osteocondral de tamaño crítico.

Materiales y procedimientos experimentales

Fabricación del precursores: se preparó precursor de PEG-fibrinógeno a partir de fibrinógeno PEGilado de acuerdo con el método detallado anteriormente. Se modificó la solución de implante con PEG-DA adicional con el fin

de reducir la susceptibilidad de la estructura de fibrinógeno PEGilado a la degradación proteolítica. La proporción final de PEG con respecto al monómero de fibrinógeno usada fue de 150:1, 200:1 y 350:1. Se mezclaron alícuotas de precursor de PEG-fibrinógeno con solución madre de fotoiniciador al 0,1 % (v/v) que incluía Irgacure™ 2959 al 10 % p/v (generosamente donado por Ciba Specialty Chemicals, Tarrytown, Nueva York) en etanol al 70 % y agua desionizada. Se ensayó la polimerización de la solución bajo luz UV (365 nm, 40-50 mW/cm²) por una duración de 5 minutos para determinar si la solución se polimerizaba antes del implante. Una vez verificada la polimerización, la solución precursora estaba lista para la polimerización *in situ*. En el modelo de defecto osteocondral, el implante se polimeriza directamente en el defecto de 6 mm usando una fuente de UV y la guía de luz (Figuras 12a-d).

Implante en ovejas: se permitió la aclimatación de ovejas adultas de esqueleto maduro (peso medio de 70 kg) a la vida en la jaula una semana antes de la operación. Tras 24 h de ayuno y premedicación por infusión i.v. de 10 mg/kg de ketamina-HCl y 0,05 mg de xilazina, inducción mediante la administración i.v. de 4-6 mg/kg de propofol, se intubó al animal. Tras la intubación, incluyendo el mantenimiento por inhalación de isoflurano al 1:5-2 % y la ventilación por presión positiva de O₂ al 100 % mediante el control del volumen, se administró un bolo de 0,1 mg de fentanilo al animal inmediatamente antes de la operación. Se llevó a cabo la analgesia postoperatoria mediante 2-4 mg/kg de tolfine p.o. 3 veces al día. Los animales recibieron 2,5 g de metamizol y 1 g de cefazolina dos veces al día hasta el tercer día después de la operación. Los experimentos se realizaron en la articulación femoro-tibiarrotuliana derecha de la pata trasera de las ovejas. Se cubrió la pata en condiciones estériles y se abrió mediante incisión anterolateral parapatelar. Se dislocó la rótula medialmente, dejando el cóndilo femoral al descubierto. Con el uso de una herramienta de perforación y un punzón de 6 mm hecho a medida, se introdujeron dos defectos, a 1 y 2,5 cm de distancia de la escotadura intercondílea, en la zona de soporte del peso de los cóndilos femorales (Figura 12a). Se crearon los defectos con el punzón, y se retiraron por completo tanto el hueso como el cartílago subcondral con la broca. Se produjo un poco de sangrado intraoperatorio del hueso subcondral que se cortó con una gasa estéril. En los sitios de defecto que no sangraron, se inyectó la solución de PEG-fibrinógeno de forma estéril y se polimerizó *in situ* usando una fuente de luz UV portátil (Figura 12d). Entonces se cerró la herida en capas. Se aplicó una escayola externa (Scotch/Soft Cast, 3M HealthCare, St. Paul, MN, EE.UU.) sobre la articulación femoro-tibiarrotuliana y de la rodilla durante 5 días. Se limitó la actividad en la jaula de los animales con el fin de reducir la carga articular. Tras retirar la escayola, se dejó que la oveja se moviera libremente, y se le dio una dieta equilibrada dos veces al día. Al final del período de evaluación de 4 meses, se sacrificaron los animales y se extirparon las articulaciones femoro-tibiarrotulianas de la pata trasera para la observación global, histología e inmunohistoquímica. Tras el sacrificio, se extirpó el fémur distal y se colocó en formalina tamponada neutra al 10 %. Tras 24 h, se diseccionaron las zonas de los cóndilos que contenían los defectos y se volvieron a introducir en formalina al 10 % durante 4 días. Se embebieron las muestras descalcificadas en parafina y se seccionaron en cortes de 4 mm de espesor.

Resultados

Los defectos osteocondrales tratados con hidrogeles de fibrinógeno PEGilado presentaron la regeneración del cartílago articular como se observa mediante la observación global tras 4 meses (Figuras 13a-d). Las Figuras 13a-b muestran los cuatro defectos el día de la operación, en la muesca rotuliana (Figura 13a) y en el cóndilo (Figura 13b). Tras cuatro meses, se observan los mismos defectos en la muesca rotuliana (Figura 13c) y el cóndilo (Figura 13d). Solo el defecto de la muesca rotular medial (Figura 13c, derecha) no presentó nueva formación de cartílago. El resto de los defectos, que se trataron, resultaron tener cartílago nuevo que crecía en la superficie de la articulación.

La evaluación histológica de estos defectos reveló una amplia formación de nuevo cartílago en la región del defecto, junto a la formación de hueso nuevo alrededor del implante de erosión (Figuras 14b-d). Los defectos vacíos presentaron fibrocartílago y la formación excesiva de tejido cicatricial (Figura 14a). La medida de los productos de degradación PEGilados liberados y la consiguiente erosión del implante de hidrogel fue dependiente de la proporción del PEG con respecto al fibrinógeno; los hidrogeles con más PEG presentaron una erosión más lenta y una liberación más lenta de los productos terapéuticos de degradación de fibrinógeno PEGilado. Las Figuras 14a-d resumen la relación entre la proporción molar del PEG con respecto al fibrinógeno y los patrones de erosión del implante de hidrogel. Además, la tinción histológica de las secciones usando manchas para el colágeno de tipo I (Figura 15a-d), proteoglucanos (Figura 16a-d) y colágeno de tipo II (Figura 17a-d) mostró la tinción característica del cartílago articular (hialino) por encima del puente óseo recién formado sobre el implante de erosión. La tinción con colágeno de tipo I se realizó (Figura 15a-d) para verificar la formación de hueso nuevo en el sitio del defecto, alrededor del implante de erosión. La tinción de proteoglucanos se realizó (Figura 16a-d) para verificar la generación de cartílago hialino en los defectos tratados (Figura 16b-d), mientras que los defectos tratados con control no fueron positivos para los proteoglucanos (Figura 16a). La tinción de colágeno de tipo II se llevó a cabo (Figura 17a-d) para confirmar que la composición de la superficie del cartílago coincide con la composición de cartílago hialino; en esas muestras tratadas que se tiñeron, se encontró que la superficie del cartílago recién formado era positiva para el colágeno de tipo II (Figura 17b-d).

Osteogénesis y condrogénesis: el cartílago y hueso recién formado en el defecto de tamaño crítico fue evidente en las tres condiciones de tratamiento después de 3-4 meses (Figuras 14b-d). Por otra parte, los defectos de control estaban llenos de tejido cicatricial y no mostraron ningún signo de condrogénesis (Figura 14a). Se sugiere que los implantes de liberación lenta pueden ser más eficaces en la cicatrización de la lesión basándose en la calidad del cartílago articular formado en el defecto tratado (Figuras 19a-d). Al igual que en el estudio óseo, es evidente que el

material de fibrinógeno PEGilado está dotado de propiedades inductoras de la reparación tanto del hueso como del cartílago y que los macrófagos que erosionan la matriz que contiene fibrinógeno PEGilado desnaturalizado liberan lentamente productos de degradación del fibrinógeno PEGilado desnaturalizado osteoinductores para actuar como un frente de erosión para que se produzca la osteoneogénesis y la condrogénesis en cuanto los geles den paso lentamente al hueso y cartílago de nueva generación. Aquí, de nuevo, cabe señalar que la composición del gel se seleccionó arbitrariamente para que coincidiera con la velocidad de degradación y la cinética de cicatrización óptimas en este tipo de lesión. Por consiguiente, las cinéticas de cicatrización de esta lesión son tales que fue posible observar la regeneración del cartílago en las tres condiciones de tratamiento mientras que el grupo de control (defecto vacío), claramente, no fue capaz de crear nuevo cartílago. A pesar de que estas composiciones eran óptimas para este tipo de lesión en ovejas, es la capacidad de regular la degradación y liberación de los productos de degradación de fibrinógeno PEGilado lo que aporta a esta tecnología la versatilidad para el tratamiento de la misma lesión en los seres humanos.

Los fragmentos liberados del hidrogel de PEG-fibrinógeno facilitaron una respuesta osteogénica y condrogénica prolongada dentro de la lesión subcondral. Al igual que con el estudio en ratas anterior, una liberación sostenida de los productos de degradación de fibrinógeno PEGilado desnaturalizado explica el alcance de la respuesta osteogénica y condrogénica en los animales tratados. La condrogénesis observada, en particular, se atribuye a los fragmentos liberados de productos de degradación de fibrinógeno PEGilado y no a la matriz intacta. Una presentación sostenida de fragmentos de fibrinógeno PEGilado ligeramente inductores podría ser responsable de la prolongada respuesta condrogénica durante los 4 meses de la cicatrización. Esta explicación coincide con el hecho de que la mayor parte de la regeneración de hueso y cartílago en los defectos tratados se produce al menos a varios cientos de micrómetros de la superficie de erosión de los hidrogeles (Figuras 18a-b), estando esta rodeada constantemente por un infiltrado inflamatorio.

Es particularmente impresionante observar el alcance de la integración sin fisuras entre los bordes del defecto y el cartílago recién formado en los animales tratados (Figuras 20a-f). En algunos casos, fue difícil calibrar dónde terminaban los márgenes originales del defecto y comenzaba el tejido recién formado. Del mismo modo, el hueso recién formado estaba muy bien integrado con el tejido óseo circundante existente de los márgenes de la lesión. Esto es un indicador importante de la calidad de la cicatrización que se puede alcanzar por medio de la tecnología de la degradación de fibrinógeno desnaturalizado PEGilado.

Conclusiones: la inyección de implantes que erosionan y liberan productos de degradación de fibrinógeno desnaturalizado PEGilado en un sitio de defecto osteocondral puede promover la reparación de la superficie del cartílago articular a través de la inducción y la liberación sincronizada de los fragmentos de fibrinógeno inductores.

EJEMPLO 6

CONTROL DE LA EXCRECENCIA TRIDIMENSIONAL DE NEURITAS USANDO HIDROGELES DE PEG-FIBRINÓGENO

Para ensayar el potencial del material de armazón de PEG-fibrinógeno para facilitar la regeneración del nervio, se usó un modelo de excrecencia de ganglios radicales posteriores (GRP) de embrión de pollo. En la etapa inicial de la regeneración nerviosa, la fibrina proporciona señales ambientales de células de Schwann para la proliferación, asegurando así que haya suficientes células para asociarse con las neuronas que se regeneran. En ausencia de fibrina, posteriormente, las células de Schwann se pueden diferenciar y de remielinizar los axones recién formados. Por consiguiente, este modelo implica que la persistencia prematura de la fibrina en el sitio de la lesión puede interferir con el delicado momento del proceso de regeneración del nervio e interrumpir la construcción de tejido nervioso funcional. Por lo tanto, la capacidad para controlar la degradación y la eliminación de la matriz de fibrina es crucial para permitir la regeneración correcta del nervio.

El componente de PEG sintético proporciona las propiedades físicas deseadas y características de degradación controlables. El componente de fibrinógeno natural de la matriz biosintética proporciona señales que regulan la proliferación y la migración de las células de Schwann y, por lo tanto, probablemente influirá en la remielinización de los axones regenerados. Una ventaja adicional del enfoque del fibrinógeno PEGilado es que permite el control de la bioactividad relativa de los productos de degradación de fibrinógeno basándose en el supuesto de que el PEG unido covalentemente puede disminuir la accesibilidad a los sitios activos en la molécula de fibrinógeno tanto intacto como degradado. Por lo tanto, una estrategia de PEGilación ofrece control sobre la degradación, la bioactividad y la estructura molecular del fibrinógeno de la matriz de increscencia celular de conductos de orientación de nervios (NGC).

Además, el presente inventor ha demostrado que es posible controlar la biodegradación de la matriz de fibrinógeno cambiando las cantidades relativas de fibrinógeno y PEG en dicho sistema. Con este fin, Dikovsky *et al.* demostraron que el aumento de las concentraciones de PEG-DA en el hidrogel de fibrinógeno PEGilado disminuyeron la susceptibilidad proteolítica de la estructura proteica, retrasando, por tanto, la biodegradación del fibrinógeno PEGilado [Dikovsky D. *et al. Biomaterials* 2006; 27(8):1496-506]. El sistema de fibrinógeno PEGilado también presenta la ventaja adicional para la regeneración nerviosa de que los factores de crecimiento terapéuticos se

pueden encapsular y enredar en la red polimérica densa del hidrogel durante el proceso de polimerización. La encapsulación de los factores para la regeneración nerviosa podría proporcionar señales específicas de las neuronas más allá de las disposiciones biológicas y estructurales inherentes de la red de hidrogel de fibrinógeno PEGilado. Una de las neurotrofinas más importantes en el desarrollo y la regeneración neuronal es el factor de crecimiento nervioso (NGF). Las células de Schwann producen NGF, un dímero de 26 kDa, en su fase inmadura durante el desarrollo temprano y después de la desdiferenciación posterior a la lesión en los nervios maduros. Por consiguiente, es importante que el NGF sea parte integral del material del implante de orientación de nervios.

Materiales y métodos experimentales

Experimentos con ganglios radiculares posteriores: se diseccionaron GRP de embriones de pollo E9-E11 y se extrajeron en PBS con penicilina-estreptomicina al 1 % (Biological industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel). Se redujo al mínimo la contaminación por fibroblastos de los GRP sembrándolos previamente en placas durante una hora en MEM con medio Glutamax I (Gibco, Grand Island, NY, EE.UU.), que contenía penicilina estreptomicina al 1 % y suero fetal bovino al 10 % (FCS), (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel). A continuación, se separaron físicamente los GRP previamente sembrados de la placa de cultivo y se atraparon en construcciones de hidrogel preparadas a partir de una solución precursora de fibrinógeno PEGilado (preparado como se describe en el Ejemplo 1) y fotoiniciador. En síntesis, se mezcló la solución precursora con solución madre de fotoiniciador al 1 % (v/v) preparada con Irgacure™ 2959 al 10 % (p/v) (Ciba Specialty Chemicals, Tarrytown, Nueva York) en etanol al 70 % y agua desionizada. Después, se centrifugó la solución a 14.000 rpm durante 1 minuto antes de usarla para atrapar los GRP aislados. El procedimiento de atrapamiento implicó colocar suavemente los GRP intactos en una placa de 48 pocillos que contenía la solución precursora. Primero se recubrió la placa de 48 pocillos con 100 µl de fibrinógeno PEGilado polimerizado con el fin de prevenir el crecimiento de células en el fondo del pocillo. Cada GRP se colocó en 200 µl de solución de fibrinógeno PEGilado y se polimerizó bajo una luz UV (365 nm, 4-5mW/cm²) durante 5 minutos. Después de la polimerización del hidrogel, se examinaron visualmente los GRP atrapados para garantizar la encapsulación 3D en la matriz biosintética (Figuras 25a-c). Se añadió medio de cultivo de inmediato a los hidrogeles polimerizados (500 a cada pocillo) y se cambió cada dos días. El medio de cultivo se componía de MEM con medio Glutamax I que contenía penicilina-estreptomicina al 1 % y FCS al 10 %. A menos que se indique lo contrario, el medio fue complementado con 50 ng/ml de factor de crecimiento nervioso murino 2.5S (mNGF) (Alomone Labs LTD., Jerusalén, Israel).

