

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 507**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/12** (2006.01)  
**A61K 38/18** (2006.01)  
**A61K 38/36** (2006.01)  
**A61L 27/22** (2006.01)  
**A61L 27/48** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**C12N 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2010 E 10803152 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2513294**

54 Título: **Armazones formados de conjugados de polímero-proteína, métodos de generación de los mismos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**16.12.2009 US 282104 P**

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

**08.06.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SELIKTAR, DROR y  
SHACHAF, YONATAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 573 507 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

Armazones formados de conjugados de polímero-proteína, métodos de generación de los mismos y usos de los mismos

5 Campo y antecedentes de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a conjugados de polímero-proteína y, más particularmente, pero no exclusivamente, a conjugados de polímero-proteína que forman un armazón, a procesos de generación de los mismos y a usos de los mismos, por ejemplo, en ingeniería de tejidos.

A medida que evoluciona el campo de la ingeniería de tejidos existe la necesidad de nuevos armazones de biomaterial que puedan proporcionar más de solo un soporte arquitectónico y mecánico. Estando siendo desarrollados nuevos materiales "híbridos" como armazones sofisticados en los que polímeros biológicos tales como alginato, colágeno o fibrinógeno se combinan con polímeros sintéticos para proporcionar versatilidad y bioactividad añadidas en la interfase material/célula. A partir de la perspectiva de las interacciones celulares, los dominios biológicos del material híbrido pueden participar activamente en estimular las células hacia la formación de tejidos funcionales. Las señales bioactivas están controladas mediante macromoléculas biológicas tales como segmentos de proteína [Cutler y Garcia, *Biomaterials* 2003, 24:1759-1770], factores de crecimiento [Seliktar et al., *J Biomed Mater Res A* 2004, 68:704-716; Zisch et al., *FASEB J* 2003;17:2260-2262; DeLong et al., *Biomaterials* 2005, 26:3227-3234] o péptidos bioactivos cortos [Mann et al., *Biomaterials* 2001, 22:3045-3051; Lutolf et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:5413-5418; Stile y Healy, *Biomacromolecules* 2001, 2:185-194]. Estos elementos son capaces de influir en la migración de células, proliferación y diferenciación guiada [Dikovskiy et al., *Biomaterials* 2006, 27:1496-1506]. Desde la perspectiva de las propiedades de los biomateriales, también pueden usarse polímeros "inteligentes" para proporcionar mejor control con respecto a las características voluminosas del armazón en respuesta a cambios en la temperatura, pH o luz [Furth et al., *Biomaterials* 2007, 28:5068-5073; Galaev y Mattiasson, *Trends Biotechnol* 1999, 17:335-340]. Los materiales híbridos preparados con polímeros inteligentes tienen grados adicionales de libertad, que incluyen control con respecto a la densidad aparente, degradabilidad, porosidad y cumplimiento, todos los cuales pueden regularse por el componente de polímero sintético [Peppas et al., *Annu Rev Biomed Eng* 2000, 2:9-29; Tsang y Bhatia, *Adv Drug Deliv Rev* 2004, 56:1635-1647; 3] Baier Leach et al., *Biotechnol Bioeng* 2003, 82:578-589].

Se han preparado materiales híbridos basándose en la conjugación de proteínas endógenas con polímeros sintéticos versátiles [Almany y Seliktar, *Biomaterials* 2005, 26:2467-2477; Gonen-Wadmany et al., *Biomaterials* 2007, 28:3876-3886; Peled et al., *Biomed Mater Res A* 2007, 80:874-884; Seliktar, *Ann N Y Acad Sci* 2005, 1047:386-394]. Se ha investigado el efecto de alternar propiedades estructurales de hidrogeles hechos de poli(etilenglicol) (PEG) conjugado con fibrinógeno sobre la morfología y la remodelación de células de músculo liso encapsuladas [Dikovskiy et al., *Biomaterials* 2006, 27:1496-1506; Dikovskiy et al., *Biophys J* 2008, 94:2914-2925]. Estos materiales presentaron una capacidad para controlar el comportamiento celular cambiando factores tales como la densidad, rigidez y degradabilidad proteolítica mediante el componente sintético versátil. El fibrinógeno es un sustrato natural para la remodelación de tejido que contiene varios dominios de señalización de células, que incluyen un sustrato de degradación de proteasa y motivos de adhesión a célula [Herrick et al., *Int J Biochem Cell Biol* 1999, 31:741-746; Werb, *Cell* 1997, 91:439-442].

45 La solicitud de patente internacional PCT/IL2004/001136 (publicada como WO2005/061018) y la solicitud de patente de EE.UU. N.º 11/472.437 describen un armazón biodegradable compuesto de un esqueleto de proteína (por ejemplo, fibrinógeno) reticulado por un polímero sintético tal como poli(etilenglicol), y métodos de generación de tales armazones a partir de conjugados de polímero-proteína.

50 La solicitud de patente internacional PCT/IL2008/000521 (publicada como WO 2008/126092) describe armazones compuestos de albúmina o colágeno tiolado reticulado por un polímero sintético tal como poli(etilenglicol).

Los polímeros termosensibles inversos son capaces de producir soluciones acuosas de baja viscosidad a temperatura ambiente, y formar un gel a una mayor temperatura. Esta propiedad puede usarse para generar implantes *in situ* [Cohn et al., *Biomacromolecules* 2005, 6:1168-1175].

Stile y Healy [*Biomacromolecules* 2001, 2:185-194] modificaron un polímero inteligente, N-isopropilacrilamida, con péptidos que contienen RGD (Arg-Gly-Asp) para formar un hidrogel termo-sensible reversible con segmentos bioactivos para estudios de cultivo celular. Informaron de que la conjugación de péptidos RGD con el polímero inteligente termo-sensible no comprende la transición sol-gel inducida por la temperatura de los hidrogeles. Adicionalmente informaron de que el péptido RGD conjugado potenció las interacciones biológicas de la red de polímero de N-isopropilacrilamida de otro modo inerte.

65 También se ha informado de polímeros termo-sensibles inversos que tienen una estructura de tribloque de poli(óxido de etileno) (PEO)-poli(óxido de propileno) (PPO)-PEO, denominados "poloxámeros". La transición sol-gel

endotérmica tiene lugar debido a un aumento en la entropía producida por la liberación de moléculas de agua unidas a los segmentos de PPO a medida que aumenta la temperatura [Alexandridis, Colloid Surface A 1995, 96:1-46].

5 El poloxámero Pluronic® F127 es un copolímero de tribloque sintético muy conocido (PEO<sub>99</sub>-PPO<sub>67</sub>-PEO<sub>99</sub>) [Nagarajan y Ganesh, J Colloid Interface Sci 1996, 184:489-499; Sharma y Bhatia, Int J Pharm 2004, 278:361-377; Cohn et al., Biomaterials 2003, 24:3707-3714], que presenta una propiedad de gelación térmica inversa (GTI) por encima de una temperatura crítica en soluciones acuosas. Cohn et al. [Polym Adv Tech 2007;18:731-736] informaron que F127 polimerizado muestra gelación térmica inversa a menores concentraciones y con propiedades mecánicas potenciadas, en comparación con F127.

10 Técnica anterior adicional incluye Halstenberg et al. [Biomacromolecules 2002, 3:710-723], Cohn et al. [Polym Adv Tech 2007;18:731-736] y la patente de EE.UU. N.º 7.842.667.

15 Sumario de la invención

La presente invención se define en su sentido más amplio por las reivindicaciones adjuntas.

20 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un conjugado que comprende una proteína de la matriz extracelular que tiene unida a ella al menos dos restos poliméricos, comprendiendo cada uno de dichos restos un poloxámero.

25 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una composición de materia que comprende una forma reticulada de un conjugado descrito en el presente documento, comprendiendo la forma reticulada una pluralidad de moléculas del conjugado reticuladas entre sí.

30 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un proceso de producción de una composición de materia descrita en el presente documento, comprendiendo el proceso calentar una solución de una pluralidad de moléculas de un conjugado descrito en el presente documento de una primera temperatura a una segunda temperatura, siendo la segunda temperatura de forma que se efectúe una gelación térmica inversa del conjugado en la solución, produciendo así la composición de materia.

35 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un proceso de producción de una composición de materia descrita en el presente documento, comprendiendo el proceso someter una solución que comprende una pluralidad de moléculas de un conjugado descrito en el presente documento, comprendiendo el conjugado al menos un resto de reticulación, a condiciones que efectúan la reticulación covalente de los restos de reticulación, produciendo así la composición de materia.

40 Adicionalmente se describe un proceso de producción de una composición de materia descrita en el presente documento *in vivo*, comprendiendo el proceso:

(a) someter una solución que comprende una pluralidad de moléculas de un conjugado descrito en el presente documento, comprendiendo el conjugado al menos un resto de reticulación, a condiciones que efectúan la reticulación covalente *ex vivo*, para así producir un armazón covalentemente reticulado; y

45 (b) someter el armazón covalentemente reticulado a una temperatura fisiológica *in vivo*, de forma que se efectúe una gelación térmica inversa del armazón *in vivo*, produciendo así la composición de materia.

50 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método de control de una propiedad física de una composición de materia descrita en el presente documento, comprendiendo el método control de un parámetro seleccionado del grupo que consiste en una concentración de un conjugado descrito en el presente documento en solución, una temperatura ambiente, una presencia o ausencia de un iniciador, una dosis de irradiación durante la reticulación covalente, y una temperatura de reticulación.

55 En el presente documento también se desvela un proceso de producción del conjugado descrito en el presente documento, comprendiendo el proceso unir covalentemente un polímero a un polipéptido, siendo el polímero y el polipéptido de forma que al menos dos moléculas de polímero se unan covalentemente a una molécula del polipéptido, en el que al menos una de las dos moléculas de polímero presenta una gelación térmica inversa, produciendo así el conjugado.

60 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un uso de un conjugado descrito en el presente documento o de una composición de materia descrita en el presente documento en la fabricación de un medicamento para reparar daño tisular.

65 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un uso de un conjugado descrito en el presente documento o de una composición de materia descrita en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar un sujeto que tiene un trastorno caracterizado por daño o pérdida tisular.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una composición de materia descrita en el presente documento para su uso en reparar daño tisular *in vivo* induciendo la formación de un tejido *in vivo* y/o induciendo una formación de tejido *ex vivo* e implantar el tejido obtenido y/o la composición de materia que comprende el tejido formado en un sujeto.

5 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención hay un conjugado para su uso en reparar el daño tisular *in vivo* induciendo una formación de tejido *in vivo* y/o induciendo una formación de un tejido *ex vivo* e implantar el tejido obtenido que comprende el tejido formado en un sujeto.

10 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método de inducción de la formación de un tejido *ex vivo*, comprendiendo el método someter una composición de materia que comprende además células en su interior a condiciones propicias para el crecimiento de las células, para así inducir la formación de tejido.

15 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica, cosmética o cosmeceútica que comprende una pluralidad de moléculas de un conjugado descrito en el presente documento, siendo la composición identificada para su uso en inducir la formación de un tejido *in vivo* tras ponerse en contacto con un tejido y adicionalmente tras someter la composición a una temperatura fisiológica.

20 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un kit para inducir la formación de un tejido, comprendiendo el kit:

(a) un conjugado descrito en el presente documento;

(b) un disolvente acuoso; y

25 (c) instrucciones para la reticulación de una solución acuosa del conjugado con el fin de formar un armazón para inducir la formación del tejido.

Según la invención, cada uno de los restos poliméricos presenta una gelación térmica inversa.

30 Según algunas realizaciones de la invención, al menos uno de los restos poliméricos comprende además al menos un resto de reticulación para la reticulación covalente de una pluralidad de moléculas del conjugado entre sí.

Adicionalmente se desvelan conjugados de la fórmula general:

35  $X(-Y-Z)_m)_n$

en la que:

X es un polipéptido descrito en el presente documento;

40 Y es un resto polimérico descrito en el presente documento;

Z es un resto de reticulación descrito en el presente documento;

n es un número entero superior a 1; y

m es 0, 1 o un número entero superior a 1.

45 Según algunos aspectos, el polipéptido comprende una proteína o un fragmento de la misma.

Según la invención, la proteína es una proteína de la matriz extracelular. Proteínas adicionalmente desveladas se seleccionan del grupo que consiste en una proteína de señalización de células, una proteína de adhesión a célula, un factor de crecimiento, proteína A, a proteasa y un sustrato de proteasa.

50 Según la invención, la proteína de la matriz extracelular está seleccionada del grupo que consiste en fibrinógeno, colágeno, fibronectina y elastina.

Según algunas realizaciones de la invención, el polipéptido comprende un fibrinógeno o un fragmento del mismo.

55 Según algunas realizaciones, la proteína se desnatura.

Según algunas realizaciones, el polipéptido es un fibrinógeno desnaturado.

60 Según la invención, al menos dos de los restos poliméricos comprenden un poloxámero (copolímero de poli(óxido de etileno-óxido de propileno)).

Según la invención, cada uno de los restos poliméricos comprende un poloxámero.

65 Según algunas realizaciones de la invención, el poloxámero es el poloxámero F127.

Según algunas realizaciones de la invención, al menos uno de los restos poliméricos comprende el polímero T1307. Según algunas realizaciones de la invención, los restos poliméricos están seleccionados del grupo que consiste en un polímero Pluronic® y un polímero Tetronic®.

5 Según algunas realizaciones de la invención, cada uno de los restos poliméricos comprende de 1 a 10 de los restos de reticulación.

Según algunas realizaciones de la invención, el resto de reticulación comprende un grupo polimerizable.

10 Según algunas realizaciones de la invención, el grupo polimerizable es polimerizable por polimerización por radicales libres.

Según algunas realizaciones de la invención, el grupo polimerizable está seleccionado del grupo que consiste en un acrilato, un metacrilato, una acrilamida, una metacrilamida y una vinilsulfona.

15 Según algunas realizaciones de la invención, el polipéptido es fibrinógeno desnaturalizado y los restos poliméricos comprenden el poloxámero F127.

20 Según algunas realizaciones de la invención, el conjugado comprende restos diacrilato del poloxámero F127, en el que un grupo acrilato de cada uno de los restos diacrilato del poloxámero F127 está unido a un residuo de cisteína del fibrinógeno.

Según algunas realizaciones de la invención, el polipéptido es fibrinógeno desnaturalizado y los restos poliméricos comprenden el polímero T1307.

25 Según algunas realizaciones de la invención, el conjugado comprende restos tetra-acrilato de T1307, en el que un grupo acrilato de cada uno de los restos tetra-acrilato de T1307 está unido a un residuo de cisteína del fibrinógeno.

30 Según algunas realizaciones de la invención, el conjugado se caracteriza por una capacidad de someterse a gelación térmica inversa en una solución acuosa.

Según algunas realizaciones de la invención, la gelación térmica inversa se efectúa a una concentración inferior al 10 por ciento en peso del conjugado en la solución acuosa.

35 Según algunas realizaciones de la invención, la gelación térmica inversa del conjugado aumenta un módulo de almacenamiento al cizallamiento de la solución acuosa al menos diez veces.

Según algunas realizaciones de la invención, la gelación térmica inversa aumenta un módulo de almacenamiento al cizallamiento de la solución acuosa a al menos 20 Pa.

40 Según algunas realizaciones de la invención, la gelación térmica inversa aumenta un módulo de almacenamiento al cizallamiento de la solución acuosa de menos de 2 Pa a al menos 20 Pa.

45 Según algunas realizaciones de la invención, la gelación térmica inversa se produce tras un aumento de la temperatura de 10 °C a 55 °C.

Según algunas realizaciones de la invención, la gelación térmica inversa es reversible.

Según algunas realizaciones de la invención, la gelación térmica inversa forma un gel biodegradable.

50 Según algunas realizaciones de la invención, el conjugado se identifica para su uso en generar un armazón.

Según algunas realizaciones de la invención, el conjugado se identifica para su uso en generar reversiblemente un armazón.

55 Según algunas realizaciones de la invención, el armazón es un hidrogel.

Según algunas realizaciones de la invención, el hidrogel se caracteriza por un módulo de almacenamiento al cizallamiento de al menos 15 Pa a una temperatura de 37 °C.

60 Según algunas realizaciones de la invención, el hidrogel es capaz de experimentar una gelación térmica inversa.

Según algunas realizaciones de la invención, la composición de materia es un hidrogel.

65 Según algunas realizaciones de la invención, la composición de materia se genera por una gelación térmica inversa de la pluralidad de moléculas del conjugado en una solución acuosa.

Según algunas realizaciones de la invención, la pluralidad de moléculas del conjugado se reticulan no covalentemente entre sí.

5 Según algunas realizaciones de la invención, la forma reticulada del conjugado es reversible.

Según algunas realizaciones de la invención, al menos uno de los restos poliméricos comprende un resto de reticulación, y la pluralidad de moléculas del conjugado se reticulan covalentemente entre sí.

10 Según algunas realizaciones de la invención, la composición de materia se genera sometiendo una pluralidad de moléculas del conjugado a condiciones para efectuar la reticulación de los restos de reticulación.

Según algunas realizaciones de la invención, la composición de materia se caracteriza por un módulo de almacenamiento al cizallamiento de al menos 20 Pa a una temperatura de 37 °C.

15 Según algunas realizaciones de la invención, la composición de materia es capaz de experimentar una gelación térmica inversa.

20 Según algunas realizaciones de la invención, la gelación térmica inversa de la composición de materia aumenta un módulo de almacenamiento al cizallamiento de la composición de materia al menos el 200 %.

Según algunas realizaciones de la invención, la gelación térmica inversa de la composición de materia aumenta un módulo de almacenamiento al cizallamiento de la composición de materia a al menos 15 Pa.

25 Según algunas realizaciones de la invención, la gelación térmica inversa de la composición de materia aumenta un módulo de almacenamiento al cizallamiento de la composición de materia de un primer valor en un intervalo de 0,5 Pa a 200 Pa a un segundo valor que es al menos el 20 % superior al primer valor.

30 Según algunas realizaciones de la invención, la gelación térmica inversa de la composición de materia aumenta un módulo de almacenamiento al cizallamiento de la composición de materia de un primer valor a un segundo valor en un intervalo de 20 Pa a 5000 Pa, siendo el segundo valor al menos el 20 % superior al primer valor.

Según algunas realizaciones de la invención, la gelación térmica inversa de la composición de materia se produce tras un aumento de la temperatura de 10 °C a 55 °C.

35 Según algunas realizaciones de la invención, la gelación térmica inversa de la composición de materia es reversible.

40 Según algunas realizaciones de la invención, la composición de materia se caracteriza por un módulo de almacenamiento al cizallamiento de una porción de la composición de materia que es diferente de un módulo de almacenamiento al cizallamiento de al menos otra porción de la composición de materia.

Según algunas realizaciones de la invención, la composición de materia es biodegradable.

45 Según algunas realizaciones de la invención, la composición de materia comprende además células en su interior.

Según algunas realizaciones de la invención, la composición de materia se identifica para su uso en inducir una formación de un tejido.

50 Según algunas realizaciones de la invención, la composición de materia se identifica para su uso en reparar daño tisular.

Según algunas realizaciones de la invención, la composición de materia se produce *in vivo*.

55 Según algunas realizaciones de la invención, la segunda temperatura anteriormente mencionada es una temperatura fisiológica.

Según algunas realizaciones de la invención, el conjugado comprende al menos un resto polimérico que comprende además al menos un resto de reticulación, y el proceso comprende además someter la solución a condiciones que efectúan la reticulación de los restos de reticulación.

60 Según algunas realizaciones de la invención, someter la solución a las condiciones que efectúan la reticulación se efectúa antes del calentamiento.

65 Según algunas realizaciones de la invención, someter la solución a las condiciones que efectúan la reticulación se efectúa posterior al calentamiento.

Según algunas realizaciones de la invención, la reticulación covalente se efectúa *in vivo*.

Según algunas realizaciones de la invención, la reticulación covalente se efectúa *ex vivo*, para así producir un armazón covalentemente reticulado, y el proceso comprende además someter el armazón covalentemente reticulado a una temperatura fisiológica *in vivo*, de forma que una gelación térmica inversa del armazón se efectúa *in vivo*, produciendo así una composición de materia descrita en el presente documento.

Según algunas realizaciones de la invención, las condiciones comprenden irradiación.

Según algunas realizaciones de la invención, las condiciones comprenden una presencia de un iniciador de radicales libres.

Según algunas realizaciones de la invención, la solución comprende además células, y el proceso es para producir una composición de materia que comprende células incorporadas en su interior.

Según algunas realizaciones de la invención, el conjugado comprende al menos un resto de reticulación, y el método comprende además reticular covalentemente la pluralidad de moléculas del conjugado.

Según algunas realizaciones de la invención, la reticulación se efectúa sometiendo la pluralidad de moléculas del conjugado a condiciones que efectúan la reticulación covalente del resto de reticulación.

Según algunas realizaciones de la invención, el conjugado comprende al menos un resto de reticulación, y la composición descrita en el presente documento se identifica para su uso en inducir la formación de un tejido tras someter adicionalmente la pluralidad de moléculas del conjugado a condiciones que efectúan la reticulación covalente del resto de reticulación.

Según algunas realizaciones de la invención, una composición farmacéutica, cosmética o cosmeceútica descrita en el presente documento comprende además un iniciador para inducir la reticulación covalente del resto de reticulación.

Según algunas realizaciones de la invención, una composición farmacéutica, cosmética o cosmeceútica descrita en el presente documento se envasa en un material de envasado y se identifica impreso, en o sobre el material de envasado, para su uso en inducir la formación del tejido.

Según algunas realizaciones de la invención, el conjugado comprende al menos un resto de reticulación, y el kit comprende además un iniciador para inducir la reticulación covalente del resto de reticulación.