Mediciones cuantitativas de la excrecencia: se registró la excrecencia celular del GRP en el hidrogel transparente de fibrinógeno PEGilado durante los cuatro días del experimento. Cada construcción de GRP se documentó con imágenes digitales tomadas diariamente con un microscopio de contraste de fase Nikon TE2000 con un objetivo x4 y una cámara digital CCD (Jenoptik, Alemania). Las mediciones cuantitativas de la excrecencia de las neuritas se obtuvieron directamente de las micrografías de contraste de fase digital usando el programa informático ImageJ. Las neuritas, que se pueden identificar por su morfología de germinación característica, se midieron desde la base (margen exterior del GRP) a lo largo hasta la punta. Se realizó hasta un total de 80 mediciones para cada construcción de GRP, de acuerdo con la capacidad de rastrear las neuritas continuas. Entonces, se calculó la excrecencia media de las neuritas del GRP para cada construcción de GRP individual promediando las 80 mediciones de cada construcción (n = 1). Se calculó la excrecencia media de las neuritas para cada tratamiento usando los datos de excrecencia media de neuritas de GRP.

Histología e inmunofluorescencia: la preparación de las muestras de GRP para la evaluación histológica y de inmunofluorescencia implicó la fijación en paraformaldehído al 4 % (Gadot, Haifa, Israel) durante 20-30 min, lavados con PBS y crioprotección durante una noche en una solución de sacarosa al 30 % (en PBS) a 4 °C. Luego se congeló lentamente cada construcción fijada en Compuesto Tissue-Tek® O.C.T. (Sakura Finetek, Torrance, CA, EE.UU.), usando isopropanol refrigerado con nitrógeno líquido (Gadot, Haifa, Israel). Las construcciones congeladas se almacenaron en un congelador (-80 °C) durante un máximo de tres meses. Se seccionaron las muestras ortogonalmente en cortes de 30 µm de espesor usando un criostato y se montaron en portaobjetos Polysin™ (Menzel-Glaser, Braunschweig, Alemania). Antes de la tinción, se secaron los portaobjetos al aire a temperatura ambiente durante 2 horas y se almacenaron a -20 °C. Se realizó una tinción con hematoxilina y eosina (H y E) tinción (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) de acuerdo con los protocolos del fabricante convencionales.

El marcaje de inmunofluorescencia de muestras de 30 µm de espesor implicó el tratamiento con Triton® X-100 al 0,3 % (Bio Lab LTD, Jerusalén, Israel) durante 5 min a TA y la incubación en solución de bloqueo que contenía PBS y glicina al 1 %, suero de caballo donante al 10 % (HDS) (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) y Triton® X-100 al 0,1 % durante 30 min a TA. Se tiñeron dos veces las secciones con anticuerpos primarios contra tubulina βIII, (G712A, Promega, Madison, WI, EE.UU.) y s100 (S2644, Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.). Se diluyeron los anticuerpos primarios en solución de bloqueo (dilución 1:1000 para la tubulina βIII y dilución 1:200 para s100) y se incubaron durante una noche a 4 °C en una cámara de humedad. Se lavaron las secciones y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios conjugados con fluorescencia, incluyendo Cy3 de cabra anti-ratón diluido 1:250 (Chemicon International, Temecula, CA, EE.UU.) para la tubulina βIII y FITC de cabra anti-conejo diluido 1:300 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, EE.UU.) para s100. Se incorporó directamente una contra-tinción nuclear en la solución de tinción de anticuerpo secundario diluido usando

una solución madre de DAPI diluida 1:500 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Tras la incubación, se lavaron las secciones con PBS y se montaron con FluoromountG (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, EE.UU.).

- 5 **Análisis estadístico:** se realizó el análisis estadístico de conjuntos de datos de al menos dos experimentos independientes. Dependiendo del conjunto de datos, los tratamientos se compararon mediante ANOVA de un solo factor, ANOVA de dos factores o ensayo t de Student pareado. La significación estadística se aceptó para $p < 0,01$.

Resultados experimentales

- 10 **Excrecencia de GRP:** se prepararon construcciones de tejido atrapando GRP dentro de hidrogeles de fibrinógeno PEGilado (Figuras 21a-c) y cultivándolos durante un máximo de un mes en una incubadora de CO₂. La excrecencia celular del GRP se hizo visible en micrografías de contraste de fase y secciones histológicas de H y E (Figuras 22a-d). Durante el experimento, las células del GRP invadieron el hidrogel de fibrinógeno PEGilado y, finalmente,
15 ocuparon toda el gel (no se muestra). Las micrografías de contraste de fase muestran la organización espacial y la orientación distintas de las células de GRP invasoras en la matriz de fibrinógeno PEGilado después de dos días (Figura 22a). En la Figura 22b, se muestra un gran aumento de esta organización, donde los procesos largos y delgados (neuritas) que se extienden fuera del GRP se acompañan de células no neuronales (manchas circulares oscuras) que emergen del núcleo del GRP y se alinean a lo largo de las extensiones de neuritas. Se observó que la
20 excrecencia no neuronal de los GRP (Figura 22b, punta de flecha) va a la zaga de las extensiones de neuritas (Fig. 22b, flecha). Las secciones transversales histológicas (30 μ m) de las construcciones de GRP tras cuatro días de cultivo teñidas con H y E mostraron características de invasión celular similares (Figuras 22c-d).

- La disposición de las células no neuronales (gliales) invasoras desde el GRP y en alineación con las neuritas se
25 parecía a la organización espacial *in vivo* de las neuronas y sus células de Schwann asociadas. Para identificar las diferentes células de GRP invasoras en estos experimentos, se marcaron tanto las neuritas como las células de Schwann con marcadores de inmunofluorescencia neuronales y gliales. Se realizó la inmunodetección en secciones transversales de 30 μ m de espesor de las construcciones de GRP con el marcador neuronal anticuerpo tubulina β III y el marcador de células de Schwann anticuerpo s100. El marcaje muestra claramente neuritas que se extienden
30 desde el GRP a la matriz, y células de Schwann asociadas en estrecha proximidad con las células neuronales invasoras (Figuras 23a-c). Las imágenes de mayor ampliación muestran las células de Schwann estrechamente asociadas con las neuritas en la medida en que se alinean a lo largo de y son adyacentes a las extensiones positivas de tubulina β III (Figuras 23d-f). Estos resultados se correlacionan bien con las observaciones de las células de GRP dentro del hidrogel como se observa por microscopía de contraste de fase (Figuras 22a-b).

- 35 **Tratamientos con factor de crecimiento nervioso:** se realizaron experimentos para examinar la influencia del NGF en el medio de cultivo frente al encapsulado en el hidrogel durante su formación con construcciones de excrecencia de GRP. Se compararon tres condiciones de tratamiento: un tratamiento sin usar NGF (NO NGF), un tratamiento que en el que se usa NGF soluble libre en el medio de cultivo (NGF SL) y un tratamiento con NGF enredado en la
40 red de hidrogel (NGF EN). Se realizaron dos experimentos independientes en cada condición de tratamiento para un total de seis repeticiones usando dos lotes diferentes de precursores de fibrinógeno PEGilado. Las construcciones se cultivaron durante cuatro días y se formaron imágenes diarias para medir el progreso de la excrecencia celular 3D desde los GRP hacia la red de hidrogel. Basándose en los resultados de las micrografías de contraste de fase (datos no mostrados), el NGF soluble libre y el NGF enredado (NGF SL y NGF EN) facilitaron la excrecencia tanto de las
45 células no neuronales como de las neuritas en el hidrogel en comparación con las construcciones sin NGF (NO NGF). En ausencia de NGF, no se observó excrecencia de neuritas y solo excrecencia parcial de células no neuronales, que lo más probable es que fueran células de Schwann o fibroblastos. La inmunohistoquímica confirma las observaciones de microscopía de contraste de fases en tanto en cuanto las células positivas en tubulina β III y s100 estaban presentes en tratamientos de NGF (NGF SL y NGF EN), pero solo las células positivas en s100 se
50 observaron en el tratamiento sin NGF (NO NGF) (Figuras 24a-c). Basándose en estos datos cualitativos, es difícil concluir si existen diferencias significativas en la excrecencia 3D de los GRP entre el NGF libre soluble y EN NGF enredado; ambos tratamientos con NGF libre soluble (NGF SL) y NGF enredado (NGF EN) mostraron una patrón de marcaje similar.

- 55 Para diferenciar mejor los tratamientos con NGF soluble libre y NGF enredado, se realizaron experimentos de excrecencia cuantitativos. Con el uso del procesamiento digital de imágenes, se midió la distancia de la excrecencia de neuritas en construcciones de GRP que se cultivaron con NGF soluble libre (NGF SL) o NGF enredado (NGF EN). La Figura 28d muestra que hubo poca diferencia entre las dos condiciones de tratamiento en cualquier momento durante el período de cultivo ($p > 0,35$, $n = 6$). En el NGF libre soluble y enredado, hubo un rápido
60 aumento en la excrecencia de neuritas en el transcurso del experimento de cuatro días ($P < 0,01$, $n = 6$), con una longitud media de las neuritas de hasta 719,9 μ m y 701,2 μ m para los tratamientos con NGF SL y NGF EN, respectivamente después de cuatro días.

- 65 **Excrecencia celular y biodegradación del hidrogel:** las alteraciones a las propiedades de biodegradación de la estructura de fibrinógeno de la matriz de hidrogel también pueden influir en las características de excrecencia celular

de los GRP, especialmente en lo relacionado con la invasión relativa de las células de Schwann y las neuritas. Se realizaron experimentos para evaluar la capacidad de regular la cinética de excrecencia usando diferentes composiciones de la matriz (cantidad relativa de PEG y fibrinógeno) basándose en el supuesto de que la resistencia proteolítica de la matriz de fibrinógeno aumentará con concentraciones crecientes de PEG. Por consiguiente, los hidrogeles de fibrinógeno PEGilado también se vuelven más reticulados con más PEG, cambiando de este modo el tamaño de malla, la hidratación y las propiedades mecánicas de la matriz. Se ensayaron cuatro composiciones diferentes de PEG con respecto al fibrinógeno, incluyendo: 30:1, 60:1, 120:1 y 180:1 (PEG:fibrinógeno). Es importante señalar que la composición de las construcciones en cada nivel de tratamiento fue tal que la solución de fibrinógeno PEGilado puro (tratamiento 30:1) se modificó con PEG-DA sin reaccionar adicional antes de la etapa de polimerización con UV. Se realizaron dos experimentos independientes en cada nivel de tratamiento para un total de nueve repeticiones usando dos lotes diferentes de precursores de fibrinógeno PEGilado puro.

En general, la medida de la excrecencia celular desde el GRP hacia la matriz se redujo con la adición de mayores concentraciones de PEG-DA en la matriz de hidrogel (Figuras 25a-p). El desfase entre las neuritas y las células gliales se redujo visiblemente con la adición de mayores concentraciones de PEG-DA (Figuras 25q-t). En la Figura 25u, se presenta un resumen de los datos de la cinética de excrecencia de las neuritas con las diferentes concentraciones de PEG. El análisis estadístico de los datos cinéticos (ANOVA de 2 factores) reveló que la excrecencia aumentó de forma constante con el tiempo de cultivo ($p < 0,01$, $n = 9$) y que las concentraciones más elevadas de PEG ralentizaron la invasión celular ($p < 0,01$, $n = 9$). En particular, las construcciones realizadas con altas concentraciones de PEG-DA (120:1 y 180:1) retrasaron la excrecencia de las neuritas significativamente desde el día 2 de cultivo en comparación con las construcciones realizadas con menores concentraciones de PEG (30:1 y 60:1). La excrecencia de las neuritas en los hidrogeles 180:1 presentó cinéticas de excrecencia más lentas de todos los niveles de tratamiento, y alcanzó una longitud media de las neuritas de 201,6 μm tras cuatro días de cultivo. Las construcciones realizadas con 120:1 mostraron una velocidad de excrecencia de las neuritas moderada y alcanzaron una longitud media de las neuritas de 490,8 μm tras cuatro días. No hubo diferencia significativa en la excrecencia de las neuritas entre los niveles de tratamiento 30:1 y 60:1 ($p > 0,50$, $n = 9$); en ambos casos, la excrecencia avanzó más rápidamente y alcanzó una longitud media de las neuritas de 807,8 μm y 850,6 μm , respectivamente, tras cuatro días de cultivo.

Fibrinógeno y excrecencia celular desde los GRP: se examinó la importancia de la estructura del fibrinógeno en permitir la excrecencia celular desde el GRP hacia la matriz de fibrinógeno PEGilado usando hidrogeles de solo PEG como controles. Se prepararon construcciones de GRP de PEG-DA al 10 % sin fibrinógeno y se compararon con las construcciones realizadas con fibrinógeno PEGilado. Las construcciones se cultivaron durante tres días y la excrecencia celular se documentó al tercer día del cultivo. La Figura 26a muestra que sin fibrinógeno, muy pocas neuritas se extienden hacia fuera del GRP y que no se observó excrecencia de las células no neuronales, incluyendo las células de Schwann. Por el contrario, los hidrogeles que contienen fibrinógeno muestran excrecencia masiva desde el GRP, incluyendo la invasión de neuritas y de células de Schwann, tras tres días de cultivo (Figura 26b). Estos resultados demuestran el papel del fibrinógeno en permitir la excrecencia desde los GRP, que incluye la susceptibilidad proteolítica, señales ambientales inductoras y conductoras que pueden ser cruciales para la regeneración del nervio periférico funcional. En consecuencia, la excrecencia neuronal fue prácticamente eliminada, incluso en los hidrogeles de fibrinógeno PEGilado, cuando los cultivos de GRP carecían de NGF (NO NGF), mientras que se observaron otros tipos de células (incluyendo las células de Schwann) invadir el hidrogel (Figura 26c).

Análisis y discusión

La regeneración de los nervios periféricos es un proceso complejo, altamente regulado, que requiere señales ambientales específicas que son proporcionados por la matriz extracelular (MEC) y la estrecha comunicación bidireccional entre los axones regenerantes y sus células de Schwann asociadas. Se han diseñado muchas estrategias de regeneración de los nervios periféricos usando NGC para proporcionar el medio óptimo para la regeneración de PNS, usando materiales naturales o sintéticos y diferentes estrategias de administración de factores de crecimiento. Debido a que los NGC todavía tienen que lograr la eficacia de los autoinjertos nerviosos, se buscan enfoques alternativos que puedan aprovechar los mecanismos de cicatrización naturales de la reparación de los nervios periféricos tras una lesión moderada. Con este fin, los hidrogeles de proteína PEGilada de la presente invención pueden servir como plantilla para la regeneración nerviosa que combina los efectos paracrinicos de la fibrina (fibrinógeno) y el control sobre la biodegradación y la bioactividad proporcionado por el paradigma de la PEGilación.

Los experimentos descritos anteriormente en el presente documento apoyan un posible sistema de biomaterial de NGC basado en fibrinógeno PEGilado, hidrogeles que mantienen la excrecencia de células de los GRP. Se usó una matriz 3D de hidrogel compuesta de PEG y fibrinógeno para encapsular GRP de embriones de pollo para formar construcciones transparentes que permitieran el control directo de la excrecencia desde los GRP (Figuras 21a-c). Se observó la excrecencia de neuritas y células no neuronales (gliales) a partir de los GRP hacia el hidrogel (Figuras 22a-d). Además, se observó una organización espacial similar a la *in vivo* de estas células. Específicamente, las neuritas largas se observaron en las proximidades de sus células gliales asociadas. Usando anticuerpos específicos de la tubulina β III y s100, se demostró que las células de Schwann positivas en s100 están muy relacionadas con las

neuritas positivas en tubulina β III que se extienden radialmente (Figura 23a-f). Estos complejos de neuronas-células de Schwann permiten la producción y la organización de la mielina a lo largo de los axones que se extienden con el fin de proporcionar una propagación rápida y eficaz de los potenciales de acción a lo largo de los axones. Por consiguiente, esta organización espacial distinta es un requisito previo para la mielinización axonal durante la última fase de la regeneración neuronal.

Es probable que las neuritas y las células gliales de los GRP empleen un mecanismo proteolítico para invadir la matriz de hidrogel de fibrinógeno PEGilado en tanto en cuanto el hidrogel es muy susceptible a las proteasas [Almany L., *et al. Biomaterials* 2005; 26 (15):2467-77] y, por otro lado, es demasiado denso para permitir la invasión celular en ausencia de la proteólisis. Debido a que la estructura de fibrinógeno proporciona al hidrogel biosintético su biodegradabilidad, también proporciona un medio de liberación de fragmentos escindidos de fibrinógeno a partir de la matriz tras la degradación. De esta manera, la cinética de invasión de las neuritas y las células gliales, así como la bioactividad de los fragmentos de fibrinógeno liberados se pueden controlar cambiando la cantidad relativa de PEG y fibrinógeno. Las cantidades mayores de PEG reducen la susceptibilidad a la degradación proteolítica de la estructura del fibrinógeno [Dikovsky D. *et al. Biomaterials* 2006; 27(8):1496-506] y, presumiblemente, reducen la bioactividad global de los fragmentos de fibrinógeno degradados que se liberan hacia el tejido circundante [Hoofman G., *et al. J Bioact Compat Polym* 1996; 11:135-159]. De hecho, la adición de PEG al hidrogel biosintético ralentiza la invasión tanto de las células de Schwann como de las neuritas del GRP (Figuras 25a-p). Además, pareció que a concentraciones más bajas de PEG, la excrecencia no neuronal desde los GRP iba a la zaga de las extensiones de neuritas, mientras que las concentraciones superiores de PEG redujeron al mínimo este retraso (Figuras 25q-t).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> REGENTIS Biomaterials Ltd.

<120> MATRIZ COMPUESTA DE UNA ESTRUCTURA DE PROTEÍNA DE ORIGEN NATURAL
RETICULADA MEDIANTE UN POLÍMERO SINTÉTICO Y MÉTODOS PARA SU GENERACIÓN Y USO

<130> FSS-13594-EP

<140> aún no conocido

<141> aún no conocido

<150> 11/472.520

<151> 22 de junio de 2006

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento derivado de fibrinógeno

<400> 1

Arg Gly Asp
1

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento derivado de fibrinógeno

<400> 2

ES 2 451 651 T3

		Lys Thr Arg Trp Tyr Ser Met Lys Lys Thr
		1 5 10
5	<210> 3	
	<211> 20	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Fragmento derivado de fibrinógeno	
	<400> 3	
		Lys Thr Arg Trp Tyr Ser Met Lys Lys Thr Thr Met Lys Ile Ile Pro
		1 5 10 15
		Phe Asn Arg Leu
		20
15	<210> 4	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Fragmento derivado de fibrinógeno	
	<220>	
	<221> misc_feature	
25	<222> (3)..(4)	
	<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural	
	<400> 4	
30		Lys Gly Xaa Xaa Tyr Ser Met Arg Lys
		1 5
	<210> 5	
	<211> 6	
	<212> PRT	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Fragmento derivado de fibrinógeno	
40	<400> 5	
		Leu Phe Glu Tyr Gln Lys
		1 5
45	<210> 6	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Fragmento derivado de fibrinógeno	
	<400> 6	
55		Tyr Met Tyr Leu Leu Lys
		1 5

ES 2 451 651 T3

5
<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento derivado de fibrinógeno

10
<400> 7

Val Lys Glu Leu Ile Lys
1 5

15
<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento derivado de fibrinógeno
20
<400> 8

His Gln Val Glu Asn Lys
1 5

25

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno **caracterizado por** un daño tisular, composición que comprende PEG unido a fibrinógeno desnaturalizado y que está formulada para la liberación inmediata de un producto de escisión enzimática de dicho fibrinógeno desnaturalizado, comprendiendo dicho producto actividad terapéutica, en la que dicha liberación inmediata se efectúa mediante el uso de una formulación no reticulada, es decir, no sometida a una reacción de polimerización de radicales libres, que tiene una proporción molar de PEG:fibrinógeno desnaturalizado de 2:1-350:1.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición está formulada para la administración local.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición está formulada para la administración sistémica.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha enzima está seleccionada del grupo que consiste en plasmina, colagenasa y tripsina.
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho producto de escisión enzimática es como se expone en SEC ID N° 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho PEG está seleccionado del grupo que consiste en acrilato de PEG (PEG-Ac) y vinilsulfona de PEG (PEG-VS).
7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicho PEG-Ac está seleccionado del grupo que consiste en PEG- DA, multiacrilato de PEG en estrella de 4 brazos y multiacrilato de PEG en estrella de 8 brazos.
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho PEG-DA es un PEG-DA de 4 kDa, PEG-DA de 6 kDa, PEG-DA de 10 kDa y/o PEG-DA de 20 kDa.

Figura 1a

Molécula de fibrinógeno purificado

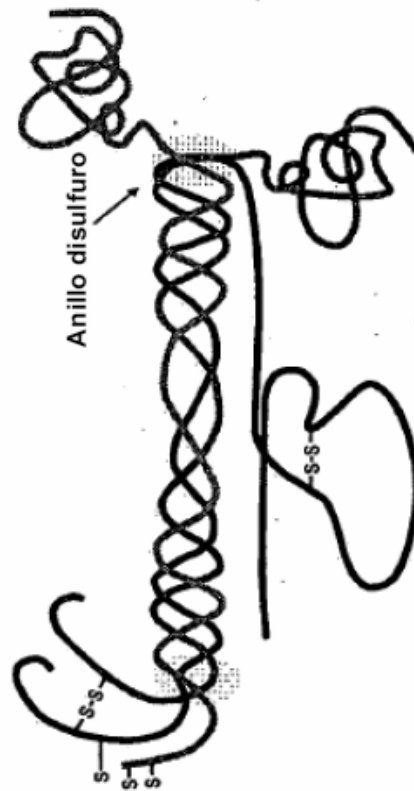


Figura 1b

Molécula de fibrinógeno desnaturalizado

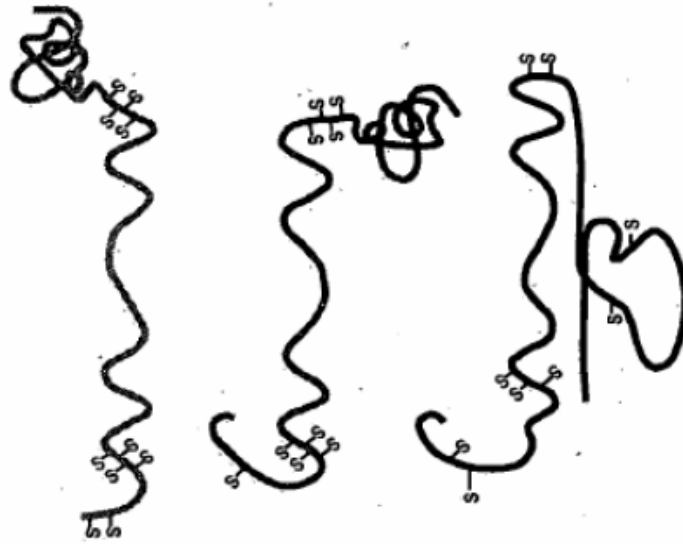


Figura 2a
Fibrinógeno completo PEGilado

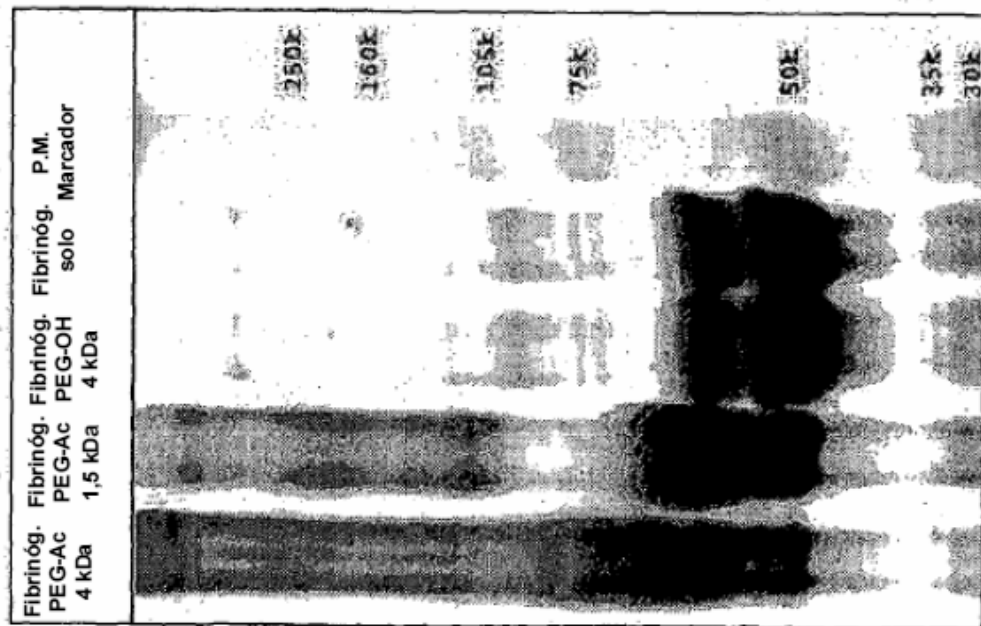
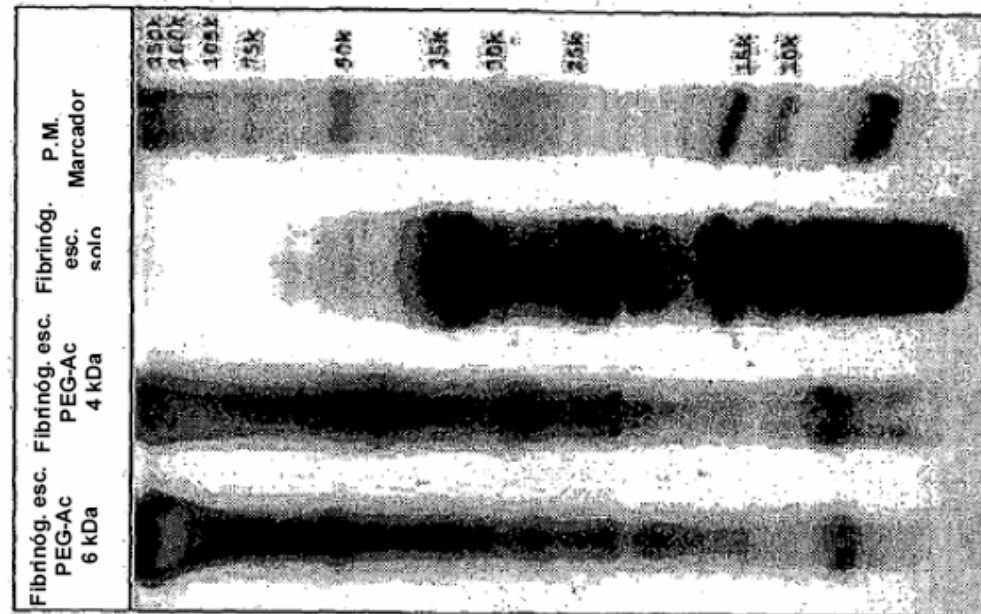