Según algunas realizaciones de la invención, el kit comprende además células para incorporar en el armazón descrito en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

Algunas realizaciones de la invención se describen en el presente documento, a modo de ejemplo solo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se acentúa que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y para fines de discusión ilustrativa de realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para aquellos expertos en la materia cómo pueden ponerse en práctica las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

Las FIGs. 1A y 1B son esquemas que muestran la síntesis de diacrilato del poloxámero F127 (FIG. 1A) a partir del poloxámero F127 y cloruro de acrilóilo en una mezcla 1:2 de diclorometano (DCM) y tolueno con trietilamina ((Et)<sub>3</sub>N) a temperatura ambiente (T.A.), y la síntesis de un conjugado de poloxámero F127-fibrinógeno (FF127) usando el diacrilato del poloxámero (FIG. 1B) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con urea 8 M, según algunas realizaciones de la invención;

la FIG. 2 presenta representaciones comparativas que muestran el módulo de almacenamiento (G') de soluciones de FF127 a concentraciones de fibrinógeno de 4, 6 y 8 mg/ml, en función de la temperatura; el gráfico añadido muestra el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') de una solución FF127 con 8 mg/ml de fibrinógeno;

las FIGs. 3A y 3B presentan gráficos que muestran los módulos de almacenamiento de soluciones de FF127 con (FIG. 3B) y sin (FIG. 3A) reticulación química (covalente) de FF127 en función del tiempo con cambios de temperatura cíclicos entre 15 °C y 37 °C, en presencia de 0, 1 o 0,01 mg/ml de colagenasa, y en ausencia de colagenasa;

la FIG. 4 es una ilustración esquemática de polipéptidos de fibrinógeno (rojo, verde y azul) conjugados con un polímero (negro) y ensamblaje de hidrogel según algunas realizaciones de la invención por reticulación reversible (no covalente) del polímero en una manera dependiente de la temperatura o reticulación (covalente) inducida por UV irreversible;

la FIG. 5 es una gráfica que muestra un aumento reversible en el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) de una solución de FF127 aumentando la temperatura ambiente ( $T_{amb}$ ) y un posterior aumento inducido por UV irreversible posterior del módulo de almacenamiento;

la FIG. 6 presenta representaciones comparativas que muestran el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) de un FF127 químicamente (covalentemente) reticulado a concentraciones de fibrinógeno de 4, 6 y 8 mg/ml, en función de la temperatura; el gráfico añadido muestra el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y el módulo de pérdida ( $G''$ ) de un FF127 químicamente (covalentemente) reticulado con 8 mg/ml de fibrinógeno;

las FIGs. 7A y 7B presentan gráficos que muestran el efecto de la tensión oscilante y los cambios de temperatura sobre el módulo de almacenamiento ( $G'$ ; FIG. 7A) y el módulo de pérdida ( $G''$ ; FIG. 7B) de hidrogeles de 8 mg/ml de FF127 con (línea negra) y sin (línea de puntos) reticulación química (covalente) (las temperaturas fueron en ciclos entre 37 °C (líneas rojas) y 15 °C (líneas azules) a una tasa de 1 °C/segundo; la frecuencia de oscilación fue 1 Hz; la deformación fue del 2 %);

la FIG. 8 presenta una gráfica que muestra el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) de hidrogeles de FF127 (8 mg/ml de fibrinógeno) reticulados (covalentemente) por aplicación de luz UV a diferentes temperaturas de reticulación ( $T_{ret}$ ), tras la exposición a temperaturas ambiente ( $T_{amb}$ ) (antes  $T_{amb} = 37$  °C,  $T_{amb} = T_{ret}$ );

la FIG. 9 es un gráfico de barras que muestra la relación de hinchamiento de hidrogeles de FF127 (6 mg/ml de fibrinógeno) formados con temperaturas de reticulación ( $T_{ret}$ ) de 21 °C o 37 °C y un hidrogel formado a partir de conjugados de PEG de 12 kDa-fibrinógeno reticulados (PF12kDa), a temperaturas ambiente ( $T_{amb}$ ) de 4 °C y 37 °C;

las FIGs. 10A y 10B son imágenes que muestran los diámetros (marcados por círculos negros) de hidrogeles de FF127 (6 mg/ml de fibrinógeno) químicamente (covalentemente) reticulados a una temperatura de 21 °C (FIG. 10A) o 37 °C (FIG. 10B), y luego sometidos a temperaturas ambiente de 37 °C; las imágenes a la izquierda muestran los hidrogeles a la temperatura de reticulación inmediatamente después de la reticulación química, y las imágenes a la derecha muestran los hidrogeles químicamente (covalentemente) reticulados después de incubación a 37 °C;

la FIG. 11 presenta representaciones comparativas que muestran la degradación en solución de tripsina de hidrogeles formados por reticulación de FF127 o conjugado de PEG de 12 kDa-fibrinógeno (PF12) a una temperatura de reticulación ( $T_{ret}$ ) de 21 °C o 37 °C (se indican los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y semividas de degradación ( $t_{50}$ ) de los hidrogeles);

la FIG. 12 es un gráfico de barras que muestra el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) de hidrogeles formados por reticulación de FF127 (a una temperatura de reticulación ( $T_{ret}$ ) de 21 °C o 37 °C), conjugado de PEG de 12 kDa-fibrinógeno (PF12kDa) o diacrilato de F127 (F127-DA), a una temperatura ambiente ( $T_{amb}$ ) de 37 °C;

las FIGs. 13A y 13B son esquemas que ilustran la síntesis (FIG. 13A) de un conjugado de T1307-fibrinopéptido (FT-1307) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con urea 8 M a temperatura ambiente (T.A.), y la estructura del conjugado (FIG. 13B), según algunas realizaciones de la invención;

las FIGs. 14A y 14B presentan representaciones comparativas (FIG. 14A) y un gráfico de barras (FIG. 14B) que muestra el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) de hidrogeles FT-1307 (6 mg/ml de fibrinógeno) reticulados a una temperatura ( $T_{ret}$ ) de 4 °C, 21 °C o 37 °C, en función de la temperatura ambiente (FIG. 14A), y como media  $\pm$  EEM de 4 muestras a una temperatura ambiente de 37 °C (FIG. 14B);

la FIG. 15 es un gráfico de barras que muestra la relación de hinchamiento ( $Q_M$ ) de hidrogeles de FT1307 (6 mg/ml de fibrinógeno) reticulados a una temperatura ( $T_{ret}$ ) de 4 °C, 21 °C o 37 °C, a una temperatura ambiente ( $T_{amb}$ ) de 4 °C y 37 °C;

la FIG. 16 es un gráfico de barras que muestra la semivida de biodegradación ( $T_{1/2}$ ) en solución de tripsina de hidrogeles de FT1307 (6 mg/ml de fibrinógeno) reticulados a una temperatura ( $T_{ret}$ ) de 4 °C, 21 °C o 37 °C;

la FIG. 17 presenta imágenes que muestran fibroblastos de prepucio humano sembrados en hidrogeles formados por reticulación de FF127 (a una temperatura de reticulación ( $T_{ret}$ ) de 21 °C o 37 °C), conjugado de PEG de 12 kDa-fibrinógeno (PEG-Fib 12kDa), o diacrilato de F127 (F127-DA), 3 y 6 días después de la siembra (barra de escala = 100  $\mu$ m);

la FIG. 18 es una imagen que muestra fibroblastos de prepucio humano sembrados en hidrogeles de FF127 con reticulación (física + química) y sin química (física) de FF127 (a una temperatura de reticulación de 37 °C), 3 y 6 días después de la siembra (barra de escala = 100  $\mu$ m);

la FIG. 19 es una gráfica que muestra la viabilidad de fibroblastos de prepucio humano sembrados durante 0 o 3 días en hidrogeles formados por reticulación de FF127 a una temperatura de reticulación ( $T_{ret}$ ) de 21 °C o 37 °C (se indican los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y las semividas de degradación ( $t_{50}$ ) de los hidrogeles);

las FIGs. 20A y 20B son una imagen (FIG. 20A) y una gráfica (FIG. 20B) que muestran la invasión celular de tejido de músculo liso en hidrogeles formados por reticulación de FF127 (a una temperatura de reticulación ( $T_{ret}$ ) de 21 °C o 37 °C) o conjugado de PEG de 12 kDa-fibrinógeno (PF12kDa), en los días 1, 3 y 5 después de la encapsulación del tejido en el hidrogel; la FIG. 20B muestra la distancia de invasión en función del tiempo (barra de escala = 100  $\mu$ m);

la FIG. 21 es una imagen que muestra fibroblastos de prepucio humano 3 horas, 3 días o 6 días después de sembrarse en hidrogeles FT1307 con módulos de almacenamiento de 52, 244 o 373 Pa (las células viables se tiñen con calceína (verde) y las células no viables se tiñen con etidio (naranja); barra de escala = 100  $\mu$ m);

la FIG. 22 es una imagen que muestra células HeLa 3 horas, 3 días o 6 días después de sembrarse en hidrogeles FT1307 con módulos de almacenamiento de 52, 244 o 373 Pa (las células viables se tiñen con calceína (verde) y las células no viables se tiñen con etidio (naranja); barra de escala = 100  $\mu$ m);

las FIGs. 23A y 23B representan la preparación de una cápsula de FF127 sembrada en células incorporada en un hidrogel de FT1307, según algunas realizaciones de la invención;

las FIGs. 24A y 24B son fotografías que muestran una cápsula de FF127 (6 mg/ml de fibrinógeno) sembrada con fibroblastos de prepucio humano (verde) incorporada durante 6 días en un hidrogel de FT1307 (6 mg/ml de fibrinógeno) que tiene un módulo de almacenamiento de 373 Pa (FIG. 24A) o 52 Pa (FIG. 24B) (barra de escala = 200  $\mu$ m);

5 las FIGs. 25A y 25B son fotografías que muestran una cápsula de FF127 (6 mg/ml de fibrinógeno) sembrada con células HeLa (verde) incorporada durante 6 días en un hidrogel de FT1307 (6 mg/ml de fibrinógeno) que tiene un módulo de almacenamiento de 373 Pa (FIG. 25A) o 52 Pa (FIG. 25B) (barra de escala = 200  $\mu$ m);

10 las FIGs. 26A y 26B son fotografías que muestran cápsulas de FF127 (6 mg/ml de fibrinógeno) sembradas con un co-cultivo de fibroblastos de prepucio humano (teñido de verde) y células HeLa (teñido de rojo) en el día 0 (FIG. 26A) y en el día 5 (FIG. 26B) de ser incorporadas en un hidrogel de FT1307 (6 mg/ml de fibrinógeno) (los círculos discontinuos en la FIG. 26B muestran el diámetro del cultivo celular en el día 0, barra de escala = 200  $\mu$ m); y

15 las FIGs. 27A y 27B son fotografías que muestran cápsulas de FF127 (6 mg/ml de fibrinógeno) sembradas con un co-cultivo de fibroblastos de prepucio humano (teñido de verde) y células HeLa (teñido de rojo) en el día 0 (FIG. 26A) y en el día 5 (FIG. 26B) de ser incorporadas en un hidrogel de FT1307 (6 mg/ml de fibrinógeno) (barra de escala = 200  $\mu$ m).

#### Descripción de realizaciones específicas de la invención

20 La conjugación de un polímero sintético con una proteína natural tal como fibrinógeno proporciona un medio de creación de hidrogeles biocompatibles mientras que controla sus propiedades físicas. La reacción de conjugación pretende dotar a la proteína constituyente de versatilidad estructural adicional, sin comprometer su biocompatibilidad.

25 Los presentes inventores han desvelado previamente una metodología de generación de hidrogeles preparados a partir de un polímero sintético tal como poli(etilenglicol) (PEG) conjugado con fibrinógeno, que permite controlar el comportamiento celular de los hidrogeles formados manipulando factores tales como la densidad, rigidez y degradabilidad proteolítica mediante el componente sintético versátil.

30 En una búsqueda de metodologías para generar hidrogeles con control mejorado de las características del hidrogel, los presentes inventores han diseñado y puesto satisfactoriamente en práctica una metodología de generación de hidrogeles "inteligentes", conjugando con proteínas un polímero sintético que presenta una propiedad de gelación térmica inversa (GTI) por encima de una temperatura crítica en soluciones acuosas.

35 Se encontró que esta metodología producía hidrogeles con un control excepcional de las características físicas de los hidrogeles, ya que permitía manipular estas características seleccionando, por ejemplo, el grado y la naturaleza de las reacciones de reticulación que conducen a la formación de gel. Como no se había descubierto que los conjugados de proteína-polímero presentarían una propiedad de gelación térmica inversa, el grado y la aparición de reticulación no covalente (física) puede controlarse, por lo que pueden seleccionarse condiciones químicas para efectuar la reticulación covalente, si se desea.

40 Así, usando una combinación de reticulación por foto-polimerización y temperatura, se demostró un control excepcional sobre las propiedades físicas de los hidrogeles generados. También se ha demostrado la capacidad de los hidrogeles generados para actuar de una matriz para el crecimiento y la supervivencia de células y tejido (por ejemplo, como armazón).

45 Los presentes inventores han demostrado la novedosa metodología, a la vez que utilizan el poloxámero F127 Pluronic® y el copolímero Tetricon® T1307 (un derivado de poloxámero) que están funcionalizados en los extremos con grupos acrílico y se hacen reaccionar con fibrinógeno desnaturalizado mediante una reacción de adición de tipo Michael para formar un conjugado de proteína-copolímero. Estos conjugados poliméricos a modo de ejemplo podrían reticularse para formar una estructura que comprende múltiples unidades ("unímeros") del conjugado. Se realizaron mediciones reológicas sobre los unímeros funcionalizados y los hidrogeles generados a partir de los mismos con el fin de caracterizar la respuesta física de estos conjugados a estímulos medioambientales (por ejemplo, sensibilidad a la temperatura).

50 Los presentes inventores han descubierto así adicionalmente que los hidrogeles generados retienen la biocompatibilidad de su constituyente de fibrinógeno con la ventaja añadida de precisión potenciada en el control de las propiedades físicas de la red polimérica usando el constituyente F127 sintético.

55 Se mostró que la reacción de conjugación no elimina las propiedades de auto-ensamblaje de F127, sino que las potencia, dotando así a los conjugados de proteína-polímero obtenidos de las propiedades de gelación térmica inversa (GTI). Así, se descubrió que el conjugado de poloxámero-fibrinógeno experimenta sorprendentemente gelación a bajas concentraciones (por ejemplo, inferiores a 20 mg/ml de conjugado), que son considerablemente inferiores a las concentraciones necesarias para la gelación térmica inversa del poloxámero solo. Esto indica que la proteína actúa de sustancia de relleno de las cadenas permitiendo que el conjugado de poloxámero-proteína experimente gelación a estas concentraciones excepcionalmente menores.

La capacidad para obtener hidrogeles a bajas concentraciones de conjugado es ventajosa para aplicaciones tales como regeneración de tejido, debido a que tales hidrogeles son mejor aptos para permitir el crecimiento celular y la migración dentro de un hidrogel.

5 Usando una combinación de reticulación por foto-polimerización y temperatura se demostró un excepcional control sobre las propiedades físicas de los hidrogeles generados. También se ha demostrado la capacidad de los hidrogeles generados para actuar de una matriz para el crecimiento y la supervivencia de células y tejido.

10 Con referencia ahora a los dibujos, las Figuras 1A y 1B ilustran la síntesis de un conjugado de poloxámero F127-fibrinógeno a modo de ejemplo.

15 La Figura 2 muestra la gelación del conjugado por un aumento de la temperatura (es decir, gelación térmica inversa) a diversas concentraciones, que incluye a concentraciones de conjugado inferiores a 20 mg/ml. Tales concentraciones son inferiores a las concentraciones que permiten la gelación térmica inversa del poloxámero F127 solo, que indica que la conjugación con el fibrinógeno potenció las propiedades de GTI del poloxámero actuando como sustancia de relleno de cadenas.

20 Las Figuras 3A y 3B muestran que la gelación térmica inversa del conjugado es reversible, de forma que la gelación puede inducirse e invertirse repetidamente, incluso después de haberse reticulado covalentemente el conjugado (Figura 3B). La Figura 6 muestra la gelación térmica inversa del conjugado covalentemente reticulado a diversas concentraciones.

25 La Figura 4 ilustra dos tipos de reticulación que las moléculas del conjugado pueden experimentar para formar un hidrogel; una reticulación dependiente de la temperatura reversible de moléculas conjugadas (por gelación térmica inversa), y una reticulación irreversible inducida por luz UV. La Figura 5 muestra aumentos en el módulo de almacenamiento al cizallamiento resultante de tanto reticulación reversible como irreversible de moléculas de conjugado.

30 Las Figuras 7A y 7B muestran los diferentes comportamientos de hidrogeles covalentemente reticulados y no covalentemente reticulados a modo de ejemplo en respuesta a la tensión. Las Figuras 7A y 7B también muestran que, después de colapsar en respuesta a la tensión, ambos tipos de hidrogel se recuperan completamente después de reducir y aumentar la temperatura, de manera que anulan y recuperan la gelación térmica inversa.

35 Las Figuras 8 y 12 muestran que el módulo de almacenamiento al cizallamiento de hidrogeles covalentemente reticulados a modo de ejemplo depende fuertemente de la temperatura a la que el conjugado se reticula covalentemente. La Figura 11 muestra que el efecto de la temperatura de reticulación sobre la biodegradabilidad es considerablemente más débil, y que la biodegradabilidad está afectada más por el tipo de polímero conjugado con la proteína.

40 Las Figuras 9-10B muestran que las propiedades de hinchamiento de hidrogeles de poloxámero-fibrinógeno covalentemente reticulados son dependientes de la temperatura (a diferencia de los hidrogeles de PEG-fibrinógeno reticulados), y que el grado de dependencia de la temperatura está afectado por la temperatura de reticulación.

45 Las Figuras 13A y 13B ilustran la síntesis de un conjugado de T1307-fibrinógeno a modo de ejemplo, en la que cada resto T1307 en el conjugado comprende tres restos de reticulación de acrilato.

50 Las Figuras 14A y 14B muestran que el módulo de almacenamiento al cizallamiento de hidrogeles de T1307-fibrinógeno covalentemente reticulados depende fuertemente de la temperatura a la que el conjugado se reticula covalentemente. La Figura 15 muestra que las propiedades de hinchamiento de hidrogeles de T1307-fibrinógeno covalentemente reticulados son dependientes de la temperatura, y que el grado de dependencia de la temperatura está afectado por la temperatura de reticulación. La Figura 16 muestra que la biodegradabilidad no se correlaciona claramente con la temperatura de reticulación.

55 Los resultados presentados en las Figuras 14A-16 indican que las propiedades de hidrogeles que contienen T1307 son similares a aquellas de hidrogeles que contienen el poloxámero F127.

60 Las Figuras 17-22 y 24A-27B muestran que hidrogeles a modo de ejemplo pueden servir de matrices para el crecimiento celular e invasión, y que la tasa y tipo de crecimiento e invasión celular depende de la temperatura de reticulación covalente de los hidrogeles. Las Figuras 26A-27B muestran los efectos de diferentes propiedades de hidrogeles sobre el crecimiento celular en un co-cultivo de diferentes tipos de células.

Las Figuras 23A y 23B ilustran un proceso a modo de ejemplo para preparar una cápsula de hidrogel con un conjunto de propiedades físicas, incorporada dentro de un hidrogel con un conjunto diferente de propiedades físicas.

65 Así, se ha demostrado que los conjugados de polímero-fibrinógeno según realizaciones a modo de ejemplo de la invención pueden reticularse fácilmente para formar armazones de hidrogel. Además, puede combinarse fácilmente la reticulación no covalente y covalente. Los hidrogeles presentan alta flexibilidad, biodegradabilidad, buena

biofuncionalidad y soporte para la diseminación e invasión de células, y un módulo de almacenamiento al cizallamiento que puede controlarse fácilmente por diversos parámetros. La temperatura a la que se realiza la reticulación covalente fue particularmente útil para controlar el módulo de almacenamiento al cizallamiento, ya que tiene relativamente poco efecto sobre otras propiedades, tales como la biodegradabilidad.

5 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un conjugado que comprende un polipéptido que tiene unida a él al menos dos restos poliméricos, comprendiendo al menos de los restos poliméricos un poloxámero en el que dicho polipéptido comprende una proteína de la matriz extracelular. Los restos poliméricos presentan una gelación térmica inversa.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "gelación térmica inversa" describe una propiedad por la cual una sustancia (por ejemplo, una solución acuosa de un compuesto) aumenta en viscosidad tras un aumento en la temperatura. El aumento en la viscosidad puede ser, por ejemplo, conversión de un estado líquido a un estado semisólido (por ejemplo, gel), conversión de un estado líquido a un estado líquido más viscoso, o conversión de un estado semisólido a un estado semisólido más rígido. En el presente documento, todas aquellas conversiones están englobadas por el término "gelación". El aumento en la temperatura que efectúa la gelación puede estar entre dos temperaturas cualesquiera. Opcionalmente, la gelación se efectúa a una temperatura dentro del intervalo de 0 °C a 15 55 °C.

20 En el presente documento, se considera que un resto polimérico presenta una gelación térmica inversa cuando una solución acuosa de un polímero que se corresponde con el resto polimérico (por ejemplo, un polímero no unido al polipéptido anteriormente mencionado) presenta una gelación térmica inversa, como se describe en el presente documento.

25 Una variedad de polímeros presentan una gelación térmica inversa. Cada polímero puede caracterizarse por una temperatura de gelación crítica, en la que la gelación se efectúa a la temperatura de gelación crítica o a temperaturas por encima de la temperatura de gelación crítica.

30 En el presente documento, "temperatura de gelación crítica" se refiere a la temperatura más baja a la que se observa algo de gelación de un material (por ejemplo, por aumento en el módulo de almacenamiento al cizallamiento).

35 El resto polimérico puede seleccionarse para conferir al conjugado que contiene el mismo una gelación térmica inversa que se caracteriza por una temperatura de gelación crítica dentro de un intervalo de temperatura (por ejemplo, en un intervalo de 0 °C a 55 °C) que permite la conveniente manipulación de las propiedades del conjugado por exposición a una temperatura ambiente por encima y/o por debajo de la temperatura de gelación crítica.

40 La temperatura de gelación crítica del polímero puede seleccionarse, por ejemplo, basándose en el uso previsto o propiedades deseadas de un conjugado. Por ejemplo, la temperatura de gelación crítica puede seleccionarse de forma que el conjugado esté en un estado gelificado a una temperatura fisiológica, pero no a temperatura ambiente, de forma que la gelación pueda efectuarse *in vivo*. En otro ejemplo, la temperatura de gelación crítica puede seleccionarse de forma que el conjugado esté en un estado de gelificación a temperatura ambiente, pero no a una temperatura moderadamente más baja, de forma que la gelación pueda efectuarse, por ejemplo, por eliminación de la refrigeración.

45 El resto polimérico comprende opcionalmente un polímero sintético. Los poloxámeros (por ejemplo, poloxámero F127) son polímeros a modo de ejemplo que presentan una gelación térmica inversa a temperaturas.

50 Como se usa en el presente documento y en la materia, un "poloxámero" se refiere a copolímero de bloque de poli(óxido de etileno) (PEO) - poli(óxido de propileno) (PPO) que tiene una estructura PEO-PPO-PEO. Poloxámeros adecuados están comercialmente disponibles, por ejemplo, como los polímeros Pluronic®.

55 Normalmente, la gelación térmica inversa está mediada por la formación de reticulación no covalente (por ejemplo, mediante interacciones hidrófobas, interacciones iónicas y/o enlace de hidrógeno) entre moléculas, en la que el grado de reticulación no covalente aumenta en respuesta a un aumento de temperatura.

60 En el presente documento, reticulación "no covalente" (formada como resultado de una gelación térmica inversa) también se denomina reticulación "física" o "reticulación no química". La reticulación no covalente puede, por tanto, entenderse como una reticulación dependiente de la temperatura.

65 El resto polimérico puede comprender uno o más restos que efectúan reticulación no covalente (por ejemplo, restos hidrófobos). El grado de gelación y las condiciones (por ejemplo, temperatura) bajo las que se efectúa la gelación pueden controlarse opcionalmente por la naturaleza y el número de restos que participan en la reticulación no covalente.

El resto polimérico puede comprender de 1 y hasta 100 e incluso 1000 restos que participan en la reticulación no covalente. En muchas realizaciones, cuanto mayor sea el número de tales restos, y mayores sean los restos (por ejemplo, mayores son los pesos moleculares), a menor temperatura se efectúa la gelación.

5 El resto polimérico puede comprender uno o más tipos de restos que efectúan la reticulación. Estos restos pueden efectuar la reticulación no covalente mediante las mismas interacciones intermoleculares (por ejemplo, interacciones hidrófobas) o mediante diferentes interacciones intermoleculares (por ejemplo, interacciones hidrófobas e iónicas). Los polímeros que presentan gelación térmica inversa (también denominados en la materia polímeros GTI) incluyen, pero no se limitan a, poli(N-isopropilacrilamida), que experimenta gelación térmica inversa a temperaturas por encima de aproximadamente 32-33 °C, además de copolímeros de los mismos (por ejemplo, poli(N-isopropilacrilamida-co-dimetil- $\gamma$ -butirolactona), copolímeros de bloque de poli(etilenglicol)-poli(aminouretano) (PEG-PAU), copolímeros de bloque de poli( $\epsilon$ -caprolactona)-poli(etilenglicol) (PCL-PEG) (por ejemplo, PCL-PEG-PCL), y poli(metil 2-propionamidoacrilato). Además, se han descrito poliorganofosfacenos con PEG y grupos laterales de oligopéptido hidrófobo (que proporcionan interacciones hidrófobas intermoleculares), que gelifican a temperaturas de 15 35-43 °C [Seong et al., Polymer 2005, 46:5075-5081].

Por ejemplo, un resto de poloxámero comprende un resto PPO hidrófobo que media en la gelación. Un resto polimérico puede comprender opcionalmente un resto PPO tal, o alternativamente, una pluralidad (por ejemplo, 2, 3, 4, etc., hasta 100 e incluso 1000 de tales restos) de tales restos.

20 Similarmente, los copolímeros de PCL-PEG comprenden PEG hidrófilo y un resto de poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) relativamente hidrófobo, y los copolímeros de PEG-PAU comprenden PEG hidrófilo y un resto de poli(aminouretano) (PAU) hidrófobo (por ejemplo, un resto de polímero de condensación de bis-1,4-(hidroxietil)piperazina - 1,6-diisocianatohexametileno).

25 Así, en general, pueden prepararse muchos polímeros de bloque que presentan gelación térmica inversa a partir de una combinación de unidades estructurales hidrófilas e hidrófobas.

En algunas realizaciones, cada resto polimérico comprende un poloxámero (por ejemplo, poloxámero F127).