Figura 2b

Fibrinógeno escindido PEGilado



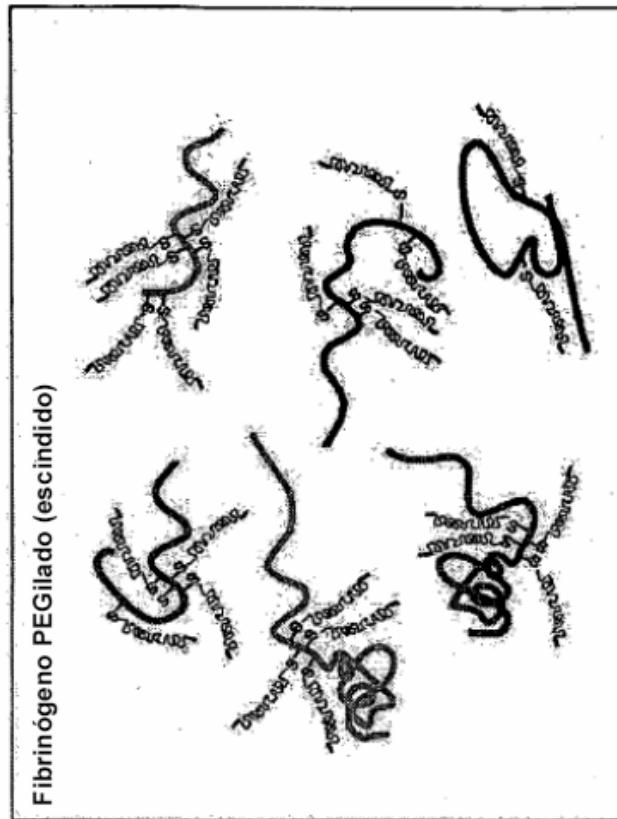


Figura 3b

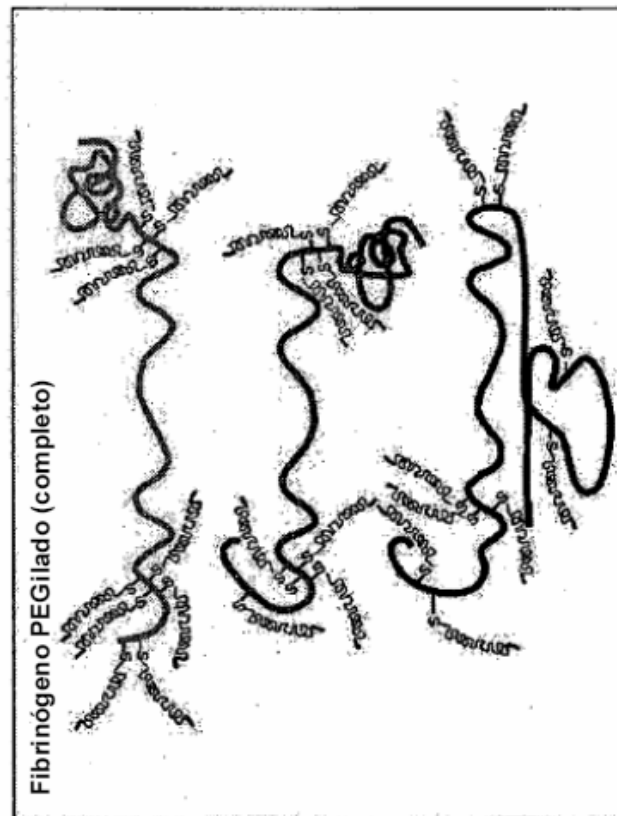


Figura 3a

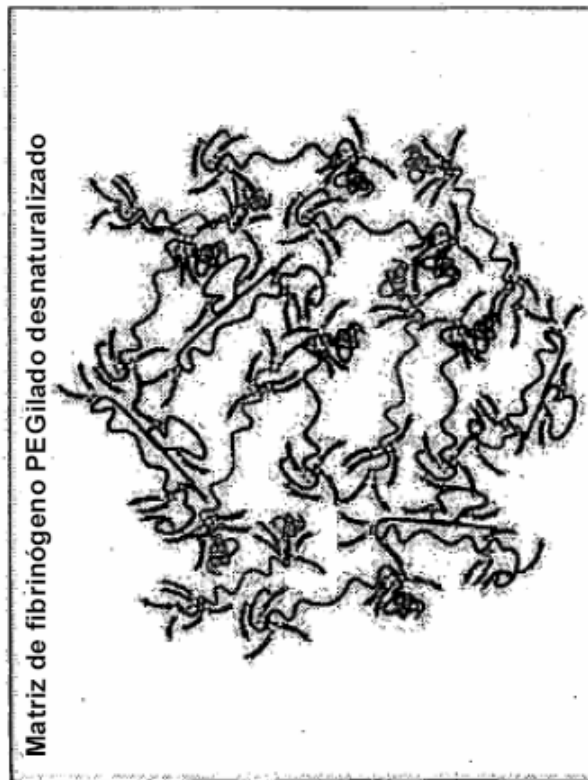
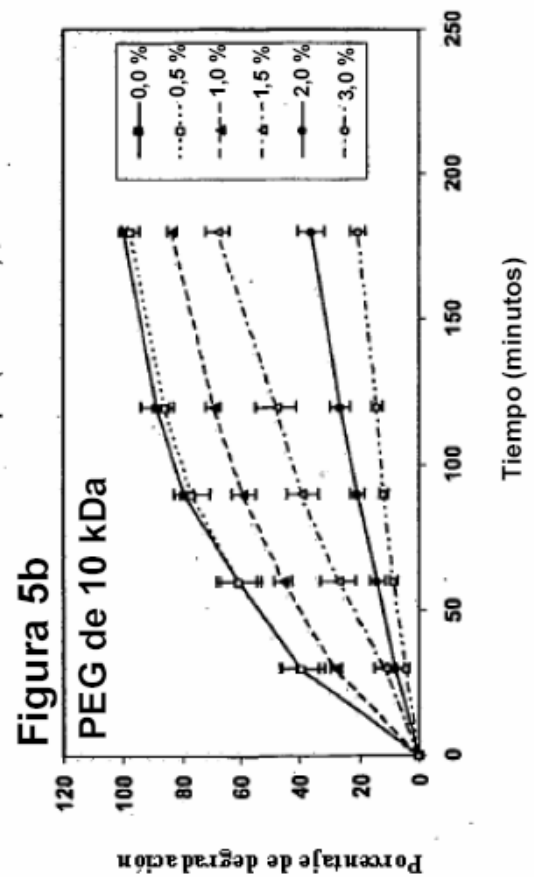
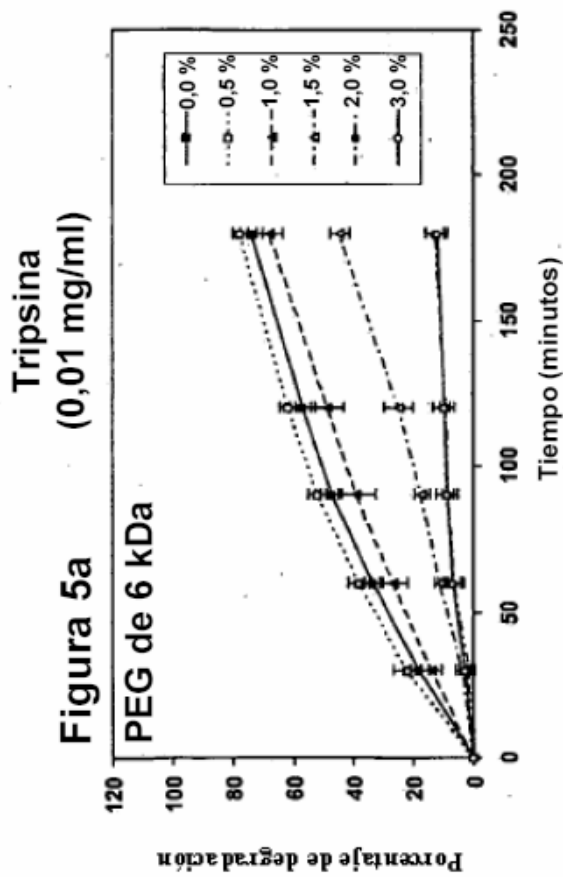
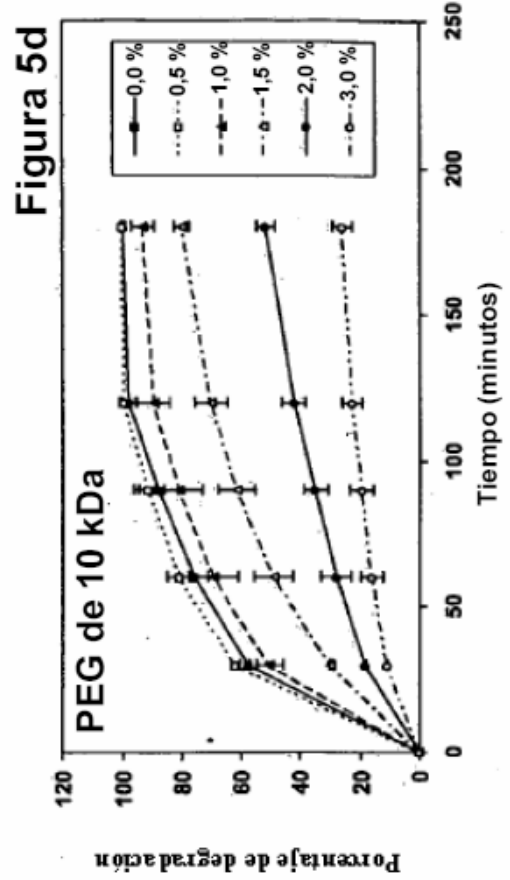
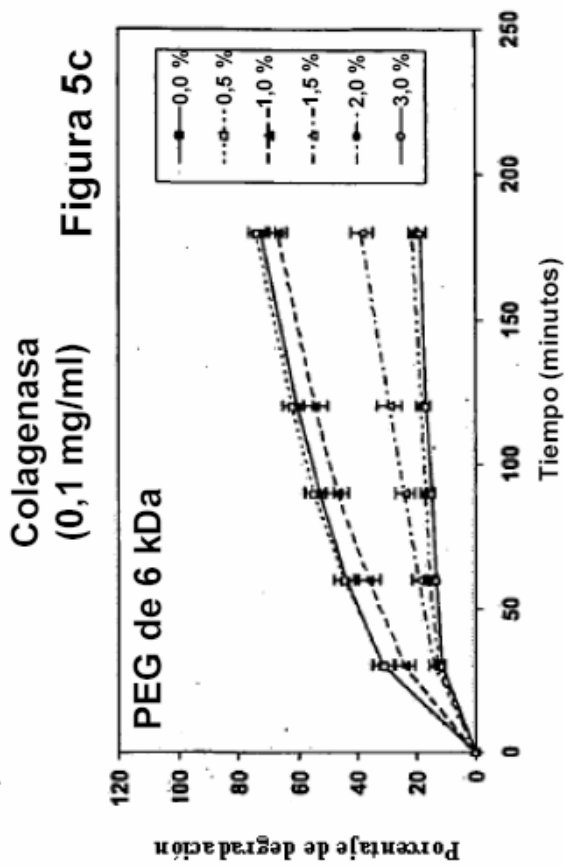