30 Opcionalmente, un resto polimérico comprende un poloxámero.

Alternativamente o adicionalmente, al menos un resto polimérico comprende una pluralidad de restos de poloxámero. Los polímeros que comprenden una pluralidad de restos de poloxámero están comercialmente disponibles, por ejemplo, como polímeros Tetronic®. T1307 (por ejemplo, Tetronic® T1307) es un polímero a modo de ejemplo que comprende cuatro restos de poloxámero.

Según realizaciones opcionales, al menos uno de los restos poliméricos comprende además al menos un resto de reticulación para la reticulación covalente de una pluralidad de moléculas del conjugado entre sí. Opcionalmente, el resto polimérico comprende de 1 a 10, opcionalmente de 1 a 5, y opcionalmente de 1 a 3 restos de reticulación.

45 Debe observarse que la expresión "resto de reticulación" se usa en el presente documento para describir restos que están unidos al resto polimérico (por ejemplo, como grupo terminal o como grupos laterales), o que forman una parte integral del resto polimérico, incluso se diferencia de aquellos restos en el resto polimérico que efectúan la reticulación no covalente, como se describe anteriormente en este documento.

Un "resto de reticulación", como se usa en el presente documento, describe así restos sobre el resto polimérico que efectúan la reticulación covalente, como se define en el presente documento, entre moléculas del conjugado.

50 En el presente documento, "reticulación covalente" (también denominada en el presente documento "reticulación química") se refiere a una formación de un enlace covalente ("reticulación") entre dos o más moléculas (por ejemplo, dos moléculas de conjugado descritas en el presente documento). Una molécula puede unirse a una pluralidad de otras moléculas, estando cada otra molécula unida por un enlace covalente diferente. Así, pueden ligarse juntas una pluralidad de moléculas (por ejemplo, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 50, al menos 100).

55 Un conjugado como se describe pueden opcionalmente representarse por la fórmula general:



60 en la que X es un polipéptido como se describe en el presente documento, Y es un resto polimérico como se describe en el presente documento, Z es un resto de reticulación como se describe en el presente documento, n es un número entero superior a 1 (por ejemplo, 2, 3, 4 y hasta 20), y m representa el número de restos de reticulación por resto polimérico. Así, m es 0 en realizaciones que carecen del resto de reticulación opcional, y m es 1 o un número entero superior a 1, en aspectos que comprenden el resto de reticulación opcional.

65

Debe entenderse que como la fórmula anterior incluye más de un resto -Y-Zm, diferentes restos -Y-Zm en un conjugado puede tener opcionalmente un valor diferente para m.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión “resto de reticulación” se refiere a un resto (por ejemplo, un grupo funcional) caracterizado por una capacidad para efectuar la reticulación covalente con un grupo funcional de otra molécula (por ejemplo, otro conjugado).

10 Según realizaciones opcionales, el resto de reticulación es capaz de efectuar la reticulación con un conjugado similar a y/o idéntico al conjugado descrito en el presente documento (por ejemplo, un conjugado que comprende un resto de reticulación químicamente relacionado con y/o idéntico al resto de reticulación del conjugado descrito en el presente documento).

15 Así, el resto de reticulación descrito en el presente documento proporciona un conjugado con una capacidad para experimentar reticulación covalente, mientras que un resto polimérico que presenta gelación térmica inversa, como se describe en el presente documento, proporciona un conjugado con una capacidad para experimentar reticulación no covalente (auto-ensamblaje). Por tanto, en realizaciones sin un resto de reticulación (por ejemplo, en las que m en la fórmula general es 0), la reticulación del conjugado puede efectuarse únicamente por reticulación no covalente por el resto polimérico, mientras que en realizaciones con un resto de reticulación (por ejemplo, en la que m en la fórmula general es 1 o más), la reticulación del conjugado puede efectuarse por reticulación no covalente y/o por reticulación covalente, como se trata en más detalle en el presente documento.

20 Restos de reticulación a modo de ejemplo que son adecuados para su uso en el contexto de realizaciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, grupos polimerizables, como se detalla adicionalmente en el presente documento más adelante.

25 Así, en algunas realizaciones, el resto de reticulación comprende un grupo polimerizable, de forma que la reticulación pueda efectuarse por polimerización del grupo polimerizable. En el contexto de realizaciones de la presente invención, los grupos polimerizables pueden actuar de monómeros, por lo que la polimerización de los grupos polimerizables reticula los conjugados que comprenden los grupos polimerizables.

30 Se conocen en la técnica muchos grupos polimerizables, que incluyen grupos (por ejemplo, grupos insaturados) que experimentan fácilmente polimerización por radicales libres, y grupos cíclicos (por ejemplo, lactonas) que experimentan fácilmente polimerización mediante abertura de anillo. La polimerización puede efectuarse, por ejemplo, mediante fotoiniciación (en presencia de una luz apropiada, por ejemplo, 365 nm), mediante reticulación química (en presencia de un donante de radicales libres) y/o calentamiento (a las temperaturas apropiadas).

35 En algunas realizaciones, un grupo polimerizable se selecciona de forma que la polimerización del mismo pueda efectuarse bajo condiciones relativamente suaves que no son perjudiciales para las células vivas. Por ejemplo, las condiciones de polimerización son opcionalmente suficientemente no tóxicas y no perjudiciales, de manera que son adecuadas para efectuar la polimerización *in vivo*, como se describe en el presente documento.

40 Debe observarse que la reticulación covalente puede efectuarse también en presencia de un agente de reticulación. Un agente tal normalmente es un resto químico bifuncional que es capaz de reaccionar con el grupo de reticulación. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, PEG terminados en ambos extremos con un grupo reactivo que puede reaccionar fácilmente con el grupo de reticulación.

45 En algunas realizaciones, el grupo polimerizable es polimerizable por polimerización por radicales libres. Ejemplos de tales grupos incluyen, sin limitación, un acrilato, un metacrilato, una acrilamida, una metacrilamida y una vinilsulfona.

50 Según realizaciones opcionales, el conjugado comprende un resto polimérico que comprende una pluralidad de restos de reticulación que pueden unirse a un polipéptido. Por ejemplo, acrilato, metacrilato, acrilamida, metacrilamida y vinilsulfona, además de ser grupos polimerizables, son adecuados para la unión a un grupo tiol (por ejemplo, en un residuo de cisteína) mediante adición de tipo Michael.

55 Así, como se ejemplifica en la sección de ejemplos en el presente documento, un resto polimérico puede comprender una pluralidad de tales restos (por ejemplo, acrilato), uno de los cuales une el resto polimérico al polipéptido, siendo los restos restantes restos de reticulación como se describe en el presente documento.

60 Así, en realizaciones a modo de ejemplo, el conjugado comprende restos diacrilato del poloxámero (por ejemplo, diacrilato del poloxámero F127), en el que un grupo acrilato en cada resto está unido a un residuo de cisteína de un polipéptido (por ejemplo, fibrinógeno desnaturalizado), y un grupo acrilato sirve de resto de reticulación. En realizaciones adicionales a modo de ejemplo, el conjugado comprende restos tetraacrilato poliméricos (por ejemplo, tetraacrilato de T1307), en el que un grupo acrilato en cada resto está unido a un residuo de cisteína de un polipéptido (por ejemplo, fibrinógeno desnaturalizado), y tres grupos acrilato sirven de restos de reticulación.

65

El polipéptido del conjugado tiene al menos 10 aminoácidos de longitud, opcionalmente al menos 20 aminoácidos de longitud, y opcionalmente al menos 50 aminoácidos de longitud.

5 El término "polipéptido", como se usa en el presente documento, engloba polipéptidos nativos (tanto productos de degradación, polipéptidos sintéticamente sintetizados como polipéptidos recombinantes) y peptidomiméticos (normalmente, polipéptidos sintéticamente sintetizados), además de peptoides y semipeptoides que son análogos de polipéptidos, que pueden tener, por ejemplo, modificaciones que convierten los polipéptidos en más estables mientras están en un cuerpo o más capaces de penetrar en las células. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, modificación del extremo N, modificación del extremo C, modificación del enlace peptídico, que incluye, pero no se limita a,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ,  $\text{CH}_2\text{-S=O}$ ,  $\text{O=C-NH}$ ,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ,  $\text{S=C-NH}$ ,  $\text{CH=CH}$  o  $\text{CF=CH}$ , modificaciones del esqueleto y modificación de residuos. Los métodos de preparación de compuestos peptidomiméticos son muy conocidos en la técnica y se especifican, por ejemplo, en Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992)), que se incorpora por referencia como si se expusiera completamente en el presente documento. Más detalles a este respecto se proporcionan en el presente documento más adelante.

20 Los enlaces peptídicos ( $\text{-CO-NH-}$ ) dentro del péptido pueden estar sustituidos, por ejemplo, por enlaces N-metilados ( $\text{-N(CH}_3\text{)-CO-}$ ), enlaces éster ( $\text{-C(R)H-C-O-C(R)-N-}$ ), enlaces cetometileno ( $\text{-CO-CH}_2\text{-}$ ), enlaces -aza ( $\text{-NH-N(R)-CO-}$ ), en la que R es cualquier alquilo, por ejemplo, metilo, enlaces carba ( $\text{-CH}_2\text{-NH-}$ ), enlaces hidroxietileno ( $\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$ ), enlaces tioamida ( $\text{-CS-NH-}$ ), dobles enlaces olefínicos ( $\text{-CH=CH-}$ ), enlaces retro-amida ( $\text{-NH-CO-}$ ), derivados de péptido ( $\text{-N(R)-CH}_2\text{-CO-}$ ), en la que R es la cadena lateral "normal", naturalmente presentada sobre el átomo de carbono. Estas modificaciones pueden producirse en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena de polipéptidos e incluso en varios (2-3) al mismo tiempo.

25 Como se usa en todo el presente documento, el término "aminoácido" o "aminoácidos" se entiende que incluye los 20 aminoácidos que existen de forma natural; aquellos aminoácidos frecuentemente modificados post-traduccionalmente *in vivo*, que incluyen, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; y otros aminoácidos poco usuales que incluyen, pero no se limitan a, ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, nor-valina, nor-leucina y ornitina. Además, el término "aminoácido" incluye tanto aminoácidos D como L.

30 El polipéptido comprende una proteína o un fragmento de la misma.

35 La proteína puede ser una proteína que existe de forma natural (por ejemplo, una proteína que existe en organismos eucariotas y/o procariotas, células, material celular, material no celular, y similares) o un homólogo de polipéptido (por ejemplo, al menos el 90 % homólogo, opcionalmente al menos el 95 % homólogo, y opcionalmente al menos el 99 % homólogo) a una proteína que existe de forma natural.

En algunos aspectos, la proteína (o fragmento de proteína) está desnaturalizada.

40 Debe entenderse que la proteína descrita en el presente documento puede comprender opcionalmente más de una cadena de polipéptidos.

45 Comprendiendo una proteína caracterizada por más de una cadena de polipéptidos, el conjugado descrito en el presente documento comprende opcionalmente un polipéptido de la proteína.

50 Alternativamente, el conjugado descrito en el presente documento comprende una pluralidad de polipéptidos de la proteína (por ejemplo, todos los polipéptidos de la proteína). Opcionalmente, la pluralidad de polipéptidos están enlazados juntos (por ejemplo, por enlaces no covalentes y/o covalentes) para formar un multímero (por ejemplo, un dímero, un trímero, un tetrámero, un hexámero, etc.), teniendo el multímero unido al mismo, al menos dos restos poliméricos, como se describe en el presente documento. Opcionalmente, los polipéptidos de la proteína están separados (por ejemplo, separados por desnaturalización de la proteína), de forma que el conjugado descrito en el presente documento es una mezcla de diferentes especies conjugadas, en la que cada una de las especies conjugadas comprende un polipéptido diferente.

55 Opcionalmente, el polipéptido (por ejemplo, proteína o fragmento de proteína) está seleccionado de manera que presente una actividad biológica. Opcionalmente, la actividad biológica comprende soporte para el crecimiento y/o invasión celular.

60 Ejemplos de proteínas que presentan una actividad biológica que es ventajosa en el contexto de las realizaciones de la presente invención incluyen, sin limitación, una proteína de señalización de células, una proteína de la matriz extracelular, una proteína de adhesión a célula, un factor de crecimiento, proteína A, una proteasa y un sustrato de proteasa. Según la presente invención, la proteína es una proteína de la matriz extracelular.

65 Según realizaciones opcionales, el polipéptido comprende un polipéptido de fibrinógeno (cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y/o  $\gamma$  de fibrinógeno) o un fragmento del mismo. Opcionalmente, el conjugado descrito en el presente documento comprende las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de fibrinógeno. En realizaciones a modo de ejemplo, el polipéptido es un fibrinógeno desnaturalizado (por ejemplo, una mezcla de cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  desnaturalizadas de fibrinógeno).

Ejemplos de proteínas de la matriz extracelular según la invención incluyen fibrinógeno (por ejemplo, cadena  $\alpha$  - N° de acceso de GenBank NP\_068657; cadena  $\beta$  - N° de acceso de GenBank P02675; cadena  $\gamma$  - N° de acceso de GenBank P02679), colágeno (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_000079), fibronectina (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_002017) y elastina. Proteínas de la matriz extracelular adicionales desveladas en el presente documento son vimentina (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_003371), fibrilina, fibulina, laminina (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_000218) y gelatina.

Ejemplos de proteínas de señalización de células incluyen, pero no se limitan a, proteína cinasa activada por mitógeno p38 (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_002736), factor nuclear kappa B (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_003989), proteína inhibidora de la cinasa Raf (RKIP) (por ejemplo, N° de acceso de GenBank XP\_497846), Raf-1 (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_002871), MEK (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_002746), proteína cinasa C (PKC) (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_002728), fosfoinositida-3-cinasa gamma (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_002640), tirosina cinasas de receptor tales como receptor de insulina (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_000199), proteínas G heterotriméricas (por ejemplo, Galfa(i) - N° de acceso de GenBank NP\_002060; Galfa(s) - N° de acceso de GenBank NP\_000507; Galfa(q) - N° de acceso de GenBank NP\_002063), caveolina-3 (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_001225), proteína 1B asociada a microtúbulos y proteínas 14-3-3 (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_003397).

Ejemplos de proteína de adhesión a célula incluyen, pero no se limitan a, integrina (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_002202), molécula de adhesión intercelular (ICAM) 1 (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_000192), N-CAM (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_000606), cadherina (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_004351), tenascina (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_061978), gicerina (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_006491) y proteína 2 inducida por lesión nerviosa (ninjurina 2) (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_067606).

Ejemplos de factores de crecimiento incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_001954), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_000651), factor de crecimiento de fibroblastos ácido (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_000791), factor de crecimiento de fibroblastos básico (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_001997), eritropoyetina (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_000790), trombopoyetina (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_000451), factor de crecimiento de axones, factor de crecimiento de hepatocitos (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_000592), factor de crecimiento similar a la insulina-I (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_000609), factor de crecimiento similar a la insulina-II (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_000603), interferón- $\gamma$  (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_000610) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_079484).

Ejemplos de proteasas incluyen, pero no se limitan a, pepsina (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_055039), quimotripsina de baja especificidad, quimotripsina de alta especificidad, tripsina (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_002760), carboxipeptidasas (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_001859), aminopeptidasas (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_001141), prolina-endopeptidasa (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_002717), proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_374168), proteinasa K (PK) (por ejemplo, N° de acceso de GenBank P06873), proteasa aspártica (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_004842), serina proteasas (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_624302), metaloproteasas (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_787047), ADAMTS17 (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_620688), triptasa- $\gamma$  (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_036599), matriptasa-2 (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NP\_694564).

Ejemplos de sustratos de proteasa incluyen el péptido o secuencias de péptidos que son la diana de la proteína proteasa. Por ejemplo, la lisina y la arginina son la diana para tripsina; tirosina, fenilalanina y triptófano son la diana para quimotripsina.

Tales proteínas que existen de forma natural pueden obtenerse de cualquier proveedor conocido de reactivos de biología molecular.

Como se ejemplifica en la sección de ejemplos más adelante, se ha descubierto sorprendentemente que un conjugado que comprende un polipéptido como se describe en el presente documento y al menos un resto polimérico que presenta gelación térmica pueden proporcionar al conjugado una capacidad para experimentar gelación térmica inversa.

Por tanto, según un aspecto opcional, el conjugado se caracteriza por una capacidad para experimentar gelación térmica inversa en una solución acuosa, como se describe en el presente documento.

Opcionalmente, la gelación térmica inversa del conjugado se produce a una temperatura inferior a 55 °C, opcionalmente inferior a 50 °C, opcionalmente inferior a 40 °C, y opcionalmente inferior a 30 °C. Opcionalmente, la

gelación térmica inversa se produce a una temperatura inferior a aproximadamente 37 °C, de forma que a una temperatura fisiológica de aproximadamente 37 °C, el conjugado está en un estado gelificado.

5 Opcionalmente, la gelación térmica inversa del conjugado se produce a una temperatura superior a 0 °C, opcionalmente superior a 10 °C, opcionalmente superior a 20 °C y opcionalmente superior a 30 °C.

10 En algunas realizaciones, la gelación térmica inversa del conjugado se produce tras un aumento de la temperatura de 0 °C a 55 °C, opcionalmente de 10 °C a 55 °C, opcionalmente de 10 °C a 40 °C, opcionalmente de 15 °C a 37 °C, y opcionalmente de 20 °C a 37 °C. La gelación térmica inversa que se produce tras un aumento de la temperatura de una temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 20 °C, aproximadamente 25 °C) a una temperatura fisiológica (por ejemplo, aproximadamente 37 °C) es particularmente útil para algunas aplicaciones (por ejemplo, aplicaciones médicas), ya que la gelación puede inducirse transfiriendo el conjugado de un entorno de temperatura ambiente a una temperatura fisiológica, por ejemplo, poniendo el conjugado en un cuerpo.

15 Como se ejemplifica en el presente documento, la temperatura a la que se produce la gelación de una solución de conjugado puede controlarse variando la concentración del conjugado.

20 Además, la temperatura de gelación puede controlarse seleccionando un polímero con una temperatura de gelación apropiada para inclusión en el resto polimérico, y/o variando la concentración de restos poliméricos que presentan gelación térmica inversa (por ejemplo, variando el número de restos poliméricos unidos a un polipéptido y/o variando el tamaño de los restos poliméricos).

25 Como se ha ejemplificado adicionalmente en la sección de ejemplos, las soluciones acuosas que comprenden los conjugados descritos en el presente documento pueden experimentar gelación térmica inversa a concentraciones relativamente bajas, por ejemplo, inferiores al 20 por ciento en peso, opcionalmente inferiores al 10 por ciento en peso, opcionalmente inferiores al 5 por ciento en peso, y opcionalmente inferiores al 2 por ciento en peso.

30 Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, se cree que la conjugación de un polipéptido con un polímero que presenta gelación térmica inversa actúa de extensión de cadena del polímero, que reduce la concentración mínima necesaria para la gelación.

Debe observarse que nunca se ha informado hasta la fecha de un fenómeno de una sustancia de relleno de cadenas de una naturaleza u origen biológico (por ejemplo, un polipéptido).

35 La gelación térmica inversa del conjugado como se describe en el presente documento puede determinarse midiendo un módulo de almacenamiento al cizallamiento de una solución acuosa que lo contiene. Un aumento dependiente de la temperatura en el módulo de almacenamiento es indicativo de una formación de gel mediante una gelación térmica inversa.

40 Como se usa en el presente documento y en la materia, un "módulo de cizallamiento" se define como la relación de la tensión al cizallamiento con respecto a la deformación al cizallamiento. El módulo de cizallamiento puede ser una variable compleja, en cuyo caso el "módulo de almacenamiento" es el componente real y el "módulo de pérdida" es el componente imaginario. El módulo de almacenamiento y el módulo de pérdida en sólidos viscoelásticos miden la energía almacenada, que representa la porción elástica, y la energía disipada como calor, que representa la porción viscosa.

50 En algunas realizaciones, la gelación térmica inversa descrita en el presente documento aumenta un módulo de almacenamiento al cizallamiento (también denominado en el presente documento "módulo de almacenamiento", o "G'") de la solución acuosa del conjugado al menos diez veces, opcionalmente al menos 30 veces, opcionalmente al menos 100 veces, y opcionalmente al menos 300 veces.

55 En algunas realizaciones, la gelación térmica inversa descrita en el presente documento aumenta un módulo de almacenamiento al cizallamiento de la solución acuosa al menos 5 Pa, opcionalmente al menos 15 Pa, opcionalmente al menos 20 Pa, opcionalmente al menos 50 Pa, opcionalmente al menos 100 Pa, y opcionalmente al menos 200 Pa.

60 En algunas realizaciones, el módulo de almacenamiento al cizallamiento de la solución acuosa que contiene el conjugado antes de la gelación térmica inversa (por ejemplo, a una temperatura inferior a una temperatura a la que se produce gelación) es inferior a 2 Pa, opcionalmente inferior a 1 Pa, opcionalmente inferior a 0,5 Pa, y opcionalmente inferior a 0,2 Pa.

65 Según realizaciones opcionales, la gelación térmica inversa es reversible, es decir, un estado gelificado obtenido aumentando una temperatura puede invertirse al estado no gelificado reduciendo la temperatura, teniendo el estado no gelificado sustancialmente las mismas propiedades que existieron antes de la gelación térmica inversa. La gelación reversible es ventajosa porque un estado gelificado puede modificarse y/o reconstruirse produciendo al menos una porción del estado gelificado para invertir a un estado no gelificado (disminuyendo una temperatura),

seguido de formación de un estado gelificado (aumentando una temperatura) en una forma deseada. Además, la gelación reversible no crea desperdicio de un producto por gelación antes de usar un producto (por ejemplo, un producto en almacenamiento), ya que puede eliminarse cualquier gelación tal antes del uso del producto (por enfriamiento).

5 Opcionalmente, la gelación es reversible durante muchos ciclos (por ejemplo, al menos 10 ciclos, al menos 50 ciclos) de aumentar y disminuir una temperatura.

10 Opcionalmente, un gel formado por gelación térmica inversa de una solución acuosa del conjugado es un gel biodegradable, es decir, el gel se degrada en contacto con un tejido y/o una célula (por ejemplo, por proteólisis y/o hidrólisis). Materiales biodegradables son útiles en diversas aplicaciones médicas, por ejemplo, como implantes temporales. Además, los materiales biodegradables son altamente adecuados como matrices para soportar el crecimiento y/o la migración celular, ya que el crecimiento y/o la migración celular están asociados a la degradación de una matriz de alrededor.

15 Como se ejemplifica en la sección de ejemplos más adelante, un gel formado por gelación térmica inversa de una solución de un conjugado descrito en el presente documento puede servir de matriz adecuada para el crecimiento celular, diseminación, expansión y/o invasión.

20 Por tanto, el conjugado descrito en el presente documento se identifica opcionalmente para su uso en generar un armazón, como se define en el presente documento. El armazón puede generarse por gelación térmica inversa del conjugado (por ejemplo, por reticulación no covalente del conjugado) y/o por reticulación covalente del conjugado.

25 El conjugado descrito en el presente documento puede, por tanto, denominarse también una molécula precursora para generar un armazón. Así, el armazón se forma reticulando entre sí (de manera covalente y/o no covalente) una pluralidad de moléculas precursoras.

30 Como se usa en el presente documento, el término "armazón" describe un esqueleto de soporte bidimensional o tridimensional. El armazón según realizaciones de la presente invención está compuesto por unidades precursoras (que comprenden los conjugados como se describen en el presente documento) que están reticuladas entre sí. En algunas realizaciones, puede usarse un armazón como soporte para el crecimiento celular, unión y/o diseminación y así facilitar la generación tisular y/o reparación tisular. En algunas realizaciones, un armazón mantiene una forma deseada de un tejido y/o colonia de células soportada por él.

35 En realizaciones a modo de ejemplo, el armazón es un hidrogel, es decir, el gel formado a partir del conjugado comprende agua absorbida en su interior, por ejemplo, agua de una solución acuosa del conjugado que se sometió a gelación.

40 Como se usa en el presente documento y es muy conocido en la técnica, el término "hidrogel" se refiere a un material que comprende redes sólidas formadas de cadenas de polímero natural o sintético soluble en agua, normalmente que contiene más del 99 % de agua.

45 Opcionalmente, el hidrogel se caracteriza por un módulo de almacenamiento al cizallamiento de al menos 15 Pa (opcionalmente al menos 50 Pa, opcionalmente al menos 100 Pa, y opcionalmente al menos 200 Pa) a 37 °C.

Opcionalmente, la generación del armazón es reversible. La generación de armazón reversible se obtiene opcionalmente en realizaciones en las que la generación de armazón es por gelación térmica inversa, como se ha tratado anteriormente en este documento.

50 Opcionalmente, el armazón se genera por medios distintos de gelación térmica inversa, por ejemplo, por reticulación covalente. El armazón obtenido (por ejemplo, un hidrogel) es opcionalmente capaz de experimentar adicionalmente una gelación térmica inversa. Adicionalmente opcionalmente, el armazón se genera por una gelación térmica inversa y es a partir de aquí que se somete adicionalmente a reticulación covalente, como se describe en el presente documento.

55 Como se ha tratado en el presente documento, los conjugados descritos en el presente documento pueden reticularse por reticulación no covalente (física) y/o por reticulación covalente (química).

60 Por tanto, según otro aspecto de las realizaciones de la invención, se proporciona una composición de materia (por ejemplo, un armazón o un hidrogel) que comprende una forma reticulada de un conjugado descrito en el presente documento. La composición de materia comprende así una pluralidad de moléculas del conjugado reticuladas entre sí.

65 Debe entenderse que aunque la composición de materia se describe en el presente documento por simplicidad como que comprende un conjugado, las composiciones de materia que comprenden una pluralidad de especies de

conjugado (por ejemplo, una mezcla de diferentes conjugados) están englobadas por el término “composición de materia”.

5 En algunas realizaciones, las moléculas de conjugado están reticuladas no covalentemente.

Opcionalmente, las moléculas están reticuladas solo no covalentemente (es decir, no está presente reticulación covalente sustancial).

10 Las composiciones de materia descritas en el presente documento pueden generarse opcionalmente por reticulación no covalente y/o covalente de moléculas de conjugado en una solución, preferentemente una solución acuosa. Opcionalmente, la solución permanece absorbida al conjugado reticulado, por ejemplo, en forma de un gel (por ejemplo, un hidrogel).

15 La solución puede seleccionarse adecuadamente para efectuar la reticulación covalente y/o no covalente anteriormente mencionada.

En algunas realizaciones, la solución es una solución acuosa.

20 Las composiciones de materia que comprenden solo reticulación no covalente pueden opcionalmente generarse por gelación térmica inversa de las moléculas de conjugado en una solución acuosa (por ejemplo, como se describe en el presente documento). Opcionalmente, la forma no covalentemente reticulada es reversible, como se describe en el presente documento.

25 En algunas realizaciones, las moléculas de conjugado están reticuladas covalentemente. En tales realizaciones, el conjugado comprende un resto de reticulación (como se describe en el presente documento). La composición de materia se genera opcionalmente sometiendo una pluralidad de moléculas de conjugado a condiciones para efectuar la reticulación covalente de los restos de reticulación de las moléculas de conjugado.

30 Opcionalmente, la composición de materia covalentemente reticulada se caracteriza por un módulo de almacenamiento al cizallamiento de al menos 20 Pa a 37 °C, y opcionalmente al menos 50 Pa, opcionalmente al menos 100 Pa, opcionalmente al menos 200 Pa, y opcionalmente al menos 300 Pa.

35 En algunas realizaciones, una composición de materia comprende reticulación no covalente, además de la reticulación covalente.

Por ejemplo, una composición de materia que comprende reticulación covalente puede ser capaz de experimentar gelación térmica inversa (por ejemplo, una gelación térmica inversa reversible).

40 Una gelación térmica inversa tal de una composición de materia covalentemente reticulada puede aumentar opcionalmente un módulo de almacenamiento al cizallamiento de la composición de materia al menos el 20 %, opcionalmente al menos el 50 %, opcionalmente al menos el 200 %, opcionalmente al menos el 400 %, y opcionalmente al menos el 900 %.

45 El módulo de almacenamiento al cizallamiento antes de la gelación térmica inversa está opcionalmente en un intervalo de 0,5 Pa a 200 Pa, opcionalmente en un intervalo de 0,5 Pa a 100 Pa, y opcionalmente en un intervalo de 10 Pa a 100 Pa.

50 El módulo de almacenamiento al cizallamiento tras la gelación térmica inversa es opcionalmente al menos 15 Pa, y opcionalmente en un intervalo de 20 Pa a 5000 Pa, opcionalmente de 20 Pa a 1000 Pa, opcionalmente de 20 Pa a 500 Pa, y opcionalmente de 50 Pa a 500 Pa.

Opcionalmente, la gelación térmica inversa de una composición de materia covalentemente reticulada es una temperatura descrita en el presente documento para la gelación de un conjugado.

55 Como se ejemplifica en la sección de ejemplos más adelante, una composición de materia puede caracterizarse por un módulo de almacenamiento al cizallamiento de una porción de la composición de materia que es diferente de un módulo de almacenamiento al cizallamiento de al menos otra porción de la composición de materia. Cada porción pueden caracterizarse independientemente por reticulación no covalente, reticulación covalente o una combinación de reticulación no covalente y covalente (por ejemplo, como se describe anteriormente en este documento).

60 Una composición de materia tal puede prepararse, por ejemplo, usando dos soluciones de un conjugado (por ejemplo, soluciones de diferentes conjugados y/o soluciones con diferentes concentraciones de conjugado). Opcionalmente, una solución se reticula para obtener una primera composición de materia (por ejemplo, como se describe en el presente documento), tras lo cual la primera composición de materia se añade a la segunda solución. 65 Tras la reticulación de la segunda solución (por ejemplo, en condiciones que no afectan significativamente la primera

composición de materia), puede obtenerse una composición de materia que tiene porciones con diferentes propiedades.

5 Independientemente del tipo (no covalente y/o covalente) de reticulación, las composiciones de materia descritas en el presente documento son opcionalmente biodegradables. En algunas realizaciones, la incorporación de un polipéptido en una red de conjugados reticulados dentro de la composición de materia hace que la composición de materia se biodegrade tras la biodegradación del polipéptido.

10 Según realizaciones opcionales, la composición de materia comprende además células (preferentemente células vivas) en su interior. Las células pueden comprender un tipo de célula o dos o más tipos de células.

15 Las composiciones de materia descritas en el presente documento pueden ser útiles para inducir la formación de un tejido, por ejemplo, sirviendo de matriz para soportar el crecimiento y/o invasión celular, y/o proporcionando células (por ejemplo, incorporadas en la composición de materia) que inducen la formación de tejido. Tales propiedades pueden ser útiles para reparar daño tisular.

Por tanto, en algunas realizaciones, la composición de materia se identifica para su uso en inducir la formación de un tejido, como se trata en más detalle en el presente documento más adelante.

20 En algunas realizaciones, la composición de materia se identifica para su uso en reparar daño tisular, como se trata en más detalle en el presente documento más adelante.

25 Las composiciones de materia descritas en el presente documento pueden prepararse por diversos procesos, dependiendo del tipo de composición de materia, y particularmente, del tipo de reticulación (es decir, no covalente y/o covalente) en la composición de materia.

30 Así, según otro aspecto de las realizaciones de la invención, se proporciona un proceso de producción de una composición de materia que comprende reticulación no covalente (por ejemplo, como se describe en el presente documento). El proceso comprende calentar una solución (por ejemplo, una solución acuosa) que comprende una pluralidad de moléculas de un conjugado como se describe en el presente documento, de una primera temperatura a una segunda temperatura. La segunda temperatura es tal que se efectúe una gelación térmica inversa del conjugado en solución, produciendo así una composición de materia con reticulación no covalente.

35 La segunda temperatura es una temperatura en o por encima de la temperatura crítica del conjugado precursor, como se detalla anteriormente en este documento.

40 Opcionalmente, la composición de materia se produce *in vivo*, por ejemplo, calentando a una temperatura fisiológica (por ejemplo, aproximadamente 37 °C). Tal calentamiento puede efectuarse simplemente poniendo en contacto una solución del conjugado con un cuerpo.

45 En algunas realizaciones, el conjugado es un conjugado que comprende al menos un resto de reticulación descrito en el presente documento, y el proceso comprende además someter la solución de conjugado a condiciones que efectúan la reticulación de los restos de reticulación (por ejemplo, antes del calentamiento anteriormente mencionado, posterior al calentamiento o concomitante con el calentamiento). La reticulación de los restos de reticulación puede realizarse opcionalmente para obtener una composición de materia que comprende tanto reticulación no covalente como covalente.

50 Según otro aspecto de las realizaciones de la invención, se proporciona un proceso de producción de una composición de materia que comprende reticulación covalente (por ejemplo, como se describe en el presente documento). El proceso comprende someter una solución que comprende una pluralidad de moléculas de un conjugado descrito en el presente documento, en el que el conjugado comprende al menos un resto de reticulación (como se describe en el presente documento), a condiciones que efectúan la reticulación covalente de los restos de reticulación, produciendo así una composición de materia con reticulación covalente.

55 Opcionalmente, la reticulación covalente se efectúa *in vivo*.

Alternativamente, la reticulación covalente se efectúa *ex vivo*.

60 Opcionalmente, el proceso comprende además formar reticulaciones no covalentes, por ejemplo, por exposición a una temperatura a la que se produce gelación térmica inversa.

65 En algunas realizaciones, la reticulación covalente se efectúa *ex vivo*, para así producir un armazón covalentemente reticulado, y el proceso comprende además someter el armazón covalentemente reticulado a una temperatura fisiológica *in vivo* (por ejemplo, poniendo en contacto el armazón con un cuerpo), tal que se efectúe la gelación térmica inversa del armazón *in vivo*, produciendo así una composición de materia *in vivo* que comprende reticulación no covalente y covalente.

En algunas realizaciones, la solución del conjugado comprende además células. Por consiguiente, el proceso produce una composición de materia que comprende células incorporadas en su interior (como se describe en el presente documento).

- 5 Las condiciones que efectúan la reticulación de restos de reticulación dependerán de las propiedades químicas de los restos de reticulación.

Se conocen en la técnica diversas condiciones para efectuar la reticulación. Por ejemplo, la reticulación puede efectuarse por irradiación (por ejemplo, por luz UV, por luz visible, por radiación ionizante), por un iniciador (por ejemplo, donantes de radicales libres) y/o calor.

Preferentemente, las condiciones para efectuar la reticulación covalente son biocompatibles, concretamente, usan agentes o condiciones que no se consideran perjudiciales en aplicaciones *in vivo*.

- 15 Según una realización opcional de la presente invención, la reticulación es por iluminación con UV (por ejemplo, a una longitud de onda de aproximadamente 365 nm).

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

- 20 Cuando se reticula *in vivo*, es preferible evitar dosis de irradiación que sean perjudiciales. La máxima dosis que es no perjudicial dependerá, por ejemplo, del tipo (por ejemplo, longitud de onda) de irradiación, y de la parte del cuerpo expuesta a la irradiación. Un experto en la materia será capaz de determinar fácilmente si una dosis es perjudicial o no perjudicial.

- 25 En alguna realización, las condiciones comprenden la presencia de un iniciador que se añade para facilitar reticulación.

Opcionalmente, el iniciador es capaz de efectuar la reticulación sin irradiación.

- 30 Alternativamente, el iniciador es un fotoiniciador que efectúa la reticulación en presencia de irradiación (por ejemplo, luz UV, luz visible). La adición de un fotoiniciador normalmente permitirá usar menores dosis de luz UV para la reticulación.

Como se usa en el presente documento, el término "fotoiniciador" describe un compuesto que inicia una reacción química (por ejemplo, reacción de reticulación, polimerización de cadena) cuando se expone a UV o iluminación visible. Muchos fotoiniciadores adecuados serán conocidos para un experto en la materia. Fotoiniciadores a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, óxido de bis(2,4,6-trimetilbenzoin)fenilfosfina (BAPO), 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPA), canforquinona (CQ), 1-fenil-1,2-propanodiona (PPD), el complejo organometálico Cp'Pt(CH<sub>3</sub>)(3) (Cp' = eta(5)-C(5)H(4)CH(3)), 2-hidroxi-1-[4-(hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona (por ejemplo, Irgacure™ 2959), metacrilato de dimetilaminoetilo (DMAEMA), 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona, benzofenona (BP) y flavinas.

Como se ejemplifica en la sección de ejemplos más adelante, las propiedades físicas (por ejemplo, módulo de almacenamiento al cizallamiento) de las composiciones de materia dependen de ciertos parámetros que pueden controlarse fácilmente. Así, una composición de materia que tiene una propiedad física deseada puede prepararse seleccionando un valor adecuado de uno o más de tales parámetros.

Por tanto, según otro aspecto de las realizaciones de la invención, se proporciona un método de control de una propiedad física (por ejemplo, un módulo de almacenamiento al cizallamiento) de una composición de materia tal como se describe en el presente documento. El método comprende el control de un parámetro que caracteriza la composición de materia. Un parámetro tal puede ser, por ejemplo, una concentración de un conjugado descrito en el presente documento en la solución (solución acuosa), una temperatura ambiente, una temperatura de reticulación. Además, el parámetro puede ser la presencia o ausencia de reticulación covalente, una concentración de iniciador (por ejemplo, presencia o ausencia de iniciador) durante la reticulación covalente, y/o una dosis de irradiación usada para la reticulación covalente.

La concentración de un conjugado en una composición de materia puede controlarse fácilmente preparando una solución del conjugado a una concentración seleccionada, y reticulando el conjugado por reticulación covalente y/o no covalente, como se describe en el presente documento, de forma que la solución del conjugado se convierta en una composición de materia descrita en el presente documento, que tiene la concentración seleccionada de conjugado.

En algunas realizaciones, la concentración de conjugado se correlaciona positivamente con el módulo de almacenamiento al cizallamiento, como se ejemplifica en los ejemplos en el presente documento.

65

En algunas realizaciones, la concentración de conjugado se correlaciona negativamente con una temperatura a la que se efectúa la gelación térmica inversa (por ejemplo, una temperatura de gelación crítica), como se ejemplifica en los ejemplos en el presente documento.

5 En algunas realizaciones, la temperatura ambiente controla una propiedad física de una composición de materia que afecta la gelación térmica inversa de una composición de materia, como se describe en el presente documento.

10 La temperatura ambiente puede seleccionarse, por ejemplo, de forma que la gelación no se efectúe (por ejemplo, a una temperatura relativamente baja) y el módulo de almacenamiento al cizallamiento sea relativamente bajo, de forma que se efectúe la gelación (por ejemplo, a una temperatura relativamente alta) y el módulo de almacenamiento al cizallamiento sea relativamente alto. Además, puede seleccionarse una temperatura ambiente (por ejemplo, a una temperatura intermedia) de forma que la gelación se efectúe parcialmente a cualquier grado deseado, de forma que el almacenamiento al cizallamiento pueda ser a cualquier nivel intermedio que se desee.

15 Normalmente, la composición de materia se caracterizará por un intervalo de temperatura relativamente estrecho (por ejemplo, un intervalo de 5 °C, un intervalo de 10 °C, un intervalo de 15 °C) en el que una propiedad física (por ejemplo, un módulo de almacenamiento al cizallamiento) presenta una dependencia de temperatura particularmente fuerte. Opcionalmente, una temperatura ambiente está seleccionada de dentro de este intervalo de temperatura, de forma que la propiedad física pueda controlarse convenientemente por cambios relativamente pequeños en la temperatura ambiente.

20 La temperatura de reticulación (es decir, una temperatura a la que los conjugados en la composición de materia se reticulan covalentemente) puede usarse para controlar una propiedad física de una composición de materia que comprende reticulación covalente (por ejemplo, como se describe en el presente documento).

25 En algunas realizaciones, la temperatura de reticulación se correlaciona negativamente con un módulo de almacenamiento al cizallamiento de la composición de materia, como se ejemplifica en los ejemplos en el presente documento.

30 En algunas realizaciones, una correlación entre una propiedad física (por ejemplo, módulo de almacenamiento al cizallamiento) y la temperatura de reticulación es particularmente fuerte cuando la temperatura de reticulación esté en un intervalo de temperatura en el que una propiedad física presenta una dependencia de temperatura particularmente fuerte, como se describe anteriormente en este documento. Opcionalmente, una temperatura de reticulación se selecciona de dentro de este intervalo de temperatura, de forma que la propiedad física pueda controlarse convenientemente por cambios relativamente pequeños en la temperatura de reticulación.

35 En algunas realizaciones, la presencia de reticulación covalente está asociada a un mayor módulo de almacenamiento al cizallamiento, como se ejemplifica en el presente documento.

40 En algunas realizaciones, un grado de reticulación covalente modulando las condiciones para efectuar la reticulación covalente.

45 Así, por ejemplo, puede obtenerse bajo grado de reticulación covalente efectuando la reticulación covalente sin un iniciador o con una cantidad más pequeña de iniciador, y/o sin irradiación o con una pequeña dosis de irradiación (por ejemplo, usando un tiempo de irradiación corto y/o una baja intensidad de irradiación).

50 En algunas realizaciones, el parámetro (por ejemplo, temperatura ambiente, temperatura de reticulación) es relativamente independiente de algunas propiedades físicas (por ejemplo, tasa de biodegradación). Esto permite ventajosamente el control de dos o más propiedades físicas de interés (por ejemplo, tasa de degradación y módulo de almacenamiento al cizallamiento) sin creación de una necesidad de experimentación para determinar cómo de interdependientes son tales propiedades físicas. Por ejemplo, un módulo de almacenamiento al cizallamiento puede controlarse opcionalmente seleccionando una temperatura de reticulación adecuada, mientras que una tasa de degradación puede controlarse seleccionando un polímero apropiado para los restos poliméricos descritos en el presente documento.

55 Así, en algunas realizaciones, el cambiar un parámetro descrito en el presente documento (por ejemplo, temperatura ambiente, temperatura de reticulación) cambiará una tasa de biodegradación por un factor inferior a 4, opcionalmente por un factor inferior a 3, opcionalmente por un factor inferior a 2, y opcionalmente por un factor inferior a 1,5.

60 La tasa de biodegradación se cuantifica opcionalmente midiendo una semivida de la composición de materia en una solución de tripsina (por ejemplo, usando procedimientos descritos en el presente documento).

65 Los conjugados según realizaciones de la invención pueden producirse de una manera relativamente simple y barata.

Así, según otro aspecto desvelado en el presente documento, se proporciona un proceso de producción de un conjugado como se describe en el presente documento, comprendiendo el proceso unir covalentemente un polímero a un polipéptido, siendo el polímero y polipéptido de forma que al menos dos moléculas de polímero se unan a una molécula del polipéptido, en el que al menos una de las dos moléculas de polímero presenta una gelación térmica inversa.

El polímero puede comprender opcionalmente al menos un resto de reticulación (por ejemplo, como se describe en el presente documento), para producir un conjugado que comprende al menos un resto de reticulación, como se describe en el presente documento.

Opcionalmente, el polímero comprende al menos un primer resto (opcionalmente un único primer resto) que es capaz de reaccionar de manera que se una el polímero al polipéptido, y opcionalmente al menos un segundo resto que es un resto de reticulación descrito en el presente documento.

En algunas realizaciones, el primer resto y el segundo resto son diferentes, de forma que el primer resto pueda hacerse reaccionar de manera que se una el polímero al polipéptido, sin provocar que el segundo resto (resto de reticulación) reaccione prematuramente (por ejemplo, antes de que desee la reticulación de moléculas de conjugado).

En algunas realizaciones, el primer resto y el segundo resto son los mismos, siendo el resto adecuado para unir el polímero al polipéptido y para la reticulación del conjugado.

Opcionalmente, un resto de reticulación tal se selecciona como que es capaz de experimentar dos reacciones diferentes, cada una bajo condiciones diferentes, de forma que el resto pueda hacerse reaccionar bajo un conjunto de condiciones de manera que se una el polímero al polipéptido, y entonces reaccione bajo condiciones diferentes de manera que se reticulen moléculas de conjugado. Por ejemplo, como se describe en el presente documento, algunos restos insaturados (por ejemplo, acrilatos) pueden experimentar adición de tipo Michael por un tiol (por ejemplo, en condiciones básicas) de manera que se una el polímero a un polipéptido, y también experimenten polimerización (por ejemplo, en condiciones para iniciar la polimerización por radicales libres) de manera que se reticulen conjugados.

En algunas realizaciones en las que el primer y segundo restos descritos en el presente documento son los mismos (o de otro modo capaces de experimentar reacciones similares bajo las mismas condiciones), el polipéptido se hace reaccionar con un exceso molar (por ejemplo, al menos 20:1, al menos 50:1, al menos 100:1, al menos 200:1) del polímero, para prevenir que cada molécula de polímero se una a más de un sitio sobre el polipéptido.

Aparte de ser baratas de producir, las composiciones de materia de las realizaciones de la presente invención son altamente reproducibles, flexibles (pueden tensionarse o estirarse fácilmente), presentan propiedades estructurales controlables, y están dispuestas a biodegradación controlable; características que las hacen altamente adecuadas para regeneración *in vivo* o *ex vivo* de tejidos tales como hueso, cartílago, corazón músculo, tejido de piel, vasos sanguíneos y otros tejidos (blandos y duros) en el cuerpo. Por ejemplo, un armazón de hidrogel tal puede colocarse fácilmente en huecos dentro de un tejido o un órgano, tras lo cual pueden llenar el vacío e iniciar el proceso de regeneración a medida que el armazón se degrada.

Por tanto, según otro aspecto de las realizaciones de la invención, se proporciona un uso de un conjugado descrito en el presente documento o de una composición de materia descrita en el presente documento en la fabricación de un medicamento para reparar daño tisular.

El medicamento es opcionalmente para inducir la formación de un tejido (*in vivo* y/o *ex vivo*).

Opcionalmente, el medicamento es para tratar un trastorno caracterizado por daño o pérdida tisular (por ejemplo, como se describe en el presente documento). En el presente documento, la expresión "tejido" se refiere a parte de un organismo que consiste en un agregado de células que tienen una estructura y función similar. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tejido cerebral, retina, tejido de piel, tejido hepático, tejido pancreático, hueso, cartílago, tejido conjuntivo, tejido sanguíneo, tejido de músculo, tejido cardíaco, tejido cerebral, tejido vascular, tejido renal, tejido pulmonar, tejido gonadal, tejido hematopoyético y tejido adiposo. Preferentemente, la expresión "tejido", como se usa en el presente documento, también engloba la expresión "órgano" que se refiere a una unidad estructural y funcional completamente diferenciada en un animal que está especializado para alguna función particular. Ejemplos no limitantes de órganos incluyen cabeza, cerebro, ojo, pierna, mano, corazón, hígado riñón, pulmón, páncreas, ovario, testículo y estómago.

Según otro aspecto de las realizaciones de la invención, se proporciona un uso de un conjugado descrito en el presente documento o de una composición de materia descrita en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar un sujeto que tiene un trastorno caracterizado por daño o pérdida tisular.

Como se usa en el presente documento, la expresión “trastorno caracterizado por daño o pérdida tisular” se refiere a cualquier trastorno, enfermedad o afección que presente un daño tisular (por ejemplo, tejido no funcional, tejido canceroso o pre-canceroso, tejido roto, tejido fracturado, tejido fibrótico o tejido isquémico) o una pérdida de tejido (por ejemplo, tras un traumatismo, una enfermedad infecciosa, una enfermedad genética, y similares) que requiere regeneración de tejido. Ejemplos de trastornos o afecciones que requieren regeneración de tejido incluyen, pero no se limitan a, cirrosis hepática tal como en pacientes con hepatitis C (tejido del hígado), diabetes tipo 1 (tejido pancreático), fibrosis quística (tejido de pulmón, hígado, pancreático), cáncer de huesos (tejido de hueso), quemadura y cicatrización (tejido de piel), degeneración macular relacionada con la edad (tejido retiniano), infarto de miocardio, reparación miocárdica, lesiones del SNC (mielina), defectos del cartílago articular (condrocitos), degeneración de la vejiga, degeneración intestinal, y similares. Además, el daño cosmético o pérdida tisular están englobados por el término “trastorno”.