Figura 4a



Figura 4b



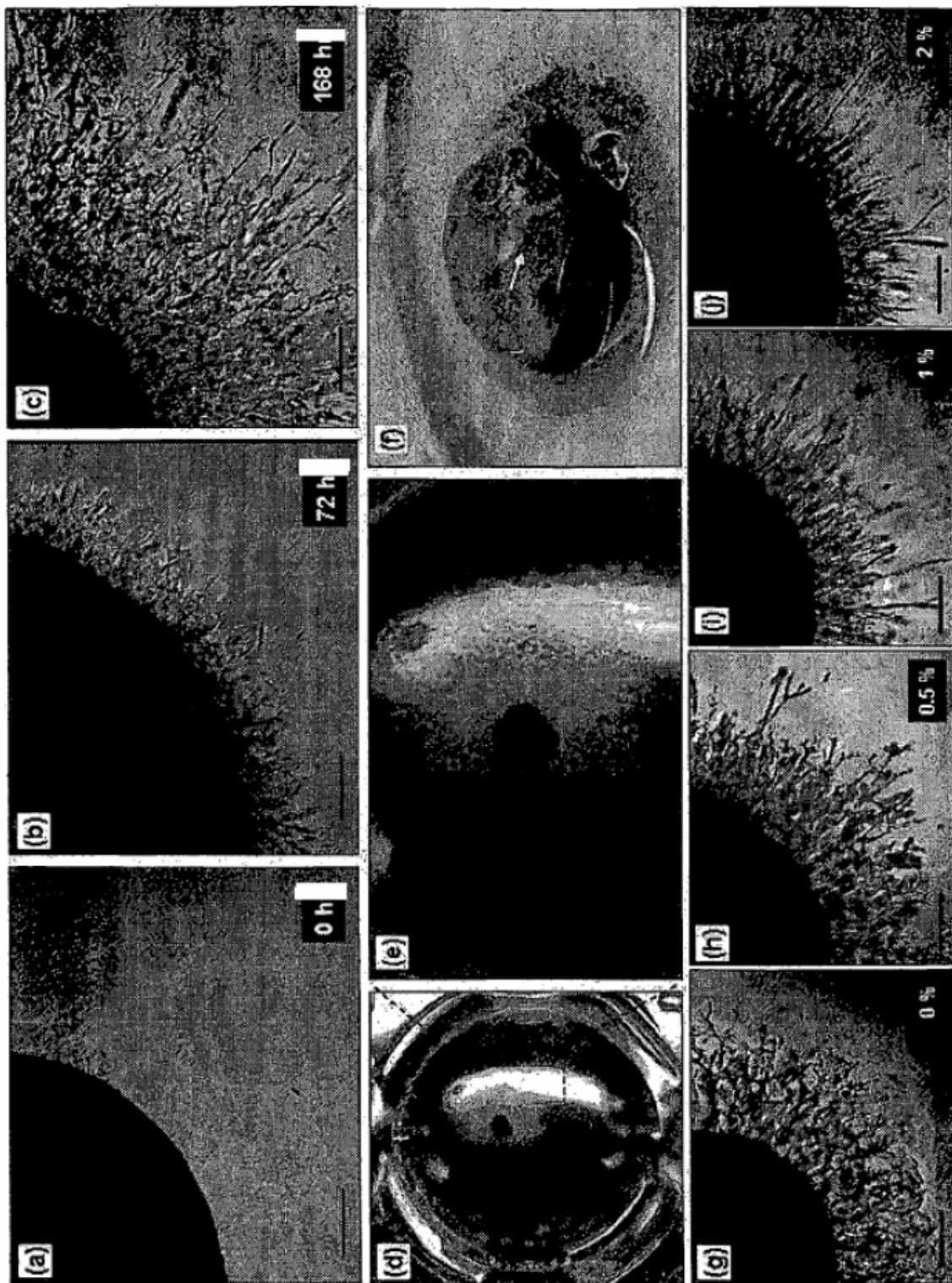


Fig. 6a-j

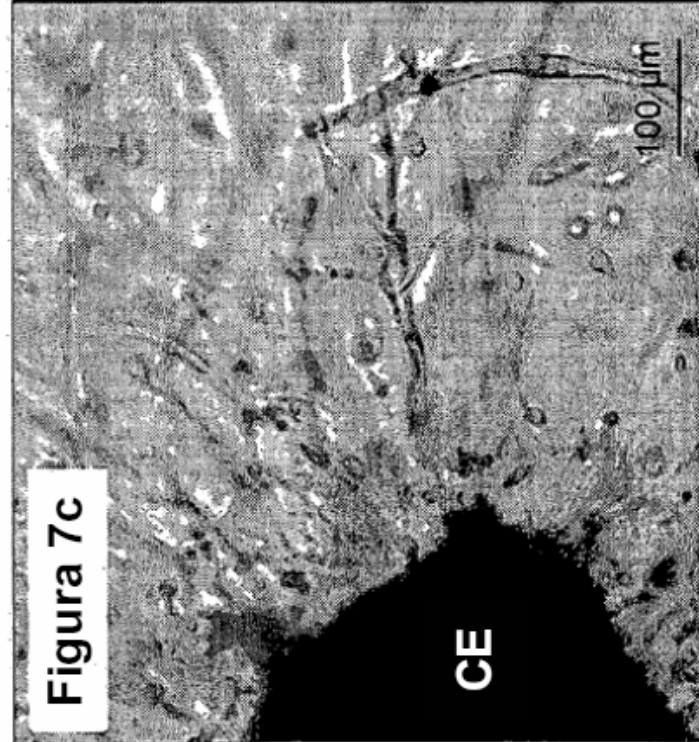
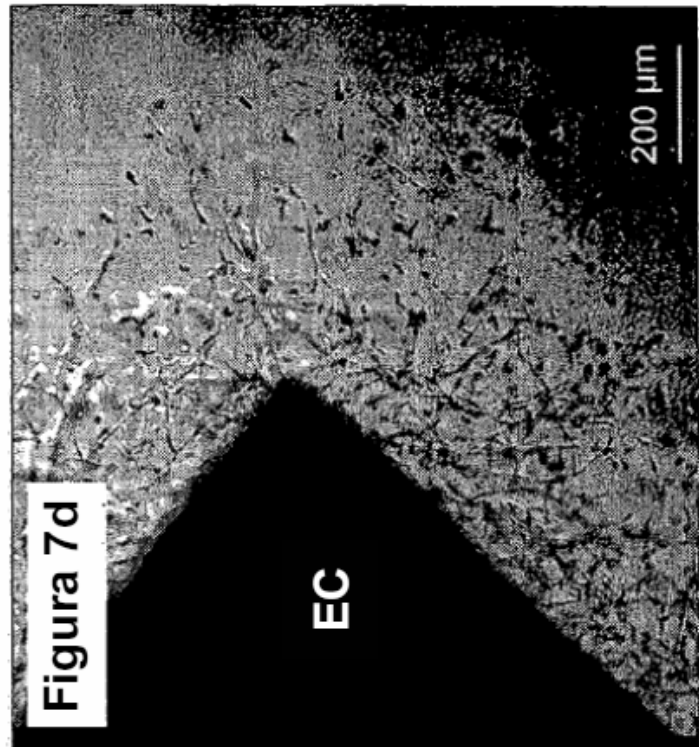
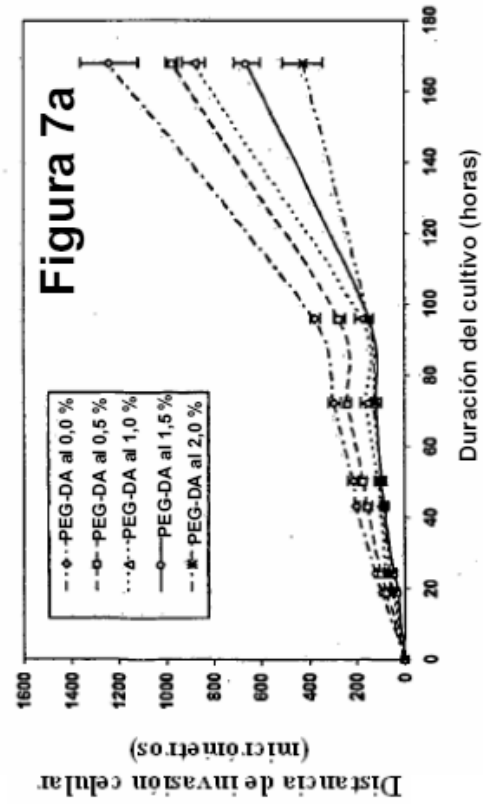
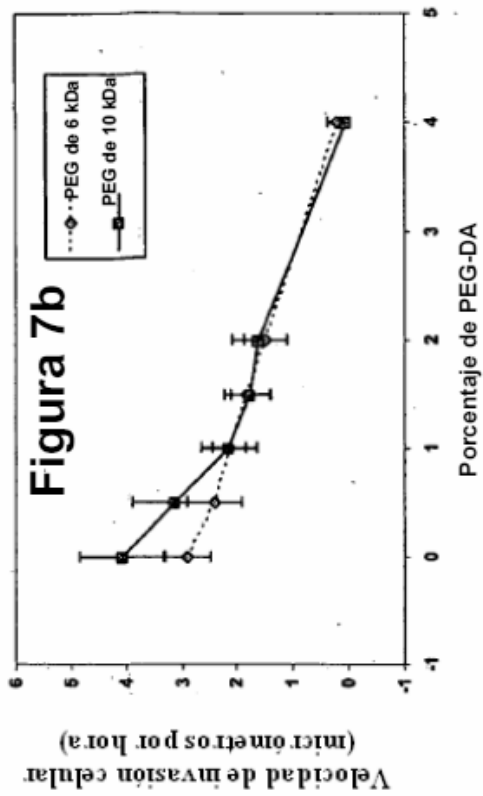
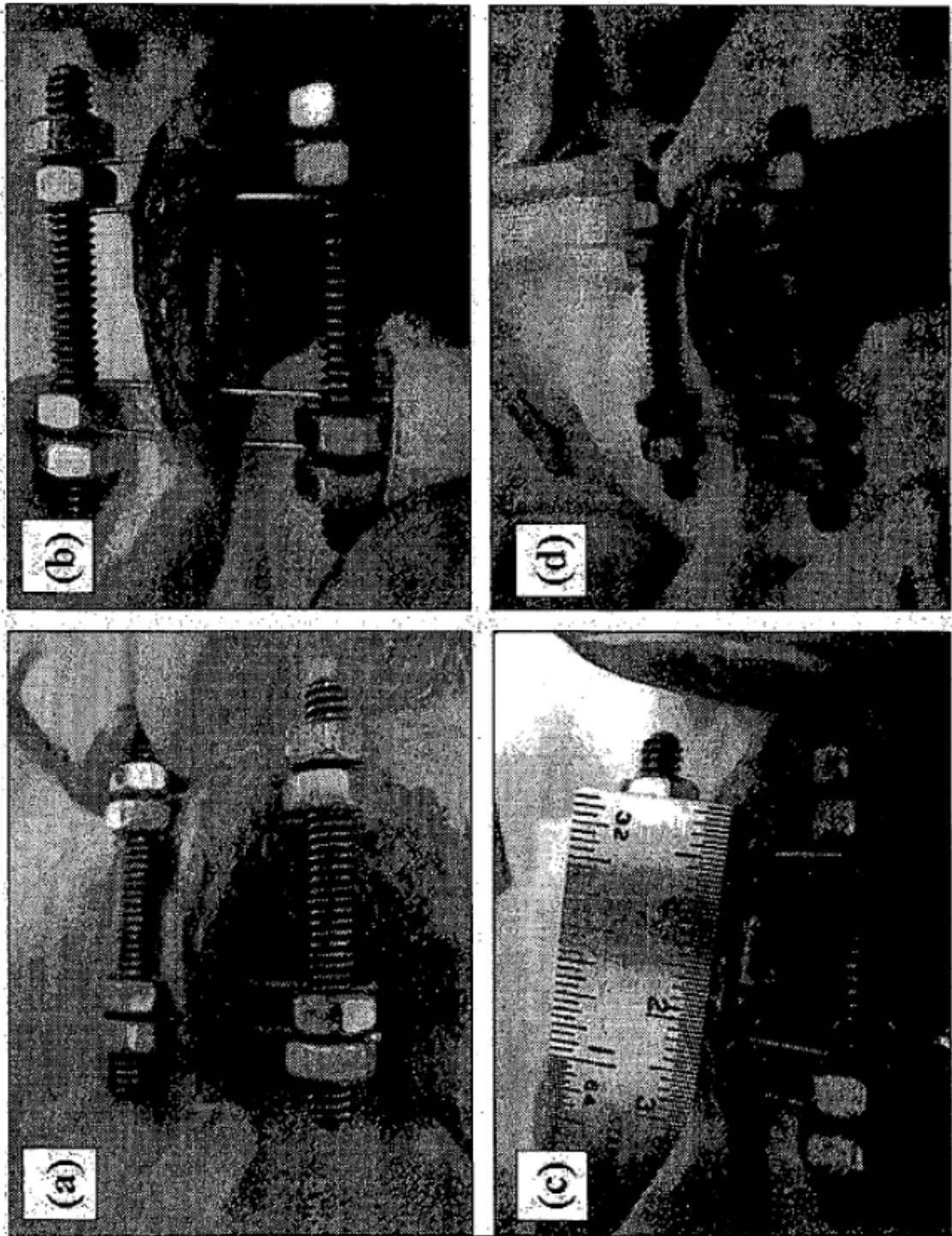


Fig. 8a-d



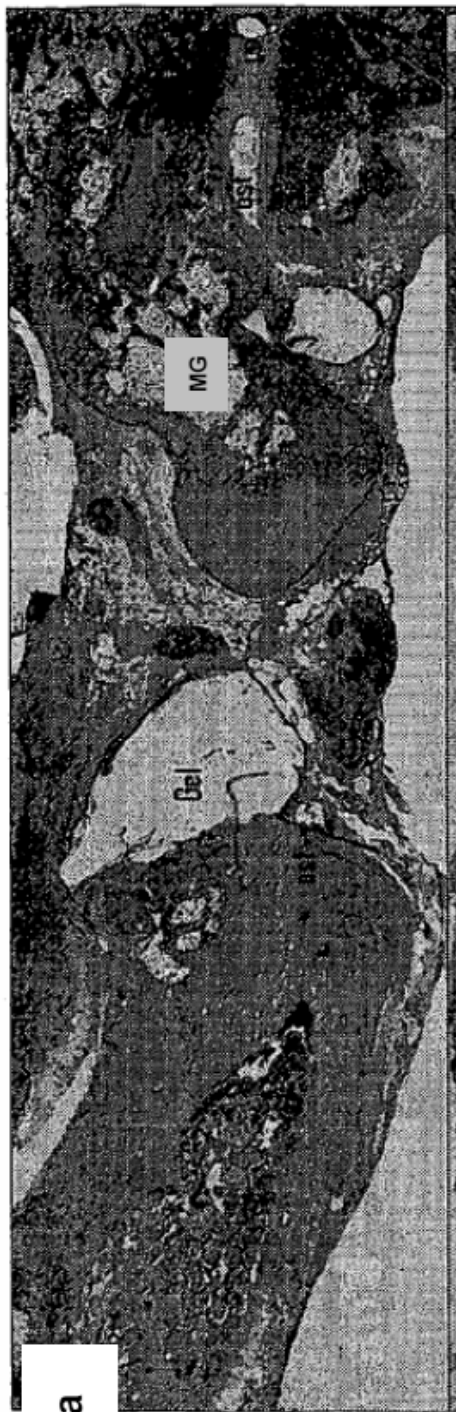


Figura 9a



Figura 9b

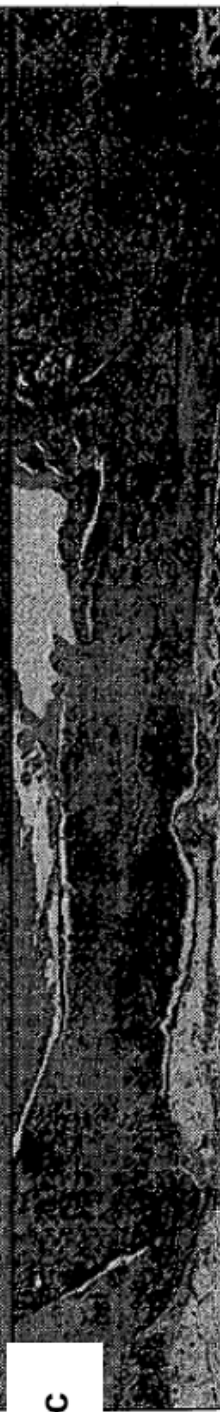


Figura 9c



Fig. 10a-b

Fig. 11a-b

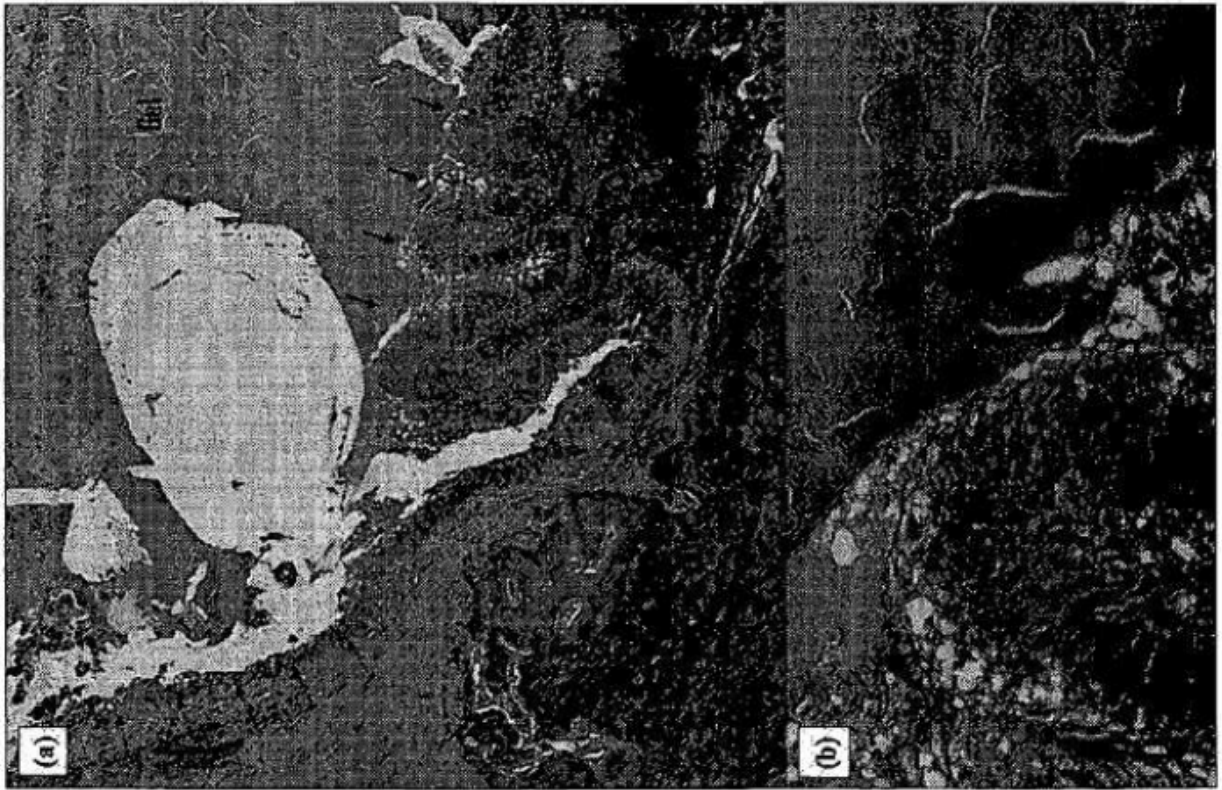
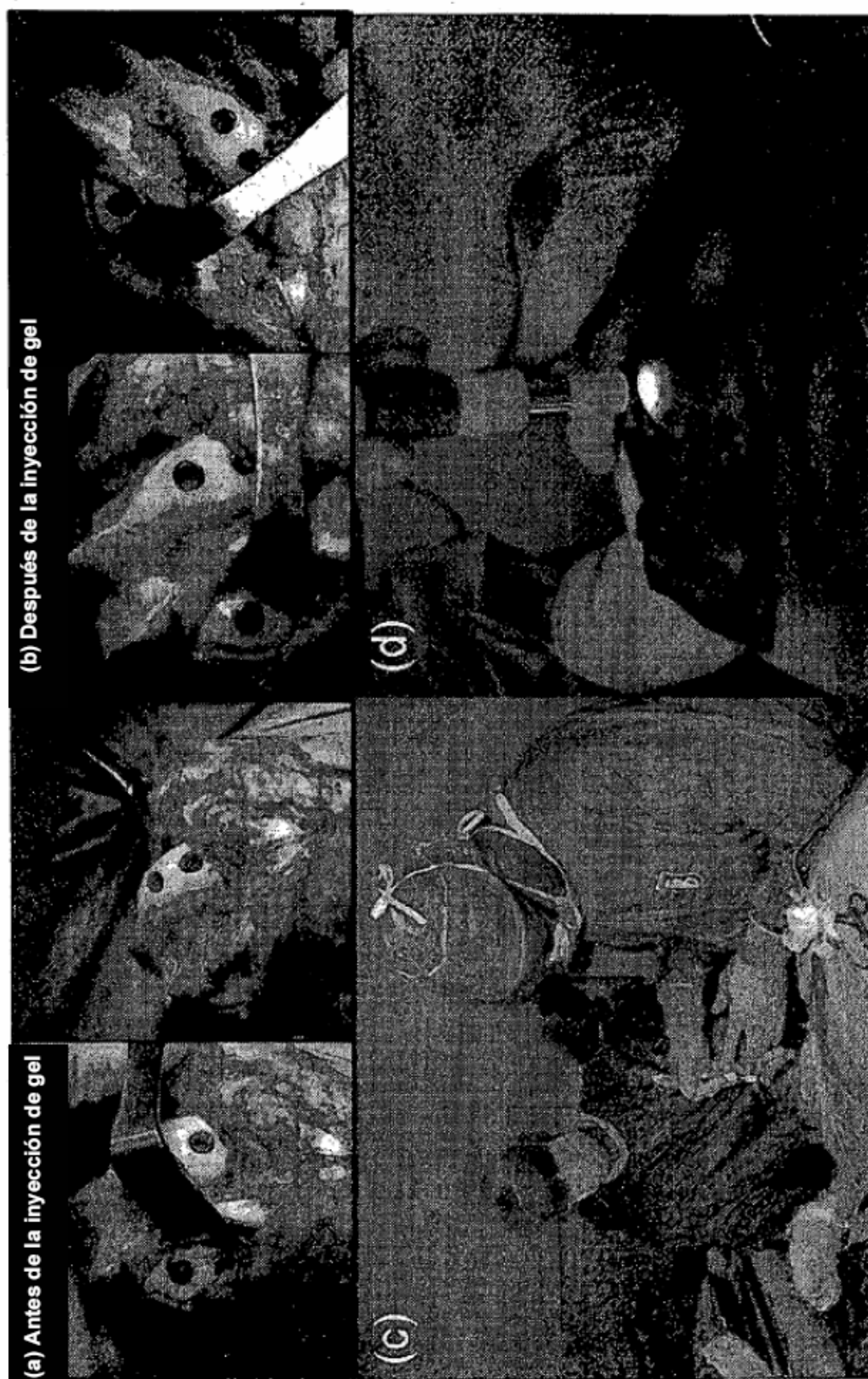


Fig. 12a-d



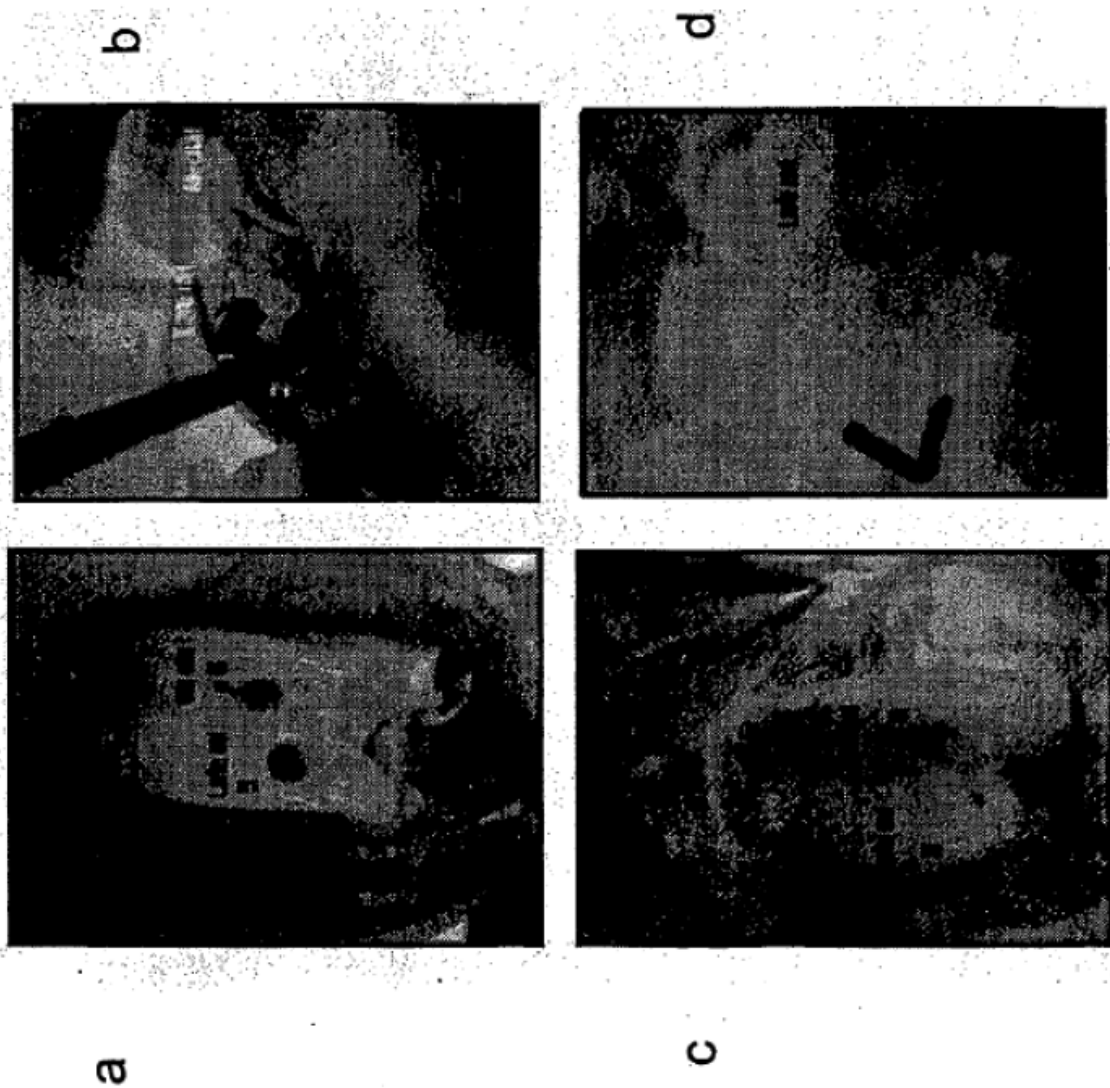


Fig. 13a-d

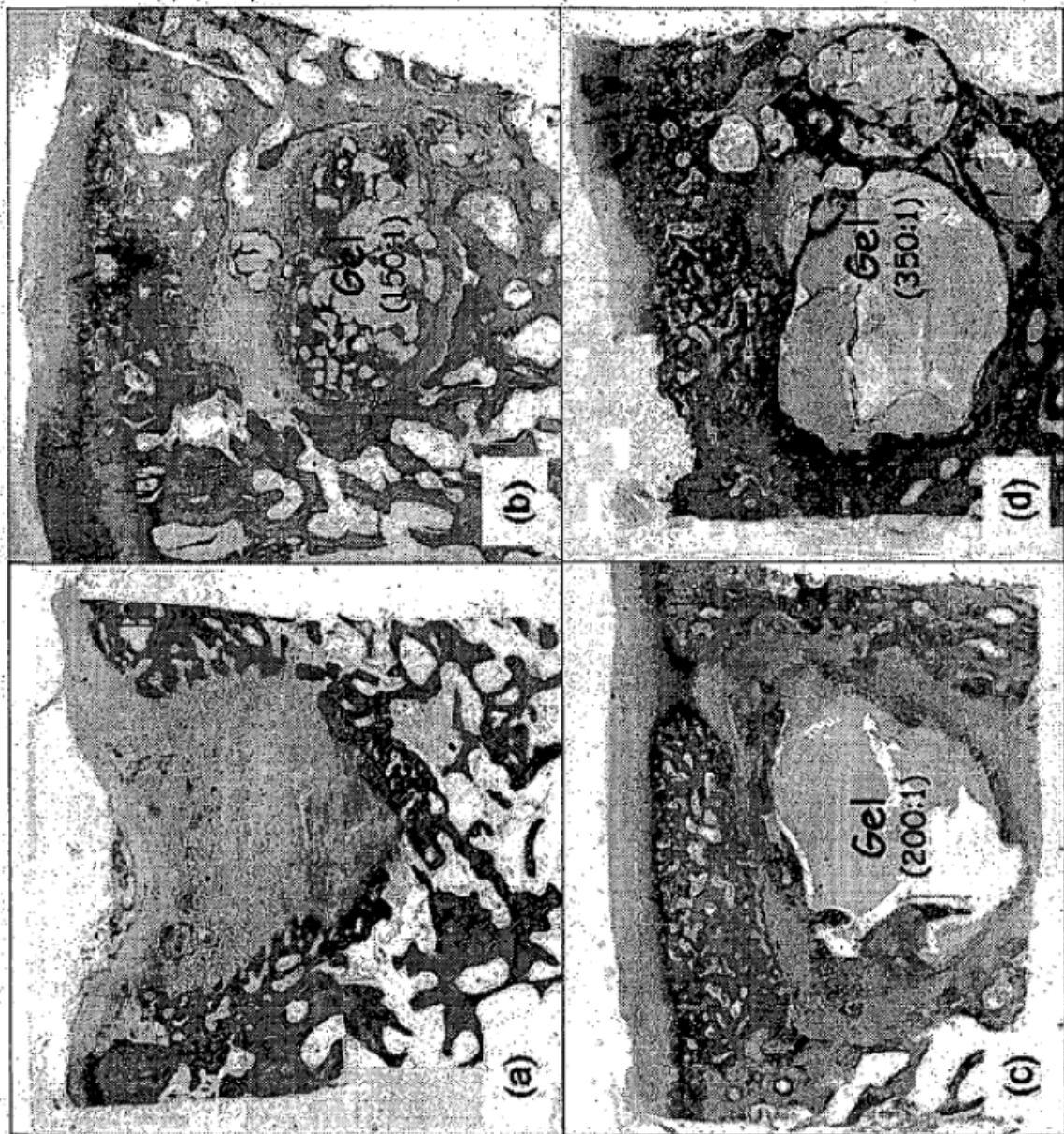


Fig. 14a-d

Figura 15b

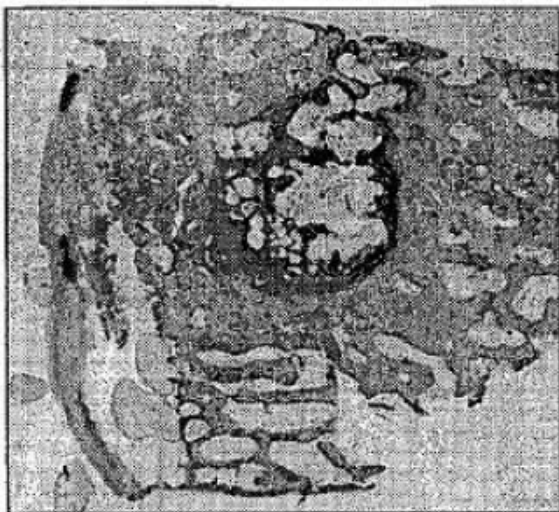


Figura 15d

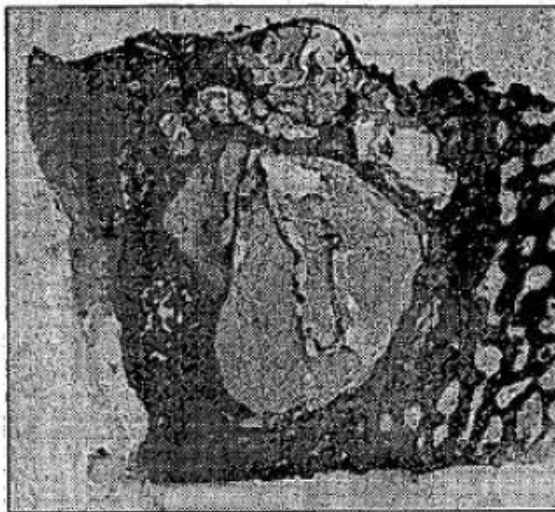


Figura 15a

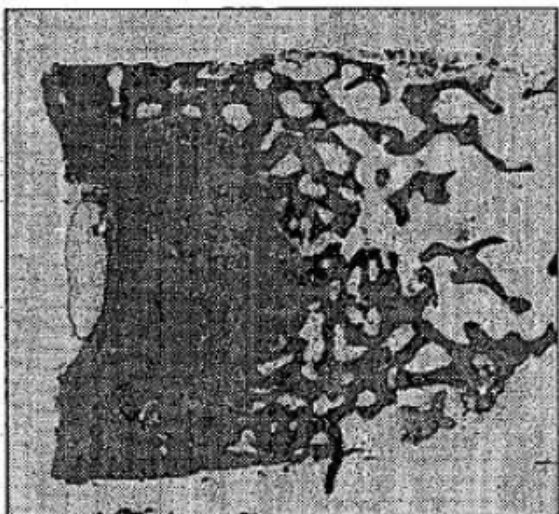


Figura 15c

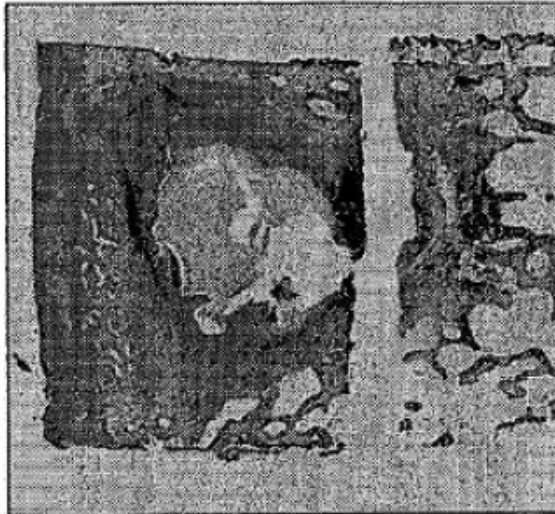


Figura 16b

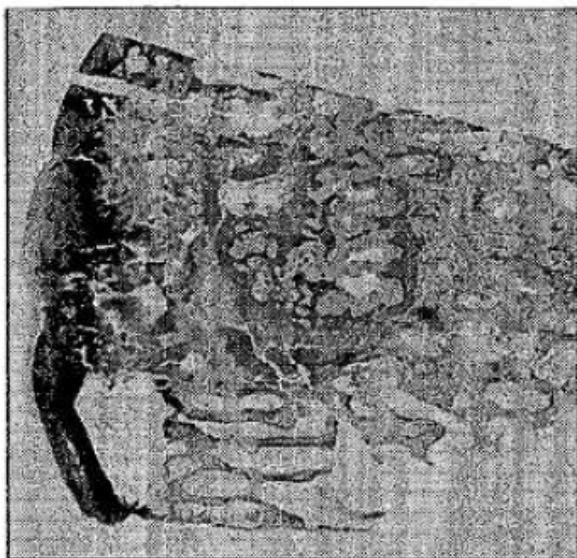


Figura 16d