Como se usa en el presente documento, el término “cosmético” se refiere a tejido evidente (por ejemplo, visible), que incluye, pero no se limita a, tejido de piel. El daño cosmético o pérdida tisular normalmente es perjudicial estéticamente, y puede ser perjudicial por motivos adicionales (por ejemplo, factores psicológicos).

En el presente documento, la expresión “tratar” se refiere a inhibir o detener el desarrollo de una enfermedad, trastorno o afección y/o causar la reducción, remisión o regresión de una enfermedad, trastorno o afección en un individuo que padece, o está diagnosticado con, la enfermedad, trastorno o afección. Aquellos expertos en la materia conocerán diversas metodologías y ensayos que pueden usarse para evaluar el desarrollo de una enfermedad, trastorno o afección, y similarmente, diversas metodologías y ensayos que pueden usarse para evaluar la reducción, remisión o regresión de una enfermedad, trastorno o afección.

En algunas realizaciones, un medicamento que comprende un conjugado como se describe en el presente documento se identifica por reticularse con el conjugado (*in vivo* y/o *ex vivo*), como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, un medicamento que comprende una composición de materia descrita en el presente documento se identifica para ser implantado en un sujeto.

Como se usa en el presente documento, el término “sujeto” se refiere a un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano (masculino o femenino) en cualquier edad.

La implantación se efectúa opcionalmente usando una herramienta quirúrgica tal como un escalpelo, cuchara, espátula, u otro dispositivo quirúrgico. Opcionalmente, la implantación se efectúa mediante inyección (por ejemplo mediante jeringa, catéter, y similares)

En el presente documento, los términos “implante” e “implantación” engloban poner una sustancia (por ejemplo, un conjugado o composición de materia descrita en el presente documento) en un cuerpo o sobre una superficie del cuerpo (por ejemplo, sobre una superficie de la piel). Según otro aspecto de las realizaciones de la invención, se proporciona una composición de materia descrita en el presente documento para su uso en un método de inducción de la formación de un tejido *in vivo*, comprendiendo el método implantar la composición de materia descrita en el presente documento en un sujeto (por ejemplo, como se describe en el presente documento), para así inducir la formación del tejido.

En algunas realizaciones, la composición de materia es una composición de materia que comprende conjugado covalentemente reticulado como se describe en el presente documento, y se reticula no covalentemente *in vivo* tras la implantación (por ejemplo, para proporcionar la composición de materia con una rigidez deseada). Opcionalmente, la reticulación no covalente se efectúa por exposición a una temperatura fisiológica (por ejemplo, como se describe en el presente documento), siendo la exposición a la temperatura fisiológica un resultado directo de la implantación.

Según otro aspecto de las realizaciones de la invención, se proporciona un conjugado descrito en el presente documento para su uso en un método de inducción de la formación de un tejido *in vivo*, comprendiendo el método implantar una pluralidad de moléculas del conjugado descrito en el presente documento en un sujeto, para así inducir la formación del tejido.

En algunas realizaciones, el conjugado se reticula no covalentemente *in vivo* tras la implantación (por ejemplo, para formar un armazón). Opcionalmente, la reticulación no covalente se efectúa por exposición a una temperatura fisiológica (por ejemplo, como se describe en el presente documento), siendo la exposición a la temperatura fisiológica un resultado directo de la implantación.

En algunas realizaciones, el conjugado se reticula covalentemente *in vivo* tras la implantación (por ejemplo, para formar un armazón). La reticulación puede realizarse como se describe en el presente documento, usando agentes y/o condiciones no tóxicas, no perjudiciales (por ejemplo, aplicación de irradiación UV).

Según otro aspecto de las realizaciones de la invención, se proporciona un método de inducción de la formación de un tejido *ex vivo*, comprendiendo el método someter una composición de materia que tiene células en su interior

(como se describe en el presente documento) a condiciones propicias para el crecimiento de las células, para así inducir la formación de tejido.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión “*ex vivo*” se refiere a células vivas que se derivan de un organismo y están creciendo (o se cultivan) fuera del organismo vivo, por ejemplo, fuera del cuerpo de un vertebrado, un mamífero, o ser humano. Por ejemplo, las células que se derivan de un ser humano tales como células de músculo humano o células endoteliales aórticas humanas y se cultivan fuera del cuerpo se denominan células que se cultivan *ex vivo*.

10 Las células en una composición de materia descrita en el presente documento se seleccionan opcionalmente de manera que sean capaces de formar un tejido. Tales células pueden ser, por ejemplo, citoblastos tales como citoblastos embrionarios, citoblastos de médula ósea, células de sangre del cordón, citoblastos mesenquimatosos, citoblastos de tejido adulto, o células diferenciadas tales como células neurales, células retinianas, células epidérmicas, hepatocitos, células pancreáticas, células óseas, células cartilaginosas, células elásticas, células fibrosas, miocitos, células miocárdicas, células endoteliales, células de músculo liso y células hematopoyéticas.

15 La composición de materia que comprende las células puede comprender células incorporadas dentro de y/o sobre la superficie de la composición de materia. Las células pueden incorporarse opcionalmente dentro de la composición de materia por reticulación de un conjugado descrito en el presente documento en presencia de células (por ejemplo, como se describe en el presente documento). La incorporación de células sobre una superficie de la composición de materia puede efectuarse opcionalmente poniendo en contacto una composición de materia preparada con las células.

20 La concentración de células en y/o sobre la composición de materia depende del tipo de célula y las propiedades del almacén. Aquellos expertos en la materia son capaces de determinar la concentración de células usada en cada caso.

25 La composición de materia se pone opcionalmente en contacto con medio de cultivo de tejido y factores de crecimiento.

30 Alternativamente o adicionalmente, la composición de materia comprende medio de cultivo de tejido y factores de crecimiento, por ejemplo, en una fase acuosa de un hidrogel.

35 Opcionalmente, las células se examinan rutinariamente (por ejemplo, usando un microscopio invertido) para la evaluación de crecimiento celular, diseminación y la formación de tejido, con el fin de facilitar el control sobre la formación de tejido, y/o para determinar cuándo se ha completado un proceso de la formación de tejido.

40 Tras la formación *ex vivo* de tejido, el tejido obtenido y/o la composición de materia que comprende el tejido formado se implanta opcionalmente en el sujeto (por ejemplo, para inducir adicionalmente la formación de tejido, para reparar daño tisular, y/o para tratar un trastorno como se describe en el presente documento). Aquellos expertos en la técnica son capaces de determinar cuándo y cómo implantar el tejido y/o la composición de materia para así inducir la formación y/o reparación de tejido, y/o para tratar una enfermedad descrita en el presente documento.

45 Se apreciará que las células que van a implantarse en un sujeto (por ejemplo, para inducir la formación *in vivo* de tejido y/o tras la formación *ex vivo* de un tejido), como se describe en el presente documento, pueden derivarse opcionalmente del sujeto tratado (fuente autóloga), y opcionalmente de fuentes alógenas tales como citoblastos embrionarios que no se espera que induzcan una reacción inmunogénica.

50 Según otro aspecto de las realizaciones de la invención, se proporciona una composición de materia descrita en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno caracterizado por daño o pérdida tisular (por ejemplo, como se describe en el presente documento), comprendiendo el método implantar la composición de materia descrita en el presente documento en un sujeto, como se describe en el presente documento, para así inducir la formación del tejido, tratando así el trastorno caracterizado por daño o pérdida tisular.

55 Según otro aspecto de las realizaciones de la invención, se proporciona una pluralidad de moléculas de un conjugado descrito en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno caracterizado por daño o pérdida tisular (por ejemplo, como se describe en el presente documento), comprendiendo el método implantar la pluralidad de moléculas de un conjugado descrito en el presente documento en un sujeto, como se describe en el presente documento, para así inducir la formación del tejido, tratando así el trastorno caracterizado por daño o pérdida tisular.

60 En algunas realizaciones descritas en el presente documento que se efectúan implantando un conjugado, el conjugado comprende opcionalmente al menos un resto de reticulación (por ejemplo, como se describe en el presente documento). En tales realizaciones, el método comprende opcionalmente además reticular covalentemente la pluralidad de moléculas del conjugado, por ejemplo, sometiendo la pluralidad de moléculas a condiciones (por

ejemplo, como se describe en el presente documento) que efectúan la reticulación covalente de los restos de reticulación de las moléculas.

5 Un conjugado descrito en el presente documento puede proporcionarse como una composición, por ejemplo, una composición para efectuar un método o uso descrito en el presente documento. La composición puede ser para efectuar un tratamiento farmacéutico (por ejemplo, medicinal) y/o un tratamiento cosmético (por ejemplo, como se describe en el presente documento).

10 Por tanto, según otro aspecto de las realizaciones de la invención, se proporciona una composición farmacéutica, cosmética o cosmeceútica que comprende una pluralidad de moléculas de un conjugado descrito en el presente documento, siendo la composición identificada para su uso en inducir la formación de un tejido *in vivo* tras ponerse en contacto con un tejido y adicionalmente tras someter la composición a una temperatura fisiológica.

15 En el presente documento, la expresión “composición cosmeceútica” se refiere a una composición caracterizada por tanto usos farmacéuticos como cosméticos.

20 Opcionalmente, el conjugado comprende al menos un resto de reticulación (como se describe en el presente documento), y la composición se identifica para su uso en inducir la formación de un tejido tras someter adicionalmente la pluralidad de moléculas del conjugado a condiciones (por ejemplo, como se describe en el presente documento) que efectúan la reticulación covalente de los restos de reticulación de las moléculas.

Opcionalmente, la composición comprende además un iniciador (por ejemplo, como se describe en el presente documento) para inducir la reticulación covalente de los restos de reticulación.

25 Opcionalmente, la composición descrita en el presente documento se envasa en un material de envasado y se identifica impresa, en o sobre el material de envasado, para su uso en inducir la formación de tejido y/o para tratar un trastorno, como se describe en el presente documento.

30 La composición puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable, y formularse para facilitar su administración (por ejemplo, implantación).

35 En el presente documento, el término “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un vehículo o un diluyente que no produce irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y propiedades del compuesto administrado. Ejemplos, sin limitaciones, de vehículos son: propilenglicol, solución salina, emulsiones y mezclas de disolventes orgánicos con agua, además de vehículos sólidos (por ejemplo, en polvo) y gaseosos.

Opcionalmente, el vehículo es un vehículo acuoso, por ejemplo, una solución acuosa (por ejemplo, solución salina).

40 El conjugado también puede proporcionarse como parte de un kit.

45 Así, según otro aspecto de las realizaciones de la invención, se proporciona un kit para inducir la formación de un tejido, comprendiendo el kit un conjugado descrito en el presente documento, un disolvente acuoso e instrucciones para la reticulación de una solución acuosa del conjugado con el fin de formar un armazón para inducir la formación de tejido.

50 Opcionalmente, el conjugado y el disolvente se almacenan por separado dentro del kit (por ejemplo, en unidades de envase separadas), de forma que el conjugado se almacena en un estado seco hasta que se ponga en contacto con el disolvente para la formación de una solución del conjugado (por ejemplo, una solución descrita en el presente documento). Tal almacenamiento del conjugado antes de uso puede aumentar una duración eficaz del conjugado (y kit).

55 Opcionalmente, el conjugado comprende al menos un resto de reticulación (por ejemplo, como se describe en el presente documento), y el kit comprende además un iniciador (por ejemplo, como se describe en el presente documento) para inducir la reticulación covalente del resto de reticulación.

Opcionalmente, el kit comprende además células para incorporar en el armazón (por ejemplo, como se describe en el presente documento).

60 Las células pueden formar una parte del disolvente o pueden envasarse por separado.

En algunas realizaciones, el kit comprende instrucciones como un prospecto.

65 Las instrucciones para la reticulación del conjugado en el disolvente pueden ser, por ejemplo, mezclar el conjugado y el disolvente y someter la solución obtenida a una cierta temperatura (por ejemplo, para efectuar la gelación térmica inversa).

Por ejemplo, si la gelación del conjugado se efectúa a temperatura ambiente, las instrucciones pueden ser guardar el kit bajo refrigeración (por ejemplo, inferior a 10 °C o a 4 °C), mezclar los componentes a temperatura ambiente y esperar hasta que se observe la formación del gel.

- 5 Si la gelación se efectúa a mayores temperaturas, las instrucciones pueden ser mezclar los componentes y luego calentar la solución durante un periodo de tiempo indicado.

Si la reticulación covalente va a efectuarse por irradiación, las instrucciones pueden ser mezclar los componentes (que opcionalmente incluyen un fotoiniciador como se describe en el presente documento), irradiar la solución, y  
10 opcionalmente calentar la solución para efectuar la gelación térmica como se describe anteriormente en este documento. La irradiación puede ser antes de, concomitante con o después de la irradiación.

Si la reticulación covalente va a efectuarse por polimerización por radicales libres, las instrucciones pueden ser mezclar los componentes (incluyendo un iniciador de la polimerización como se describe en el presente documento),  
15 y opcionalmente calentar la solución para efectuar la gelación térmica como se describe anteriormente en este documento y/o para efectuar la polimerización (si se desea calentar). El calentamiento para efectuar la gelación térmica y para efectuar la polimerización puede ser a la misma temperatura o a temperaturas diferentes.

En algunas realizaciones, el conjugado y la solución se envasan dentro del kit a una relación adecuada para obtener una composición de materia con las propiedades deseadas. Una relación tal puede estar predeterminada como se  
20 detalla anteriormente en este documento.

Opcionalmente, las instrucciones incluyen adicionalmente orientación para seleccionar una relación adecuada para obtener una propiedad adecuada de la composición de materia, según la descripción proporcionada anteriormente  
25 en este documento.

Las instrucciones pueden incluir además orientación con respecto a seleccionar las condiciones de reticulación (por ejemplo, con o sin irradiación; con o sin calentamiento; con o sin adición de un iniciador de la polimerización) para  
30 obtener una composición de materia con propiedades deseadas.

Los términos “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “que tiene” y sus conjugados significan “que incluye, pero no se limita a”.

El término “que consiste en” significa “que incluye y se limita a”.

El término “que consiste esencialmente en” significa que la composición, método o estructura puede incluir componentes, etapas y/o partes adicionales, pero solo si los componentes, etapas y/o partes adicionales no alteran  
35 materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o estructura reivindicado.

La expresión “a modo de ejemplo” se usa en el presente documento para significar “que sirve de ejemplo, caso o ilustración”. Cualquier realización descrita como “a modo de ejemplo” no debe interpretarse como preferida o  
40 ventajosa con respecto a otras realizaciones y/o para excluir la incorporación de características de otras realizaciones.

La palabra “opcionalmente” se usa en el presente documento para significar “se proporciona en algunas realizaciones y no se proporciona en otras realizaciones”.

Como se usa en el presente documento, la forma en singular “un”, “una”, “el” y “la” incluye referencias en plural, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Por ejemplo, el término “un compuesto” o “al menos un  
50 compuesto” puede incluir una pluralidad de compuestos, que incluye mezclas de los mismos.

La descripción de un intervalo debe considerarse que ha desvelado específicamente todos los posibles subintervalos, además de valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, la descripción de un  
55 intervalo tal como de 1 a 6 debe considerarse que ha desvelado específicamente la descripción tal como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., además de números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la anchura del intervalo.

Siempre que un intervalo numérico se indique en el presente documento, pretende incluir cualquier número citado (fraccionario o entero) dentro del intervalo indicado. La expresión “que oscila/oscila entre” un primer número indicado y un segundo número indicado y “que oscila/oscila de” un primer número indicado “a” un segundo número indicado  
60 se usan en el presente documento indistintamente y se indican para incluir el primer y segundo números indicados y todos los números fraccionarios y enteros entremedias.

Como se usa en el presente documento, el término “método” se refiere a modos, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea dada que incluye, pero no se limita a, aquellos maneras, medios, técnicas y  
65

procedimientos tanto conocidos para, como fácilmente desarrollados, de modos, medios, técnicas y procedimientos conocidos por profesionales de las ciencias químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

5 Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se describen anteriormente en este documento y como se reivindican en la sección de reivindicaciones más adelante encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

10 Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención.

#### *Materiales y métodos*

15 *Materiales:*

Se obtuvo acetona de Bio-Lab (Israel);  
 se obtuvo cloruro de acrilóilo de Merck;  
 se obtuvo calceína AM de Sigma-Aldrich;  
 20 se obtuvo colágeno tipo I de BD Biosciences;  
 se obtuvo colagenasa 1A de Sigma-Aldrich;  
 se obtuvo diclorometano de Aldrich;  
 se obtuvo éter dietílico de Frutarom (Israel);  
 se obtuvo medio Eagle modificado por Dulbecco de Gibco;  
 25 se obtuvo homodímero 1 de etidio de Sigma-Aldrich;  
 se obtuvo suero bovino fetal de Biological Industries (Israel);  
 se obtuvo formalina de Sigma-Aldrich;  
 se obtuvo Hoechst 33342 de Sigma Aldrich;  
 se obtuvo el iniciador Irgacure® 2959 de Ciba;  
 30 se obtuvo mercaptoetanol de Gibco;  
 se obtuvo *N*-hidroxisuccinimida-fluoresceína de Thermo Scientific;  
 se obtuvieron aminoácidos no esenciales de Biological Industries (Israel);  
 se obtuvo penicilina-estreptomina de Biological Industries (Israel);  
 se obtuvo éter de petróleo 40-60 de Bio-Lab (Israel);  
 35 se obtuvo Pluronic® F127 (12,6 kDa) de Sigma;  
 se obtuvo poli(etilenglicol) (12 kDa) de Fluka;  
 se obtuvo azida de sodio de Riedel-de Haen;  
 se obtuvo tetraol T1307 Tetronic® de BASF;  
 se obtuvo tolueno de Bio-Lab (Israel);  
 40 se obtuvo trietilamina de Fluka;  
 se obtuvo clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina de Sigma;  
 se obtuvo tripsina de MP Biomedicals.

#### *Síntesis de poloxámero F127-diacrilato, T1307 Tetronic®-tetraacrilato y PEG-diacrilato:*

45 Se prepararon poloxámero F127-diacrilato (F127-DA), T1307Tetronic®-tetraacrilato (T1307-TA) y poli(etilenglicol)-diacrilato (PEG-DA) a partir de Pluronic® F127 (12,6 kDa), tetraol T1307 Tetronic® (18 kDa) y poli(etilenglicol) (PEG) diol (12 kDa), respectivamente, según los procedimientos descritos en Halstenberg et al. [Biomacromolecules 2002, 3:710-723]. Como se representa en la Figura 1A, la acrilatación de los polímeros se llevó a cabo bajo argón haciendo reaccionar los polímeros terminados en hidroxilo en una solución de diclorometano y tolueno con cloruro de acrilóilo (Merck, Darmstadt, Alemania) y trietilamina a una relación molar de 1,5:1 con respecto a los grupos hidroxilo. El producto final se precipitó en éter dietílico frío en hielo (para PEG-DA) o éter de petróleo 40-60 (para F127-DA y T1307-TA). El polímero sólido se secó a vacío durante 48 horas.

55 Usando RMN protónica, se determinó que el número promedio de grupos acrílo por molécula de F127-DA era 2,15, se determinó que el número promedio de grupos acrílo por molécula de T1307-TA era 4,38, y se determinó que el número promedio de grupos acrílo por PEG-DA era 1,74.

#### *Caracterización reológica:*

60 Se llevaron a cabo mediciones reológicas usando un reómetro AR-G2 (TA Instruments) equipado con una base de temperatura controlada por placa de Peltier. Se usó una geometría de la placa de cuarzo de 40 mm en todos los experimentos. Cada medición se llevó a cabo con 0,4 ml de la solución de polímero que contenía 0, 1 % (peso/volumen) de iniciador Irgacure® 2959. Se aplicó luz UV (365 nm) por una matriz multi-diodo circular (Moritex, Japón). Las condiciones de prueba para todas las mediciones fueron del 2 % de deformación a una frecuencia de oscilación de 1 Hz.

65

*Mediciones de la captación de agua:*

Se prepararon construcciones de hidrogel a partir de un volumen de 100  $\mu$ l de solución de conjugado de polímero-fibrinógeno con 0, 1 % (peso/volumen) de iniciador Irgacure® 2959 en un tubo de silicio de 5 mm de diámetro. Las construcciones se reticularon bajo luz UV (365 nm, 4-5 mW/cm<sup>2</sup>) para formar un cilindro de 5 mm de altura. FF127 se reticuló a una temperatura de 4 °C, 21 °C o 37 °C. La captación de agua se evaluó calculando la relación de hinchamiento ( $Q_M$ ), es decir, la relación del peso húmedo (masa después del hinchamiento) dividida entre el peso seco (peso después de la liofilización).

*Mediciones de biodegradación:*

La biodegradación de los hidrogeles se caracterizó marcando fluorométricamente el componente biológico en el hidrogel biosintético con N-hidroxisuccinimida-fluoresceína (NHS-fluoresceína) reactiva con amina. La tasa de degradación se cuantificó midiendo la liberación de la proteína durante la disolución enzimática del hidrogel. Se usaron tapones de 100  $\mu$ l de hidrogel durante la noche en una solución de PBS que contenía 0,05 mg/ml de NHS-fluoresceína, y se lavaron ampliamente para eliminar la fluoresceína no unida. Entonces, los tapones se transfirieron a 3 ml de PBS con 0,01 mg/ml de tripsina y 0,1 % de azida de sodio (Riedel-de Haen, India), y se incubaron a 37 °C con agitación continua. Las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Thermo Varioskan (longitud de onda de excitación 494 nm, longitud de onda de emisión 518 nm) con el software SkanIt2.2®. Después del último momento de tiempo, cada hidrogel se disoció hidrolíticamente añadiendo NaOH 0,1 M. Después de 30 minutos, los valores de emisión se registraron al 100 % de degradación. Se usaron tapones de hidrogel marcados sin enzima y tapones no teñidos con solución de enzima como controles negativos.

*Preparación de construcciones sembradas con células:*

Se prepararon construcciones de hidrogel sembradas con células por reticulación inducida por UV de conjugados de FF127 o de FT1307 en solución en presencia de fibroblastos de prepucio humano dispersos o células HeLa. Las células sometidas a pases se tripsinaron y se suspendieron en 100  $\mu$ l de una solución del conjugado a una concentración de 10<sup>5</sup> células/ml, junto con un fotoiniciador (0,1% en peso/volumen). Las construcciones en forma de disco se expusieron a luz UV durante 5 minutos a 4 °C, 21 °C o 37 °C. Se prepararon construcciones sembradas con células de control a partir de PEG (12 kDa)-fibrinógeno, diacrilato del poloxámero F127 o tetraacrilato T1307 (3 % en peso/peso en PBS). Las construcciones sembradas con células se cultivaron durante hasta 6 días en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía 10 % de suero bovino fetal (FBS), 1 % de penicilina-estreptomocina, 1 % de aminoácidos no esenciales y 0,2 % de 2-mercaptoetanol.

*Microscopía óptica y microscopía fluorescente:*

Se realizaron microscopía óptica y microscopía fluorescente usando un microscopio Eclipse TE2000-S (Nikon) o un microscopio Eclipse TS100 (Nikon), y una cámara digital.

*Análisis estadístico:*

Se realizó análisis estadístico usando el software de análisis estadístico Microsoft Excel. Se cuantificaron los datos de experimentos independientes y se analizaron para cada variable. Se hicieron comparaciones entre dos tratamientos usando la prueba de la t de Student (bilateral, varianza igual) y se hicieron comparaciones entre múltiples tratamientos con análisis de la varianza (ANOVA). Un valor de p de <0,05 se consideró estadísticamente significativo.

*Ejemplo 1**Conjugado de poloxámero F127-fibrinógeno*

Se conjugó fibrinógeno con diacrilato del poloxámero F127 (preparado como se describe anteriormente en este documento, y como se representa en la Figura 1A) por una reacción de adición de tipo Michael, como se representa en la Figura 1B. Con el fin de comparar las propiedades de los conjugados de poloxámero-proteína con aquellas de los conjugados de poli(etilenglicol) (PEG)-proteína, se conjugó fibrinógeno con PEG de 12 kDa-diacrilato (preparado como se describe anteriormente en este documento), usando la misma reacción.