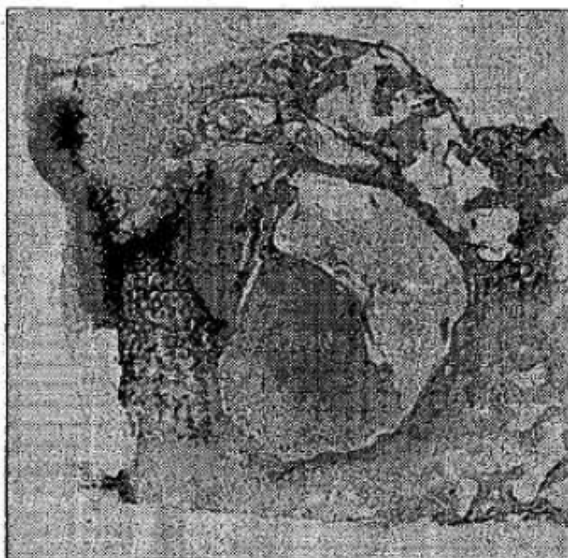


Figura 16a

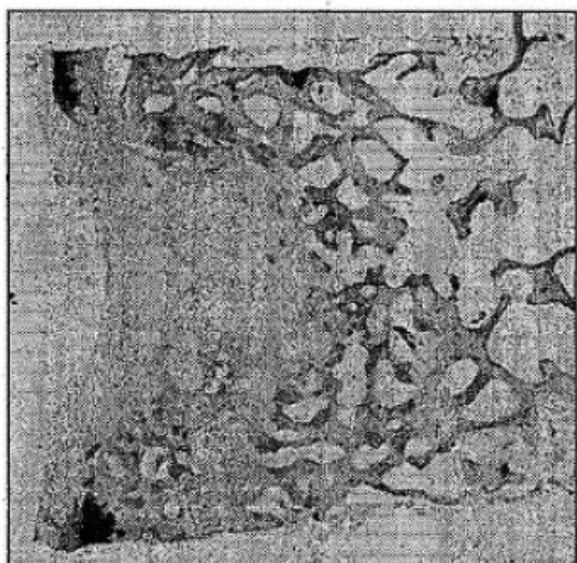


Figura 16c



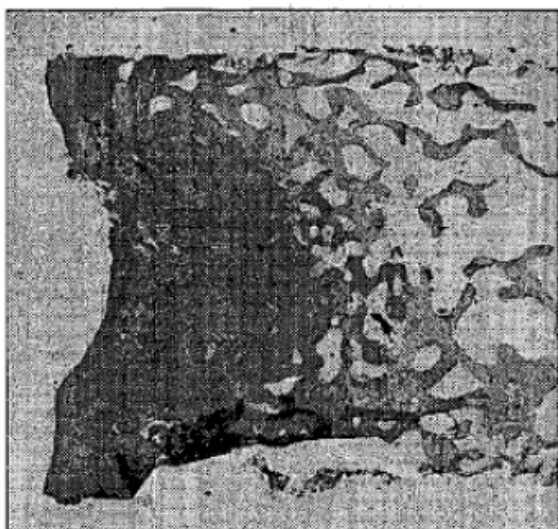


Figura 17a

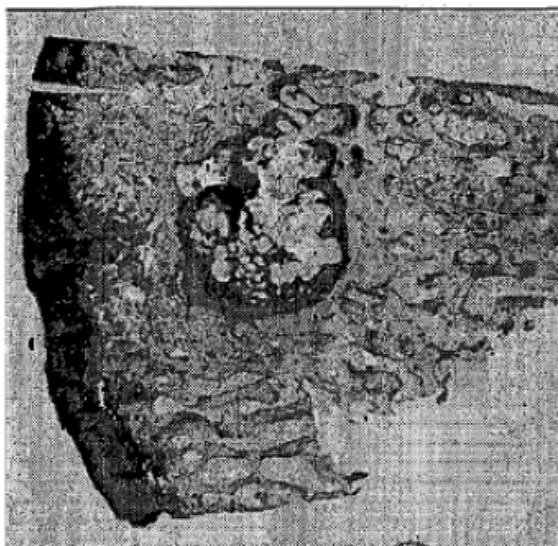


Figura 17b

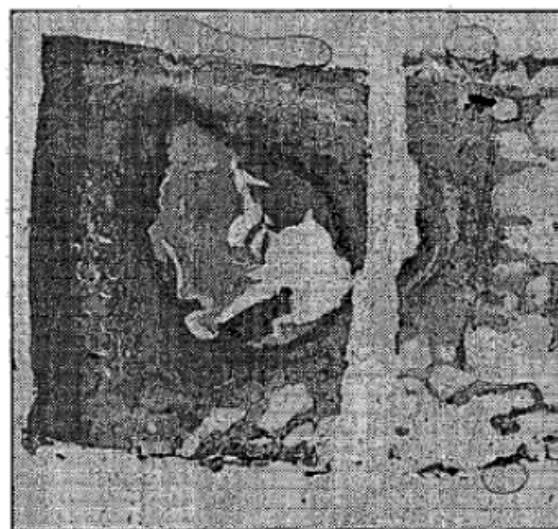


Figura 17c

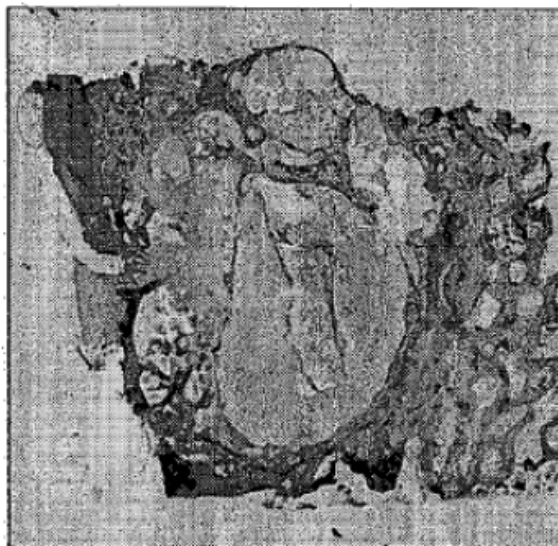


Figura 17d

Figura 18b



Figura 18a



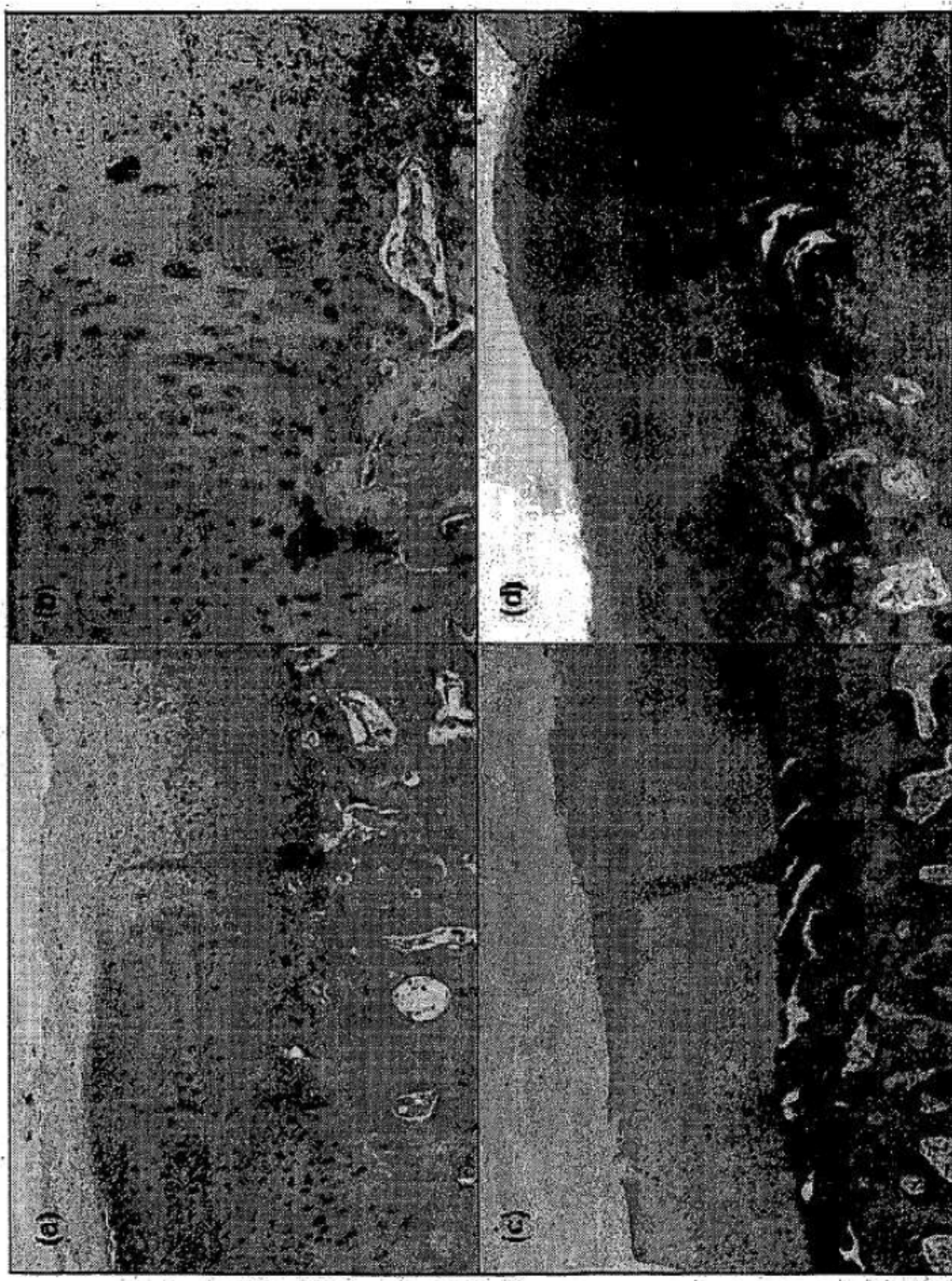


Fig. 19a-d

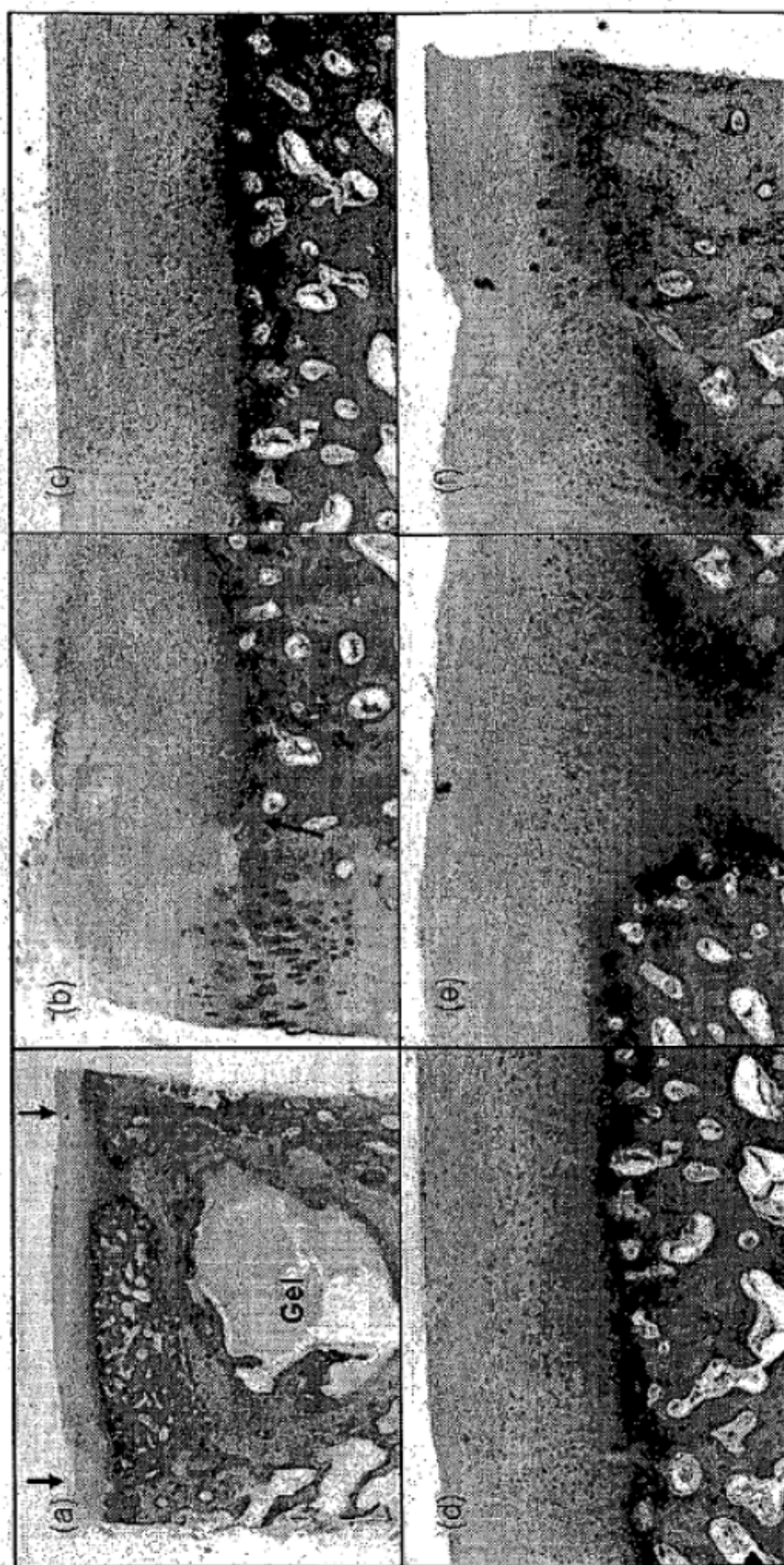