Se complementó una solución de 3,5 mg/ml de fibrinógeno en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 150 mM con urea 8 M con clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) a una relación molar de 1,5:1 de TCEP con respecto a residuos de cisteína de fibrinógeno. Entonces se añadió PBS con urea 8 M y 280 mg/ml del polímero funcionalizado (F127-DA o PEG-DA) a una relación molar de 4:1 de moléculas de polímero con respecto a residuos de cisteína de fibrinógeno. La mezcla se dejó reaccionar durante 3 horas a temperatura ambiente. Entonces, la proteína conjugada se precipitó añadiendo 4 volúmenes de acetona. El precipitado se redisolvió en PBS que contenía urea 8 M a una concentración de proteína de 10 mg/ml y luego se dializó contra PBS durante 2 días a 4 °C, sustituyéndose el PBS dos veces por día. El tubo de diálisis tuvo un corte de 12-14 kDa (Spectrum).

Con el fin de establecer la concentración total de los conjugados de F127-fibrinógeno y PEG-fibrinógeno, se liofilizaron 0,5 ml de la solución de conjugado durante 24 horas y se pesó. La concentración de fibrinógeno neta se determinó usando un ensayo de proteínas BCA™ convencional (Pierce Biotechnology) y se compararon las concentraciones de los conjugados (peso seco) y fibrinógeno con el fin de determinar la concentración de polímero sintético en los conjugados. La eficiencia de la reacción de conjugación ( $\epsilon_{conjugación}$ ) se calculó basándose en las concentraciones y pesos moleculares del polímero sintético y fibrinógeno, suponiendo un máximo teórico de 29 moléculas de polímero sintético por molécula de fibrinógeno (ya que el fibrinógeno comprende 29 grupos tiol), usando la siguiente fórmula:

$$\epsilon_{conjugación} = \frac{[\text{Polímero sin t.}]}{[\text{Fibrinógeno}]} \times \text{teórico} \left\{ \frac{MW_{\text{fibrinógeno}}}{29 \times MW_{\text{Polímero sin t.}}} \right\}$$

La concentración media de fibrinógeno y la eficiencia de conjugación obtenidas durante 4 lotes de cada uno de los conjugados de F127-fibrinógeno y PEG-fibrinógeno se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Concentración media de fibrinógeno y eficiencia de conjugación de conjugados de polímero sintético-fibrinógeno (media  $\pm$  error estándar de la media)

Polímero sintético	MW (kDa)	Concentración de fibrinógeno (medida) (mg/ml)	Concentración de conjugado (medida) (mg/ml)	Concentración de polímero sintético (calculada) (mg/ml)	Eficiencia de conjugación ( $\epsilon_{conjugación}$ ) (%)
F127-DA	12,6	7,7 $\pm$ 0,5	21 $\pm$ 2,3	13 $\pm$ 1,9	79 $\pm$ 8,4
PEG-DA	12	8,9 $\pm$ 2	24,7 $\pm$ 6,7	15,8 $\pm$ 4,8	83,8 $\pm$ 10,5

Como se muestra en la Tabla 1, tanto el poloxámero F127 como PEG se conjugaron con fibrinógeno con una eficiencia de conjugación relativamente alta. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre la eficiencia de conjugación o la concentración de fibrinógeno obtenida con el poloxámero F127 y PEG.

#### Ejemplo 2

##### Propiedades reológicas del conjugado de poloxámero F127-fibrinógeno (FF127) e hidrogeles formados por reticulación de FF127

Se estudiaron las propiedades reológicas del conjugado de poloxámero F127-fibrinógeno (FF127) descrito en el Ejemplo 1, como se describe en la sección de Materiales y métodos anteriormente en este documento.

Como se muestra en la Figura 2, el módulo de almacenamiento al cizallamiento ( $G'$ ) de FF127 aumentó considerablemente a temperaturas por encima de aproximadamente 20 °C. La transición dependió de la concentración de FF127, y que el módulo de almacenamiento de 8 mg/ml de FF127 aumentó a una temperatura ligeramente menor que el módulo de almacenamiento de 4 mg/ml de FF127.

Como se muestra adicionalmente en la Figura 2, el aumento en el módulo de almacenamiento al cizallamiento estuvo acompañado por un pico en el módulo de pérdida al cizallamiento ( $G''$ ) de FF127.

Como se muestra en la Figura 3A, el módulo de almacenamiento al cizallamiento aumentó repetidamente (hasta aproximadamente 185 Pa) y disminuyó aumentando la temperatura a 37 °C y reduciendo la temperatura a 15 °C, que indica una transición reversible.

Estos resultados indican que FF127 se somete a transición de fase de gelación térmica inversa (GTI) a tales temperaturas, como resultado de la formación de una matriz polimérica continua debido a reticulación física (es decir, no covalente) de moléculas de FF127, como se representa en la Figura 4.

Es notable que la gelación térmica inversa se produjo a concentraciones inferiores a 20 mg/ml de conjugado (correspondientes a una concentración de fibrinógeno de aproximadamente 8 mg/ml), ya que F127 no presenta gelación térmica inversa a concentraciones inferiores al 14,6 % (peso/peso) [Cohn et al., Biomacromolecules 2005, 6:1168-1175].

La reticulación química (es decir, covalente) de las moléculas de FF127 se realizó añadiendo 0,1 % (peso/volumen) de iniciador Irgacure® 2959 a soluciones de FF127, e irradiando la solución con luz UV (365 nm, 4-5 mW/cm<sup>2</sup>).

Como se muestra en la Figura 5, la reticulación química de FF127 produjo un aumento irreversible en el módulo de almacenamiento.

Este resultado indica que se forma un hidrogel debido a la polimerización por radicales libres iniciada por UV de los grupos funcionales acrílico sobre las moléculas de FF127.

Como se muestra en la Figura 6, el hidrogel químicamente reticulado presentó un aumento dependiente de la temperatura en el módulo de almacenamiento y el módulo de pérdida.

5 Como se muestra en la Figura 3B, el módulo de almacenamiento del hidrogel químicamente reticulado aumentó repetidamente (hasta aproximadamente 300 Pa) y disminuyó aumentando la temperatura a 37 °C y reduciendo la temperatura a 15 °C, que indica una transición reversible.

10 Este resultado indica que el hidrogel químicamente reticulado presenta adicionalmente transiciones de fase de GTI debidas a la reticulación física de unímeros de FF127, como se observa en FF127 sin reticulación química.

15 Como se muestra adicionalmente en las Figuras 3A y 3B, la gelación de FF127 y FF127 químicamente reticulado a 37 °C se eliminó gradualmente en presencia de colagenasa (que degrada el fibrinógeno), de un modo dependiente de la dosis.

20 Estos resultados indican que la gelación térmica inversa de tanto FF127 como FF127 químicamente reticulado está asociada al peso molecular del fibrinógeno que forma el esqueleto de FF127. Como el fibrinógeno se degradó proteolíticamente por la colagenasa, los unímeros de FF127 se vuelven más pequeños y así se afectó la capacidad para formar una matriz polimérica física.

25 Con el fin de explorar la estabilidad de las propiedades de la red de hidrogel bajo condiciones de carga aplicada, se prepararon hidrogeles a partir de FF127 (8 mg/ml) con o sin reticulación química y se expusieron a mediciones reológicas de barrido de tiempo a medida que se aumentaron gradualmente los niveles de tensión de cizallamiento.

30 Como se muestra en la Figura 7, el hidrogel químicamente reticulado fue más sensible a los cambios de temperatura en comparación con el hidrogel físico, que presenta un mayor módulo de almacenamiento a 37 °C, pero colapsó bajo menos tensión oscilante (70 Pa) que el hidrogel físico (200 Pa).

35 Como se muestra adicionalmente en el presente documento, cuando se eliminó la tensión aplicada a 37 °C, el hidrogel químicamente reticulado se restauró casi completamente, mientras que el hidrogel físicamente reticulado se recuperó solo ligeramente de la tensión aplicada. Sin embargo, el reducir la temperatura a 15 °C y elevarla de nuevo a 37 °C restauró completamente las propiedades mecánicas de ambos hidrogeles.

40 Estos resultados indican que las propiedades de los geles pueden “resetearse” reduciendo y aumentando la temperatura.

#### *Ejemplo 3*

##### *Efecto de la temperatura de reticulación sobre las propiedades físicas de hidrogeles de conjugado de poloxámero F127-fibrinógeno (FF127)*

45 Como las interacciones entre moléculas del conjugado de FF127 son dependientes de la temperatura, se planteó la hipótesis de que la temperatura durante la reacción de reticulación química ( $T_{ret}$ ) influyera en la reacción de reticulación química. La reticulación química de una red de hidrogel en presencia de radicales libres puede depender de la movilidad de los precursores moleculares y de su probabilidad de formar reticulaciones químicas cuando experimentan una transición física dependiente de la temperatura.

Se formaron hidrogeles por reticulación activada por UV, como se describe en el Ejemplo 2, a diferentes temperaturas.

50 Como se muestra en la Figura 8, el valor de  $G'$  de los hidrogeles a 37 °C fue inversamente proporcional a la temperatura a la que se realizó la reticulación inducida por UV. Como se muestra adicionalmente en el presente documento, los valores de  $G'$  de hidrogeles químicamente reticulados a diferentes temperaturas fueron casi idénticos a 15 °C.

55 Estos resultados indican que la reticulación física tiene un efecto altamente significativo sobre las propiedades físicas que caracterizan las redes químicamente reticuladas, ya que las propiedades de los diversos hidrogeles variaron considerablemente a 37 °C, cuando la reticulación física está presente, pero no a 15 °C, cuando la reticulación física está ausente.

#### *Ejemplo 4*

##### *Captación de agua por los hidrogeles de conjugado de poloxámero F127-fibrinógeno (FF127)*

60 Se determinó la captación de agua de las construcciones de hidrogel de FF127 reticulado como se describe en la sección de Materiales y métodos anterior en este documento. Se reticuló FF127 a una temperatura de 21 °C o a una

temperatura de 37 °C. Como control, se determinó la captación de agua de hidrogeles de PEG (12 kDa)-fibrinógeno reticulados como se describe anteriormente en este documento.

5 La captación de agua en cada hidrogel representa una medida característica de su estado de equilibrio entre agua y matriz polimérica, y da una indicación de las fuerzas estructurales implicadas en formar y sostener la red de hidrogel. La relación de hinchamiento ( $Q_M$ ) se midió para los tres hidrogeles a dos temperaturas ambiente separadas, 4 °C y 37 °C.

10 Como se muestra en la Figura 9, no hubo diferencia significativa en la relación de hinchamiento entre los diferentes hidrogeles a 4 °C, mientras que a 37 °C, FF127 y PEG-fibrinógeno presentan propiedades significativamente diferentes. Los hidrogeles de FF127 expulsaron agua cuando se calentaron a 37 °C, pero no los hidrogeles de PEG-fibrinógeno.

15 Como se muestra en las Figuras 9, 10A y 10B, el FF127 reticulado a 21 °C expulsó más agua que el FF127 reticulado a 37 °C.

20 Estos resultados indican que a una temperatura a la que los efectos de la gelación térmica inversa son despreciables (por ejemplo, 4 °C), los diferentes polímeros reticulados presentan propiedades similares, mientras que a una temperatura a la que los efectos de la gelación térmica inversa son significativos (por ejemplo, 37 °C), el grado de gelación térmica inversa afecta las propiedades de hinchamiento de las redes de polímero.

#### *Ejemplo 5*

25 *Comparación de la biodegradación y propiedades reológicas de los hidrogenes de conjugado de poloxámero F127-fibrinógeno (FF127)*

30 Se determinó la cinética de biodegradación de FF127 químicamente reticulado e hidrogeles de PEG (12 kDa)-fibrinógeno en una solución de 0,01 mg/ml de tripsina a 37 °C, como se describe anteriormente en este documento. Los hidrogeles de FF127 se reticularon a temperaturas de 21 °C y 37 °C y se compararon. Los hidrogeles se reticularon por exposición a UV, como se describe anteriormente en este documento.

35 Los módulos de almacenamiento de los hidrogeles se determinaron como se describe anteriormente en este documento. Para comparación, se preparó un hidrogel por reticulación de diacrilato de F127 a 37 °C y se determinó el módulo de almacenamiento.

40 Como se muestra en la Figura 11, hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los tres materiales en términos de su tasa de biodegradación ( $p < 0,05$ ). Los hidrogeles preparados a partir de PEG-fibrinógeno se degradaron los más rápidos, con una semivida de  $105 \pm 5,4$  minutos, y se degradaron completamente después de 24 horas en 0,01 mg/ml de tripsina. Los hidrogeles preparados de FF127 alcanzaron solo ~60 % de degradación después de 24 horas. La semivida de los hidrogeles de FF127 fue  $420 \pm 66$  minutos cuando se reticularon a 37 °C, y  $580 \pm 90$  minutos cuando se reticularon a 21 °C.

45 Como se muestra en la Figura 12, el módulo de almacenamiento de FF127 reticulado a 37 °C fue similar al del PEG-fibrinógeno, y considerablemente menos que el de FF127 reticulado a 21 °C. Como se muestra adicionalmente en el presente documento, el módulo de almacenamiento de FF127 reticulado a 21 °C fue similar al de diacrilato de F127 reticulado a 37 °C.

50 Así, aunque la tasa de biodegradación de FF127 reticulado fue más lenta que la de PEG-fibrinógeno reticulado, y estuvo solo moderadamente afectada por la temperatura de reticulación, el módulo de almacenamiento de FF127 reticulado se afectó fuertemente por la temperatura de reticulación.

55 Estos resultados indican que los factores que determinan la tasa de biodegradación (por ejemplo, tipo de polímero) pueden seleccionarse relativamente independientemente de los factores que determinan las propiedades reológicas (por ejemplo, temperatura de reticulación).

#### *Ejemplo 6*

##### *Conjugado de T1307 Tetronic®-fibrinógeno*

60 Se conjugó fibrinógeno con tetraacrilato de T1307 Tetronic® (preparado como se describe anteriormente en este documento) por una reacción de adición de tipo Michael, usando esencialmente los mismos procedimientos que se describen en el Ejemplo 1. Como se representa en las Figuras 13A y 13B, la conjugación de un polímero de tetraacrilato con fibrinógeno produce 3 grupos acrilato libres por polímero conjugado (1 grupo acrilato une el fibrinógeno al polímero), proporcionando elevada capacidad de reticulación.

65

La concentración media de fibrinógeno y la eficiencia de conjugación se determinaron para 4 lotes de T1307-fibrinógeno, como se describe en el Ejemplo 1.

5 La solución obtenida de conjugado de T1307-fibrinógeno comprendió  $20,4 \pm 1,4$  mg/ml de conjugado,  $6,7 \pm 1$  mg/ml de fibrinógeno y  $13,7 \pm 0,5$  mg/ml de polímero sintético. La eficiencia de conjugación fue  $66,3 \pm 8,5$  %.

#### *Ejemplo 7*

##### *Propiedades físicas de hidrogeles de T1307-fibrinógeno (FT1307)*

10 El conjugado de T1307-fibrinógeno (FT1307) descrito en el Ejemplo 6 se reticuló químicamente por luz UV a una concentración de 6 mg/ml, a temperaturas de 4 °C, 21 °C o 37 °C. Se determinaron las propiedades reológicas, captación de agua y biodegradación de los hidrogeles obtenidos, como se describe anteriormente en este documento.

15 Como se muestra en las Figuras 14A y 14B, la temperatura de reticulación de FT1307 se correlacionó inversamente con el módulo de almacenamiento a 37 °C.

20 Como se muestra en la Figura 15, la temperatura de reticulación de FT1307 se correlacionó inversamente con la cantidad de agua expulsada del hidrogel cuando el hidrogel se calentó hasta 37 °C. A diferencia, la temperatura de reticulación tuvo poco efecto sobre la captación de agua de los polímeros a 4 °C.

A diferencia, como se muestra en la Figura 16, la temperatura de reticulación de FT1307 no presentó ninguna correlación clara con las tasas de degradación de FT1307.

25 Estos resultados son similares a aquellos presentados en los Ejemplos 3 y 4, e indican que la temperatura de reticulación puede usarse para determinar las propiedades de hidrogeles de polímero-proteína formados usando una variedad de polímeros de gelación térmica inversa, y que las propiedades reológicas de los hidrogeles pueden determinarse independientemente de las tasas de degradación.

#### *Ejemplo 8*

##### *Hidrogeles de F127-fibrinógeno (FF127) sembrados en células*

35 Se prepararon construcciones de hidrogel sembradas en células por reticulación inducida por UV de una solución de conjugado de FF127 en presencia de fibroblastos de prepucio humano dispersos (Lonza, Walkersville, MD, EE.UU.), como se describe en la sección de Métodos y materiales. Se prepararon construcciones sembradas con células de control a partir de PEG (12 kDa)-fibrinógeno y diacrilato del poloxámero F127. Muestras para histología se fijaron en 4 % de formalina en el día 3 y en el día 6 de cada experimento. Se tiñeron secciones transversales con hematoxilina y eosina (H & E) para la obtención de imágenes.

40 Como se muestra en la Figura 17, la formación de lamelipodios y una morfología de células fusiformes avanzó más rápidamente en FF127 reticulado a 37 °C que en FF127 reticulado a 21 °C. En el día 3, las células en FF127 reticulado a 21 °C se redondearon relativamente y acababan de empezar a formar lamelipodios, mientras que en el FF127 reticulado a 37 °C, las células eran altamente fusiformes con muchos lamelipodios celulares. Por consiguiente, en el día 6, las células en FF127 reticulado a 21 °C habían empezado a invadir la matriz mediante lamelipodios celulares, pero solo algunos eran completamente fusiformes, mientras que la mayoría de las células en FF127 reticulado a 37 °C eran completamente fusiformes y presentaron muchos lamelipodios.

50 Como se muestra adicionalmente en el presente documento, en el PEG-fibrinógeno reticulado, que se caracteriza tanto por una biodegradabilidad relativamente alta como por módulo de almacenamiento bajo (como se muestra anteriormente en este documento), las células fueron altamente fusiformes en el día 3.

55 Como se muestra adicionalmente en el presente documento, en diacrilato de F127 reticulado, que carece de fibrinógeno, las células siguieron completamente redondas y no formaron extensiones celulares.

Las construcciones de hidrogel de FF127 sembradas en células también se prepararon por reticulación física a 37 °C sin reticulación química por luz UV. Las células en tales hidrogeles se compararon con aquellas en construcciones de hidrogel de FF127 químicamente reticulado a 37 °C.

60 Como se muestra en la Figura 18, las células en hidrogeles de FF127 con solo reticulación física y las células en hidrogeles de FF127 con tanto reticulación física como química presentaron ambas una morfología similar. En el día 3 en ambos materiales, las células presentaron morfología fusiforme con protuberancias que invadieron la matriz, y en el día 6 en ambos materiales, las células se diseminaron completamente y tomaron forma altamente fusiforme.

65

La viabilidad de las células encapsuladas se determinó en el día 0 y en el día 3 de cada experimento. Las células se eliminaron de la construcción disolviendo el fibrinógeno en solución de 0,4 mg/ml de colagenasa 1A durante 4 horas, seguido de 5 minutos de centrifugación (1000 rotaciones por minuto). El sedimento se redisolvió en 100  $\mu$ l de solución de tinción que contenía homodímero 1 de etidio 0,004 mM y 2 mg/ml de Hoechst 33342 en PBS. Las células se tiñeron durante 30 minutos sobre un agitador orbital en la oscuridad y a continuación se centrifugaron durante 5 minutos (1000 rotaciones por minuto). El sedimento de células se disolvió en 25  $\mu$ l de PBS, y se obtuvieron imágenes en un portaobjetos de microscopio de vidrio recubierto con un cubreobjetos. Se obtuvieron imágenes de las células teñidas por microscopía fluorescente. Se contaron las células vivas y muertas y se normalizaron por una suspensión de control que no se expuso a luz UV.

Como se muestra en la Figura 19, la viabilidad de células en FF127 químicamente reticulado fue al menos el 88 % en el día 0 y al menos el 85 % en el día 3. La viabilidad celular en ambos días fue mayor en FF127 reticulado a 37 °C que en FF127 reticulado a 21 °C, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Los resultados anteriores indican que los hidrogeles formados a partir de conjugados de poloxámero-fibrinógeno, que incluyen hidrogeles con y sin reticulación química de los conjugados, pueden servir de matrices para el crecimiento e invasión celulares. Los resultados indican adicionalmente que la tasa de invasión celular puede modularse seleccionando las propiedades físicas del gel, por ejemplo, seleccionando una temperatura de reticulación adecuada.

#### *Ejemplo 9*

##### *Crecimiento hacia afuera celular en hidrogeles de F127-fibrinógeno (FF127)*

Se realizaron experimentos de crecimiento hacia afuera usando una construcción de tejido densa hecha de células de músculo liso aórticas bovinas compactadas (Genlantis) sembradas en geles de colágeno. Cada gel de colágeno sembrado en células compactadas se encapsuló dentro de un hidrogel de FF127. Como control, un gel de colágeno sembrado en células compactadas se encapsuló dentro de un hidrogel de PEG-fibrinógeno.

El tejido basado en colágeno se preparó una solución de 5 x DMEM, 10 % de suero bovino fetal, solución de colágeno tipo I reconstituida en ácido acético 0,02 N (2 mg/ml) y NaOH 1 M con células de músculo liso dispersas a una concentración de  $3 \times 10^6$  células/ml. Los geles de colágeno sembrados en células se cultivaron durante 2 días en medio de cultivo antes de poner el tejido compactado en 300  $\mu$ l de solución de conjugado de FF127 (o PEG-fibrinógeno) y fotoiniciador en una placa de 48 pocillos. Después de la exposición a 5 minutos de luz UV a 37 °C o 21 °C, el tejido encapsulado se cultivó dentro del hidrogel con 500  $\mu$ l de medio de cultivo. El crecimiento hacia afuera celular del gel de colágeno en la matriz que encapsula FF127 (o PEG-fibrinógeno) se monitorizó diariamente durante hasta 5 días. Los resultados del crecimiento hacia afuera se cuantificaron midiendo la distancia recorrida promedio de las células de los márgenes del tejido de colágeno denso en el hidrogel de FF127 (o PEG-fibrinógeno) usando micrografías de contraste de fase de las muestras tomadas a intervalos de tiempo fijados.

Como se muestra en las Figuras 20A y 20B, en cada uno de los tres materiales probados (FF127 reticulado a 21 °C y a 37 °C, y PEG-fibrinógeno reticulado), las células empezaron a invadir la matriz que rodea la masa de tejido después de 1 día y continuaron invadiendo la matriz durante la duración del experimento.

Como se muestra en la Figura 20B, la tasa de invasión en el FF127 reticulado a 37 °C siguió siendo constante durante la duración del experimento, mientras que la tasa de invasión disminuyó en FF127 reticulado a 21 °C y en el PEG-fibrinógeno, a partir del tercer día del experimento. Empezando en el día 3, hubo una diferencia estadísticamente significativa entre la distancia de migración de células en FF127 reticulado a 21 °C y en FF127 reticulado a 37 °C. En el día 4, la distancia que recorrieron las células fue el 21 % inferior en FF127 reticulado a 21 °C que en FF127 reticulado a 37 °C, y en el día 5 la distancia fue del 11 % inferior en FF127 reticulado a 21 °C. Las células invasoras no presentaron una diferencia morfológica entre los tres materiales probados.

Estos resultados indican adicionalmente que la tasa de invasión celular puede modularse seleccionando las propiedades físicas del gel.

#### *Ejemplo 10*

##### *Hidrogeles de T1307-fibrinógeno (FT1307) sembrados en células*

Se prepararon construcciones de hidrogel sembradas en células por reticulación inducida por UV de una solución de conjugado de FT1307 en presencia de fibroblastos de prepuccio humano y células HeLa de adenocarcinoma humano, como se describe en la sección de Métodos y materiales. Se prepararon construcciones sembradas en células de control a partir de tetraacrilato de T1307.

Con el fin de visualizar las células sembradas y determinar su viabilidad, las construcciones sembradas en células se colocaron en un pocillo que contenía 2 ml de calceína AM 4 mM y homodímero 1 de etidio 2 mM en DMSO, y se

incubaron durante 45 minutos. Las células viables se tiñen por calceína y las células no viables se tiñen por etidio. Cada construcción se lavó entonces dos veces durante 15 minutos en PBS con el fin de eliminar el exceso de moléculas de colorante. Entonces se obtuvieron imágenes de las células por microscopía fluorescente.

5 Como se muestra en la Figura 21, la diseminación de células de fibroblastos avanzó relativamente rápidamente en FT1307 reticulado a 37 °C, y más lentamente en FT1307 reticulado a 21 °C, y se detuvo casi completamente en FT1307 reticulado a 4 °C. La tasa de diseminación de células se correlacionó inversamente con el módulo de almacenamiento, que fue 52 Pa, 244 Pa y 373 Pa siguiendo las temperaturas de reticulación de 37 °C, 21 °C y 4 °C, respectivamente.

10 Como se muestra adicionalmente en la Figura 21, la viabilidad celular fue alta en los tres tipos de matrices de FT1307, como se evidencia por la escasez de tinción con etidio (color naranja).

15 Como se muestra en la Figura 22, las colonias de células HeLa fueron relativamente densas y se confinaron en FT1307 reticulado a 4 °C, algo menos densas y se confinaron en FT1307 reticulado a 21 °C, y relativamente dispersas en FT1307 reticulado a 37 °C.

20 Los resultados anteriores indican que la tasa de diseminación celular y la estructura de las colonias de células están afectadas por las propiedades físicas de la matriz, que puede determinarse por la temperatura de reticulación.

#### 20 *Ejemplo 11*

25 *Crecimiento hacia afuera celular en hidrogeles de F127-fibrinógeno (FF127) encapsulados dentro de hidrogeles de T1307-fibrinógeno (FT1307)*

30 Se realizaron experimentos de crecimiento hacia afuera usando cápsulas de FF127 físicamente reticulado que contenían cultivos o co-cultivos de fibroblastos dérmicos humanos y células HeLa, que estuvieron atrapados en hidrogeles químicamente reticulados de FT1307. Se suspendieron células tripsinadas en 500 µl de solución de conjugado de FF127 a una concentración de  $10^7$  células/ml, y se cargaron en una jeringa de 30G Micro-Fine™ (BD, New Jersey, EE.UU.).

35 Como se muestra en la Figura 23A, mientras que se mantenía la temperatura inferior a 20 °C, gotas 20 de la suspensión de células en FF127 se añadieron de la jeringa 10 a un medio 30 de solución salina tamponada con fosfato (PBS) suavemente agitada mantenido a una temperatura de 37 °C. Las gotas 20 gelificaron tras la exposición a una temperatura de 37 °C en medio 30 de PBS, formando cápsulas 40 sembradas en células. Las cápsulas 40 sembradas en células se aislaron y se incubaron en medio de cultivo celular DMEM durante 2 días a 37 °C, y luego se sembraron en 300 µl de solución de conjugado de FT1307 con un fotoiniciador (0,1 % peso/volumen), y se expusieron a luz UV durante 5 minutos a temperaturas de 37 °C, 21 °C o 4 °C.

40 Como se muestra en la Figura 23B, este procedimiento produjo una construcción co-polimérica - de manera que atrapa las cápsulas 50 de FF127 físicamente reticulado relativamente blandas dentro de un medio 60 de FT1307 químicamente reticulado más duro.

45 Como se describe anteriormente en este documento, las temperaturas de reticulación de 37 °C, 21 °C o 4 °C produjeron módulos de almacenamiento de FT1307 de 52 Pa, 244 Pa y 373 Pa, respectivamente.

50 Como se muestra en las Figuras 24A y 24B, los fibroblastos presentaron crecimientos hacia afuera en un hidrogel con un bajo módulo de almacenamiento (52 Pa), pero no en un hidrogel con un alto módulo de almacenamiento (373 Pa).

55 En comparación, como se muestra en las Figuras 25A y 25B, las células HeLa presentaron diferentes estrategias de migración/invasión en hidrogeles con diferentes módulos; las células presentaron migración ameboide individual en un hidrogel con un bajo módulo de almacenamiento (52 Pa) y migración multicelular colectiva en un hidrogel con un alto módulo de almacenamiento (373 Pa).

60 Los co-cultivos de células HeLa y fibroblastos se sembraron en cápsulas de FF127 dentro de hidrogeles de FT1307 con el fin de evaluar cómo el módulo del hidrogel afecta el desarrollo de cultivos heterogénicos. Con el fin de diferenciar entre fibroblastos y células HeLa, se co-cultivaron fibroblastos marcados con GFP (proteína verde fluorescente) y células HeLa teñidas con Dil (perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3'-tetrametilindocarbocianina).

Como se muestra en las Figuras 26A y 26B, en un hidrogel de FT1307 con un alto módulo de almacenamiento (373 Pa), las células HeLa se empujaron en el hidrogel de FT1307, aumentando el diámetro de la cápsula, mientras que se detuvo el crecimiento hacia afuera de fibroblastos.

5 Como se muestra en las Figuras 27A y 27B, en un hidrogel de FT1307 con un bajo módulo de almacenamiento (52 Pa), el frente de la cápsula estuvo dominado por fibroblastos, que realizaron eficazmente la migración mesenquimatosas en el hidrogel de FT1307.

10 Los resultados anteriores indican que el crecimiento hacia afuera de células de cultivos homogéneos y heterogéneos puede modularse según las propiedades físicas de un hidrogel de alrededor.

Los resultados anteriores indican adicionalmente que pueden prepararse hidrogeles heterogéneos a partir de más de un tipo de conjugado de polímero-proteína.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un conjugado que comprende un polipéptido que tiene, unido al mismo, al menos dos restos poliméricos, comprendiendo cada uno de dichos restos poliméricos un poloxámero, en el que dicho polipéptido comprende una proteína de la matriz extracelular.
2. El conjugado de la reivindicación 1, en el que al menos uno de dichos restos poliméricos comprende además al menos un resto de reticulación para la reticulación covalente de una pluralidad de moléculas del conjugado entre sí.
- 10 3. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha proteína de la matriz extracelular está seleccionada del grupo que consiste en fibrinógeno, colágeno, elastina y fibronectina.
4. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho polipéptido comprende un fibrinógeno.
- 15 5. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en la generación de un almacén.
6. Una composición de materia que comprende una forma reticulada del conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo dicha forma reticulada una pluralidad de moléculas del conjugado reticuladas entre sí.
- 20 7. La composición de materia de la reivindicación 6, en la que al menos uno de dichos restos poliméricos comprende además un resto de reticulación, y dicha pluralidad de moléculas del conjugado se reticulan covalentemente entre sí.
- 25 8. La composición de materia de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, o el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en inducir una formación de un tejido *in vivo*.
- 30 9. La composición de materia de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, o el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en reparar daño tisular *in vivo* induciendo una formación de un tejido *in vivo* y/o induciendo una formación de un tejido *ex vivo* e implantar el tejido obtenido y/o composición de materia que comprende el tejido formado en un sujeto.
- 35 10. Un proceso de producción de la composición de materia de la reivindicación 6, comprendiendo el proceso calentar una solución de una pluralidad de moléculas de un conjugado como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 de una primera temperatura a una segunda temperatura, siendo dicha segunda temperatura tal que se efectúe una gelación térmica inversa del conjugado en dicha solución, produciendo así la composición de materia.
- 40 11. Un proceso de producción de la composición de materia de la reivindicación 7, comprendiendo el proceso someter una solución que comprende una pluralidad de moléculas de un conjugado como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, comprendiendo dicho conjugado al menos un resto de reticulación, a condiciones que efectúan la reticulación covalente de dichos restos de reticulación, produciendo así la composición de materia.
- 45 12. Un método de control de una propiedad física de una composición de materia de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, comprendiendo el método el control de un parámetro seleccionado del grupo que consiste en una concentración de un conjugado como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en dicha solución, una temperatura ambiente, una presencia o ausencia de un iniciador, una dosis de irradiación durante la reticulación covalente, y una temperatura de reticulación.
- 50 13. Un método de inducción de la formación de un tejido *ex vivo*, comprendiendo el método someter la composición de materia de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en el que la composición de materia comprende además células en su interior, a condiciones propicias para el crecimiento de dichas células, para así inducir la formación de tejido.
- 55 14. Una composición farmacéutica, cosmética o cosmeceútica que comprende una pluralidad de moléculas del conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, siendo la composición para su uso en inducir la formación de un tejido *in vivo* tras ponerse en contacto con un tejido y adicionalmente tras someter dicha composición a una temperatura fisiológica.
- 60 15. Un kit para inducir la formación de un tejido, comprendiendo el kit:
- (a) el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5;
- (b) un disolvente acuoso; y
- (c) instrucciones para la reticulación de una solución acuosa de dicho conjugado con el fin de formar un almacén para inducir la formación de dicho tejido.
- 65



FIG. 1A

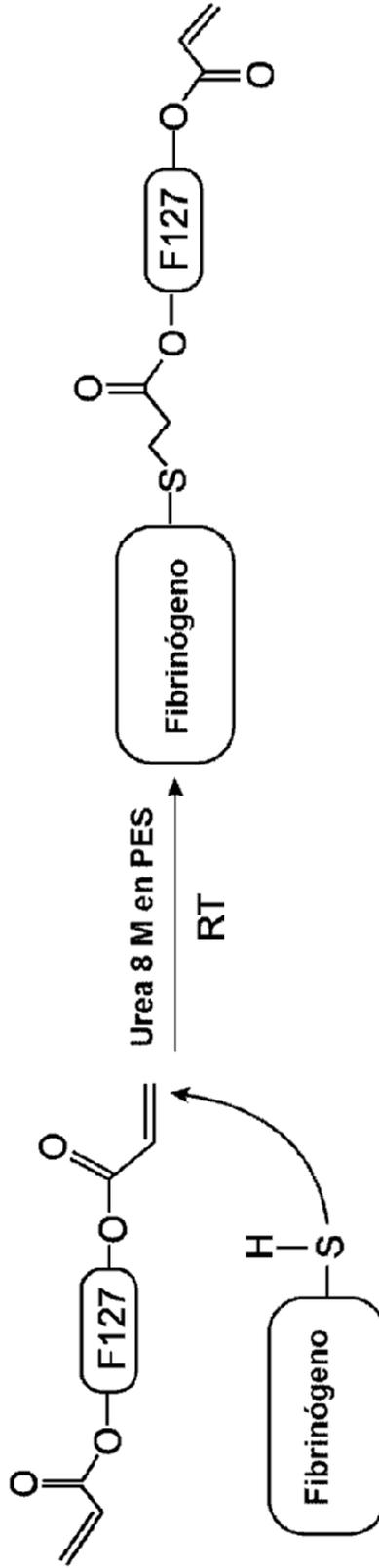


FIG. 1B

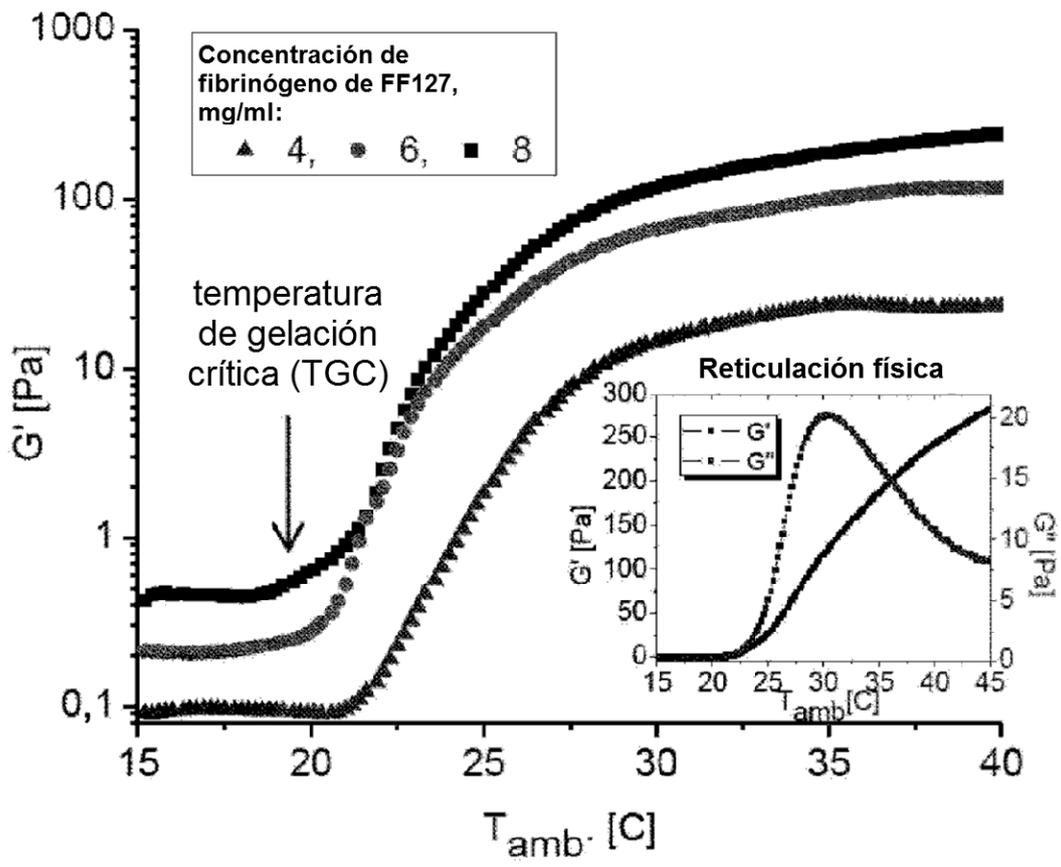
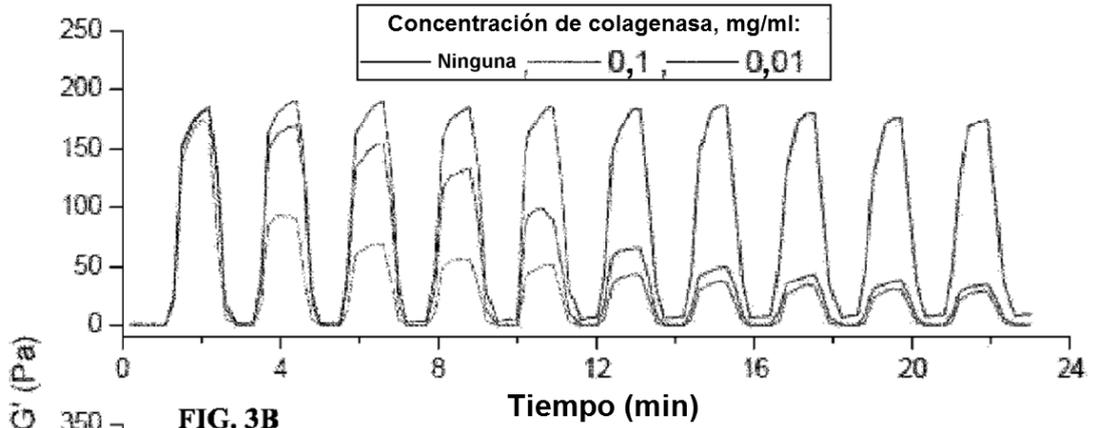
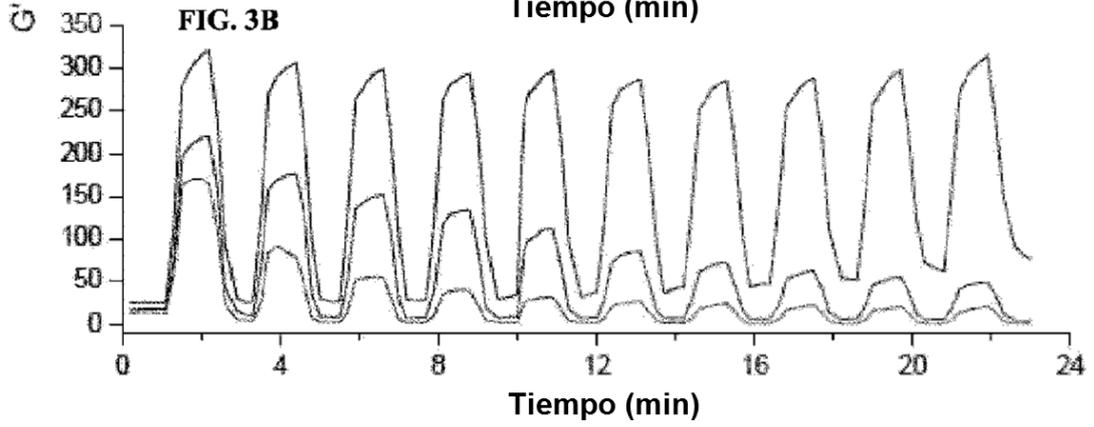