Fig. 20a-f

Fig. 21a-c

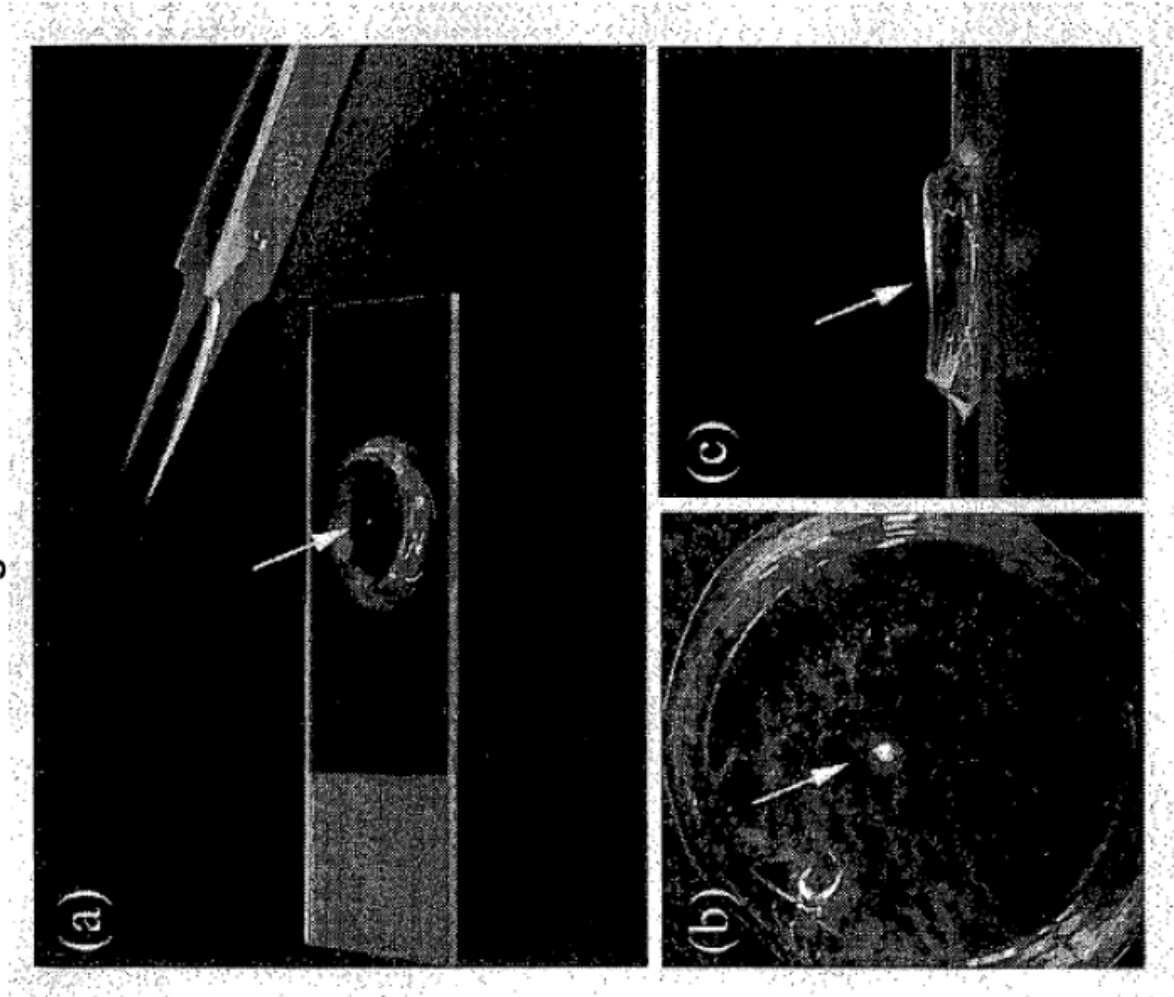


Fig. 22a-d

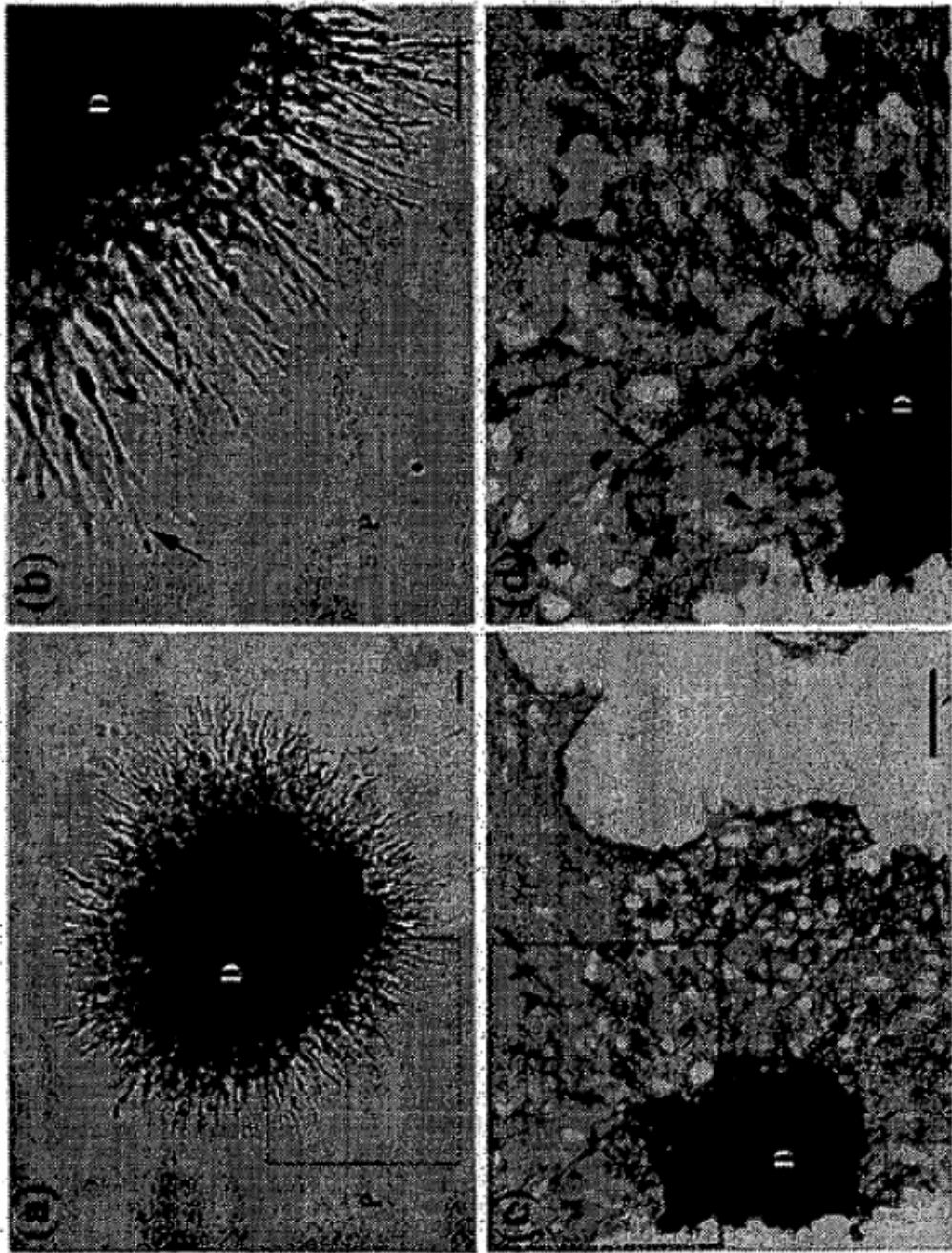


Fig. 23a-f

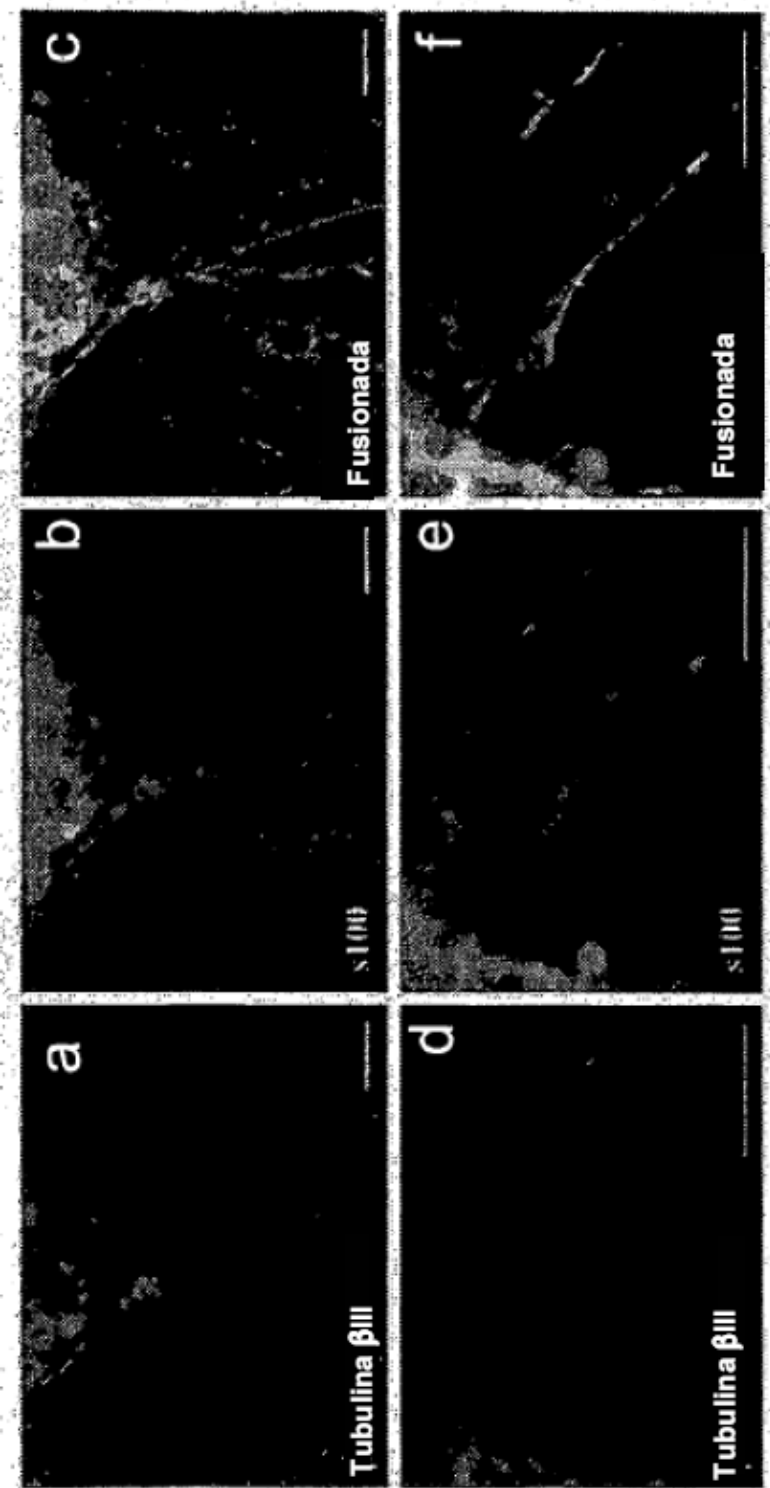


Fig. 24a-d

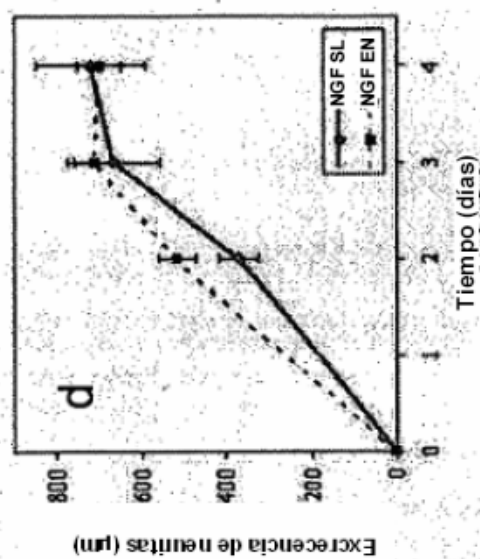
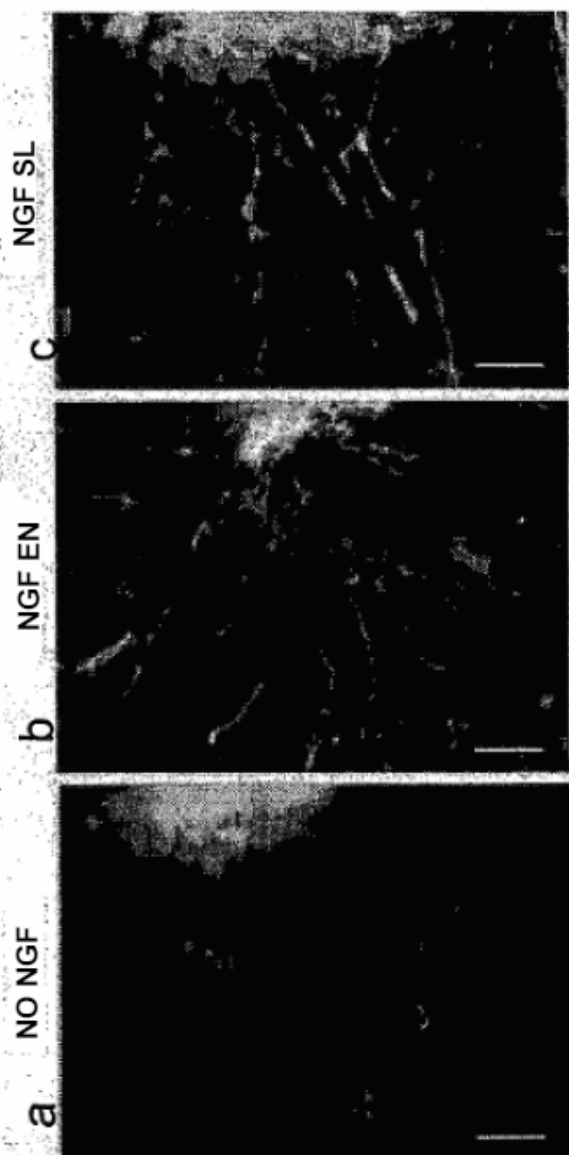


Fig. 25a-u

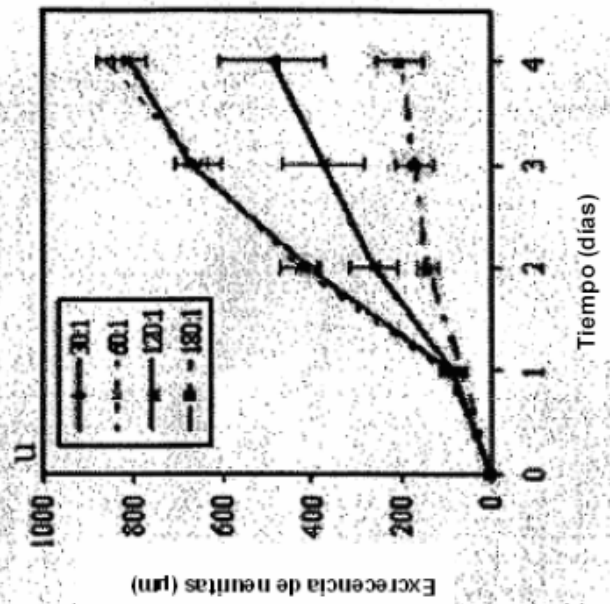
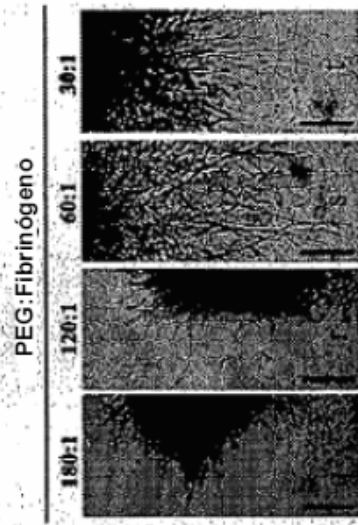
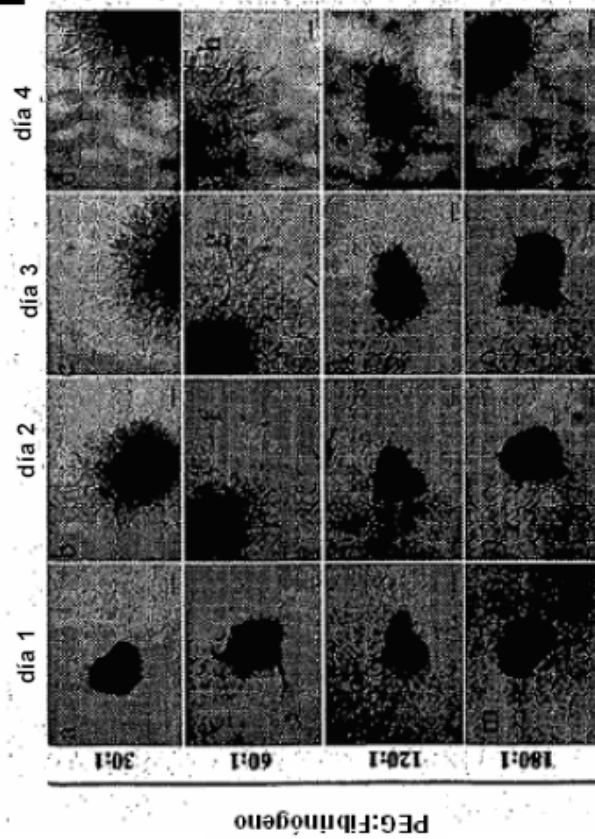


Fig. 26a-c