FIG. 2

**FIG. 3A**



**FIG. 3B**



**FIGs. 3A-B**

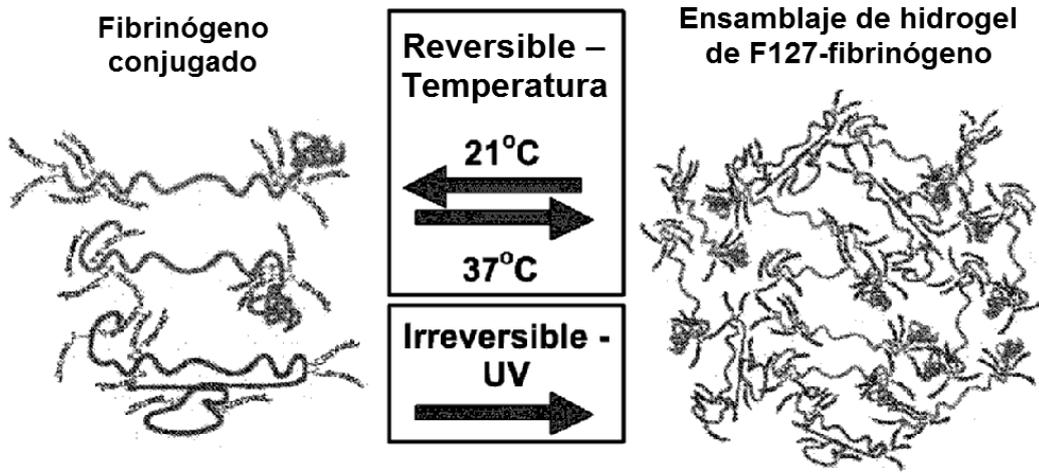


FIG. 4

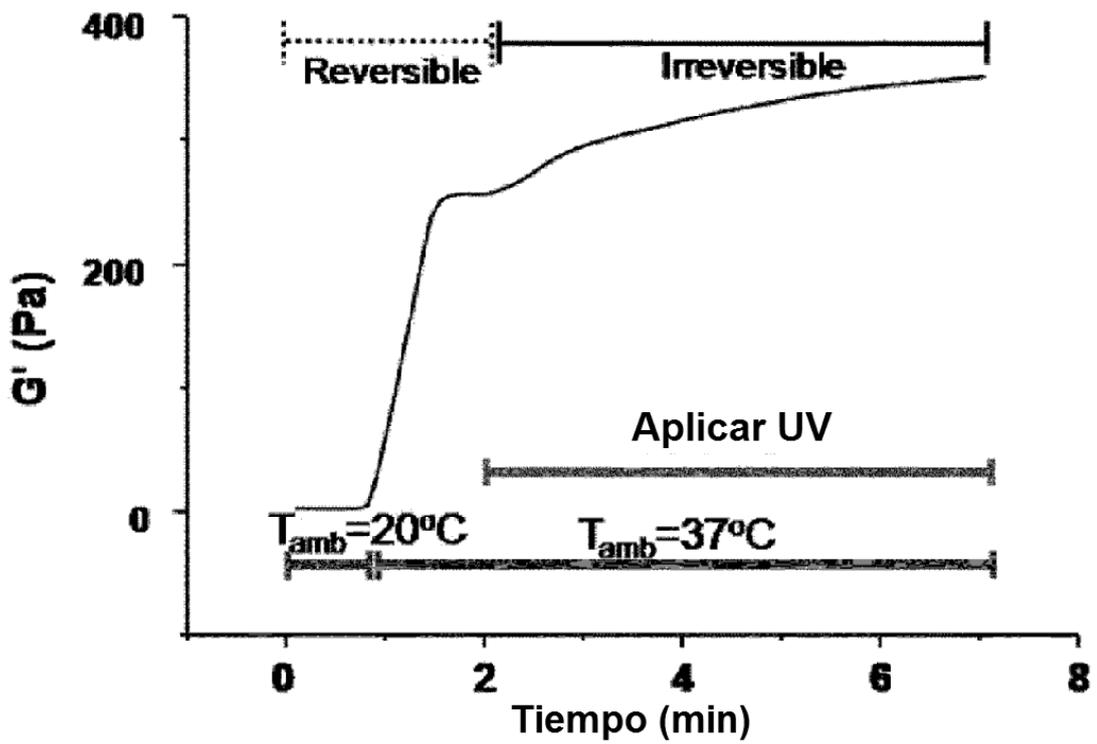


FIG. 5

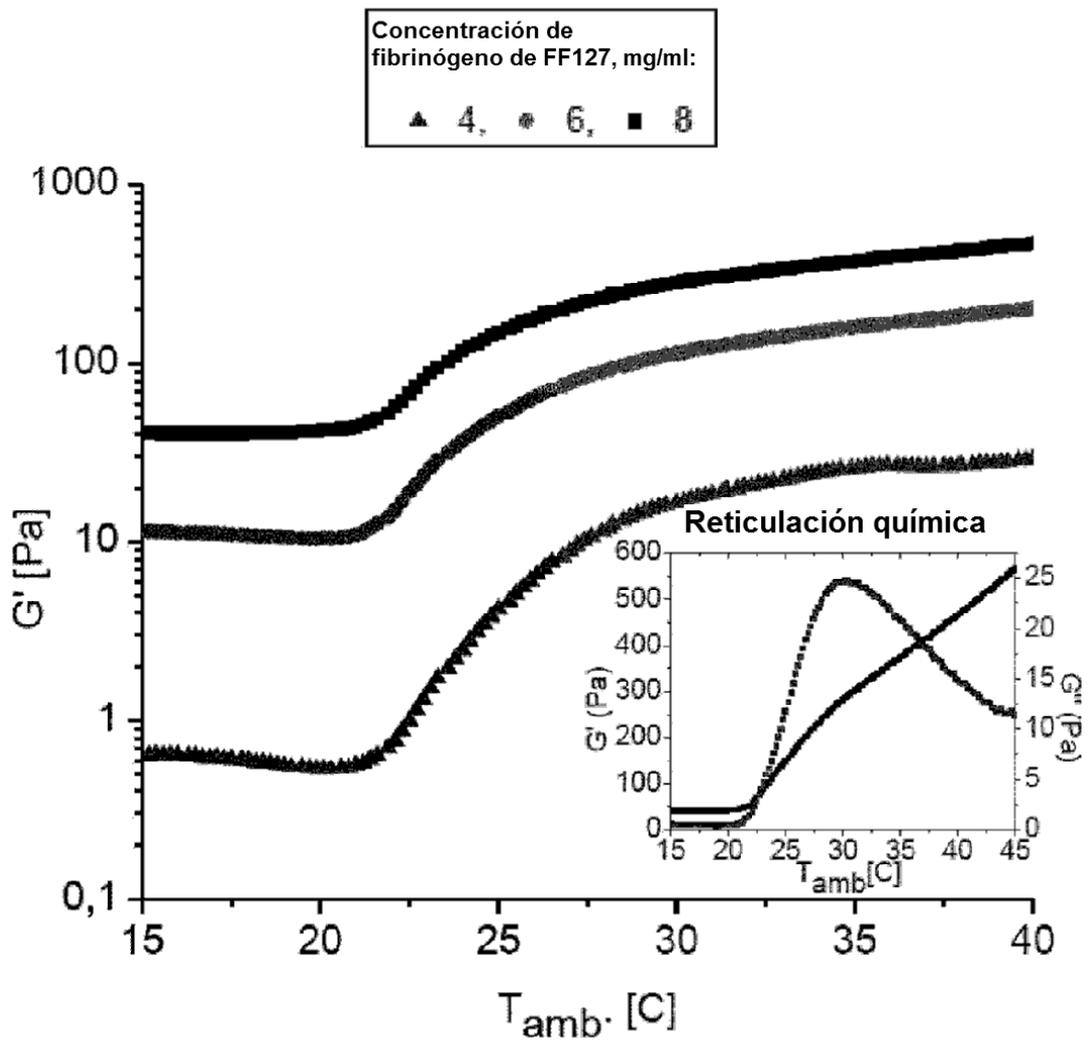


FIG. 6

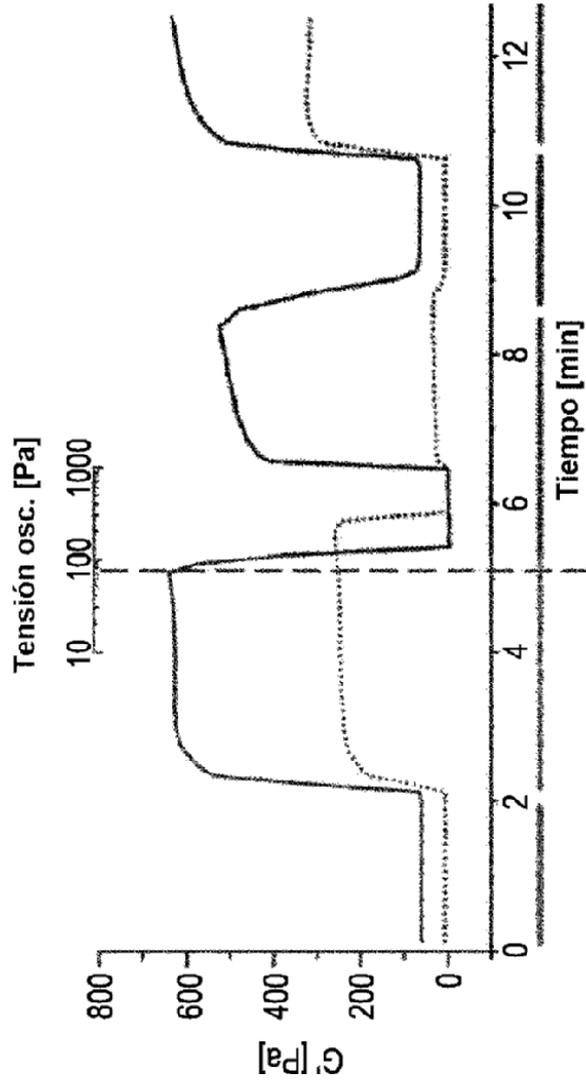


FIG. 7A

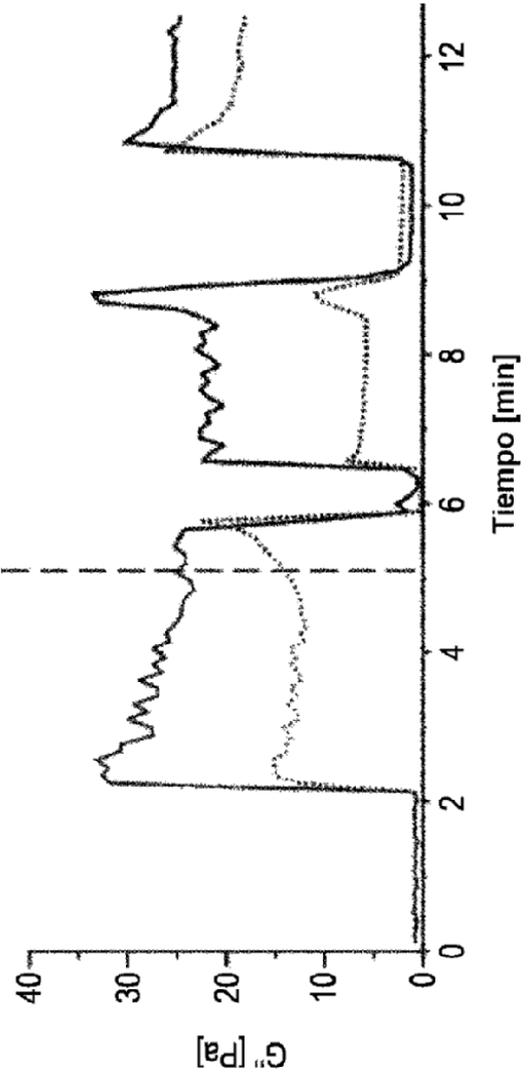


FIG. 7B

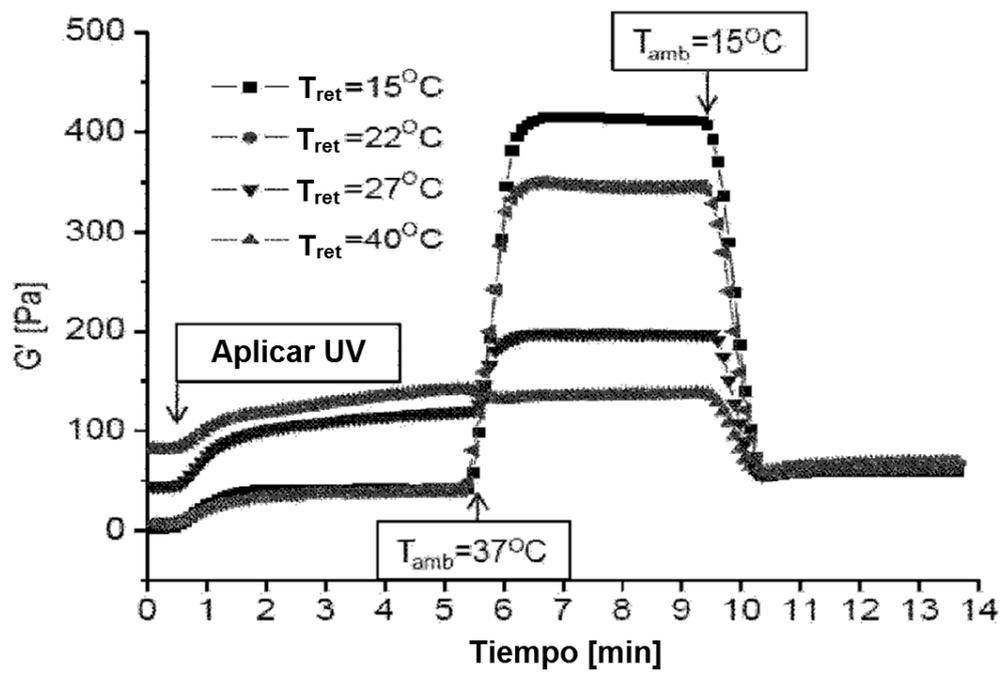


FIG. 8

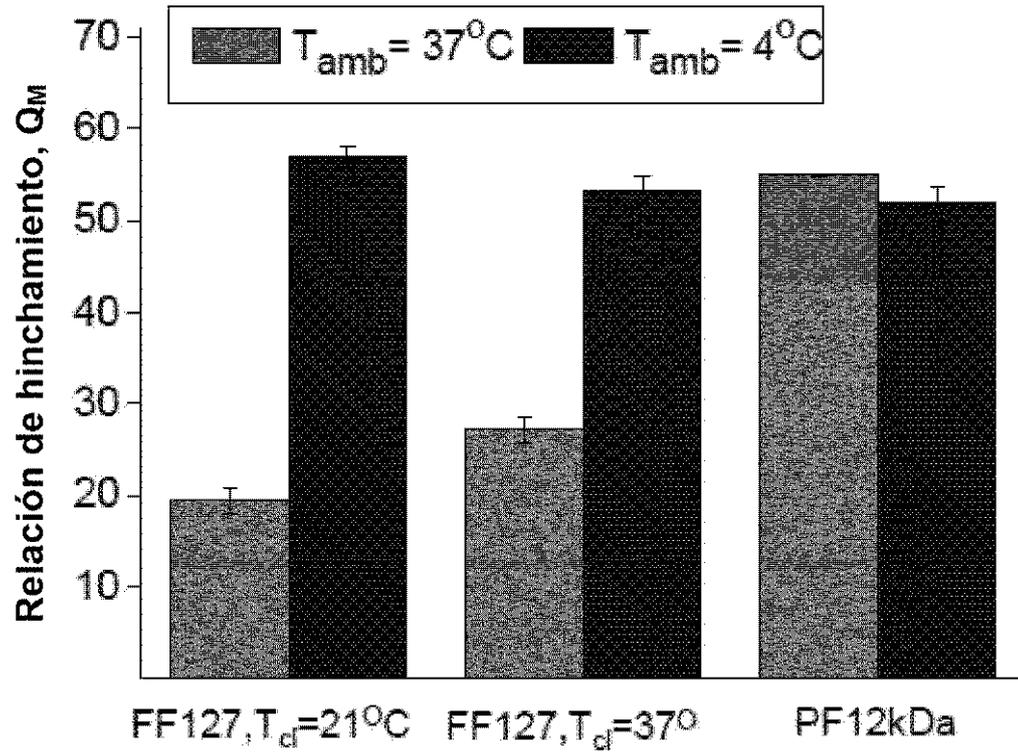


FIG. 9

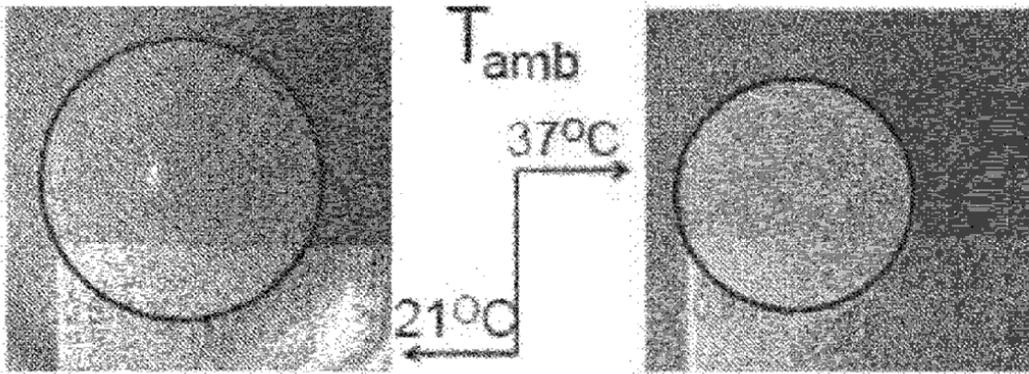


FIG. 10A

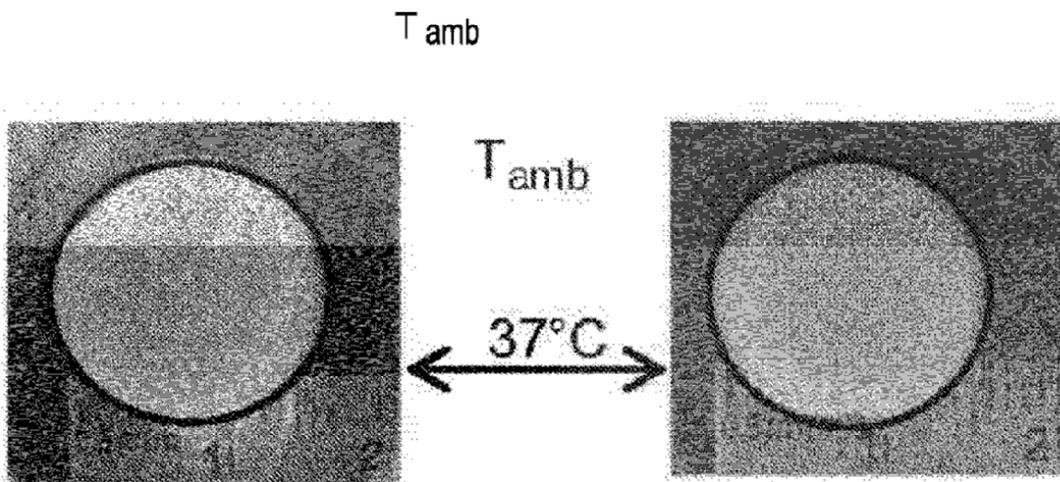


FIG. 10B

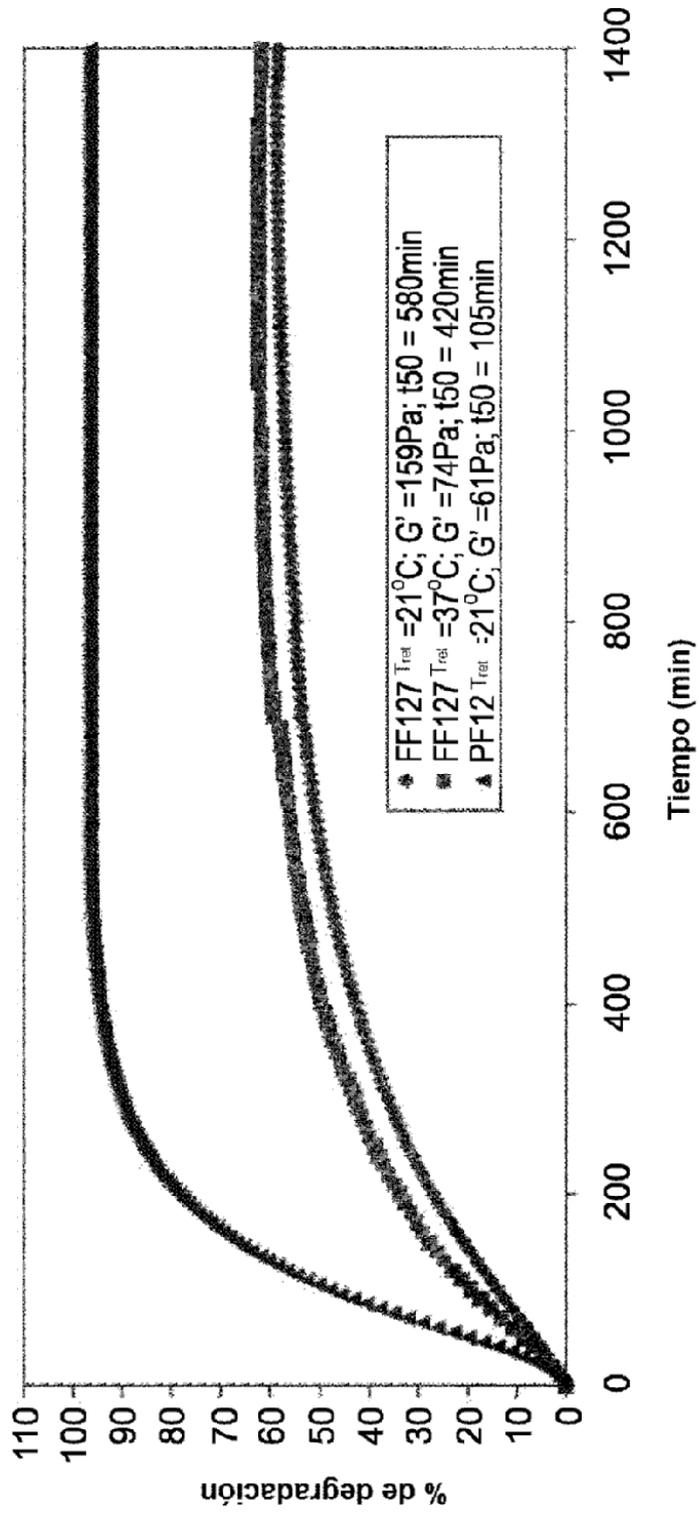


FIG. 11

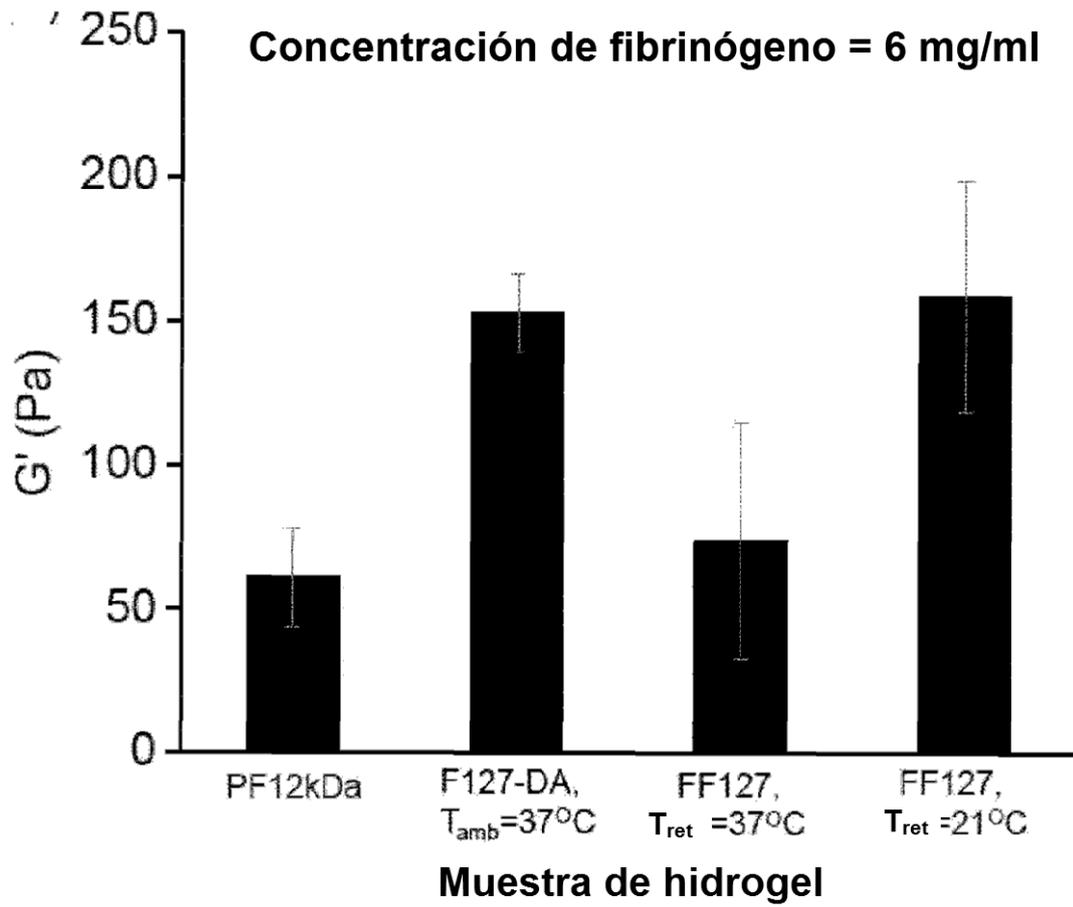


FIG. 12

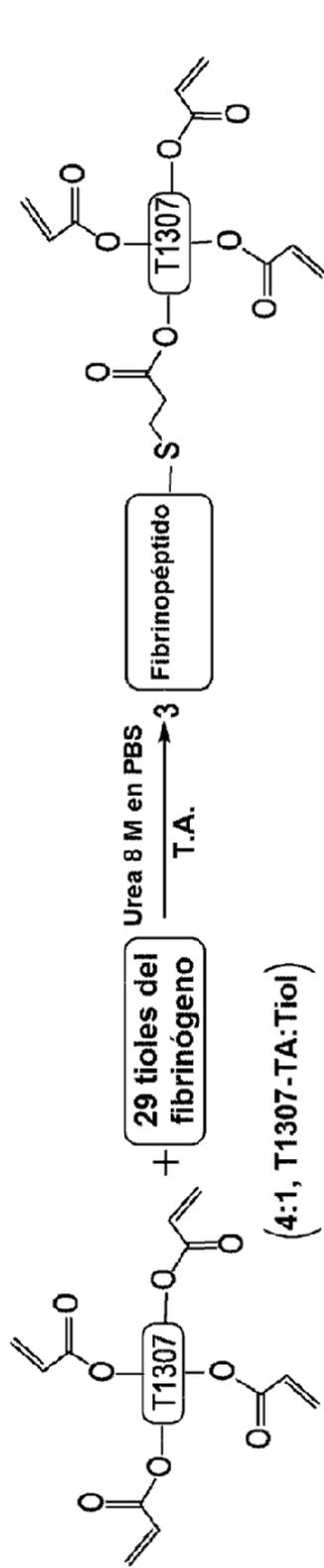


FIG. 13A

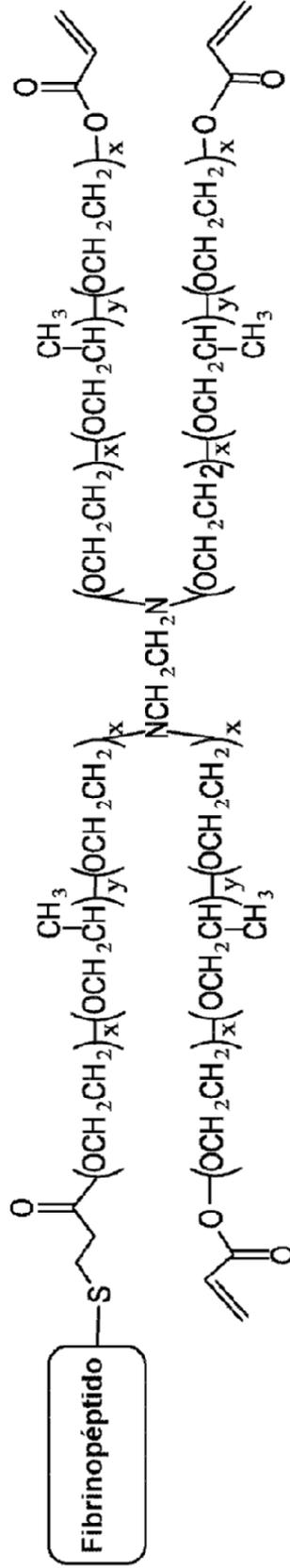


FIG. 13B

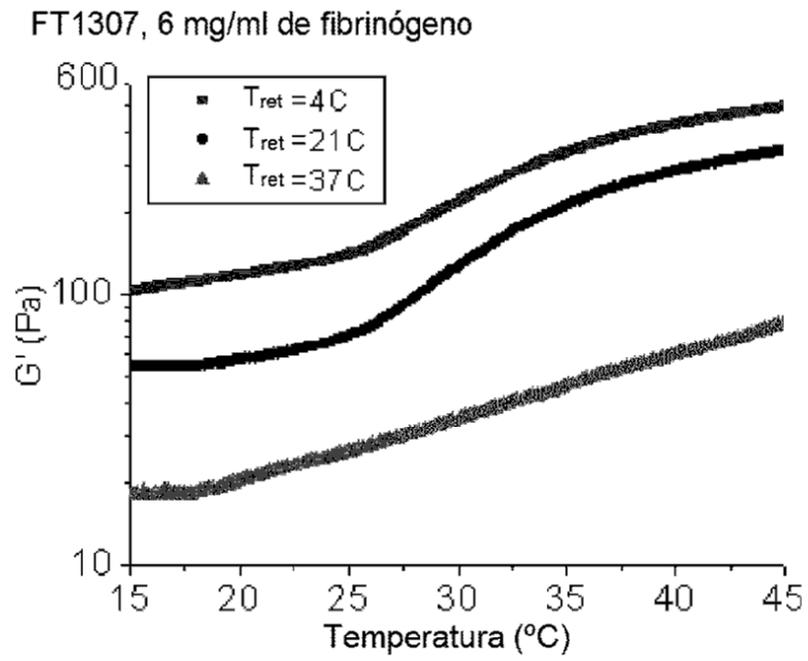


FIG. 14A

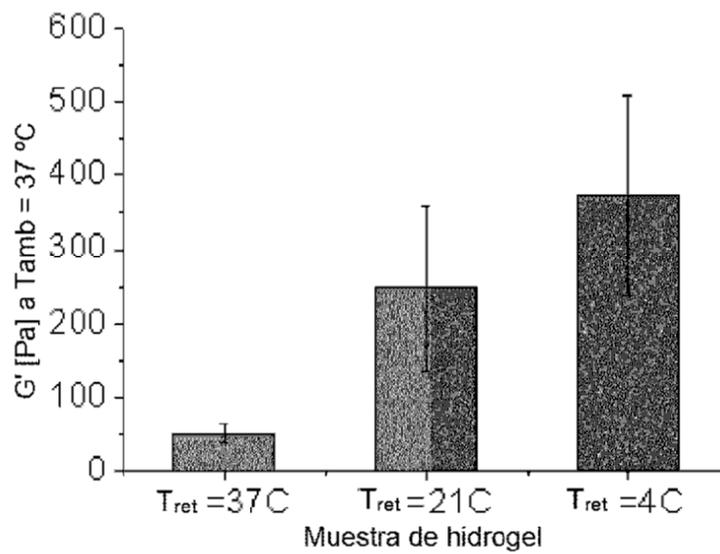


FIG. 14B

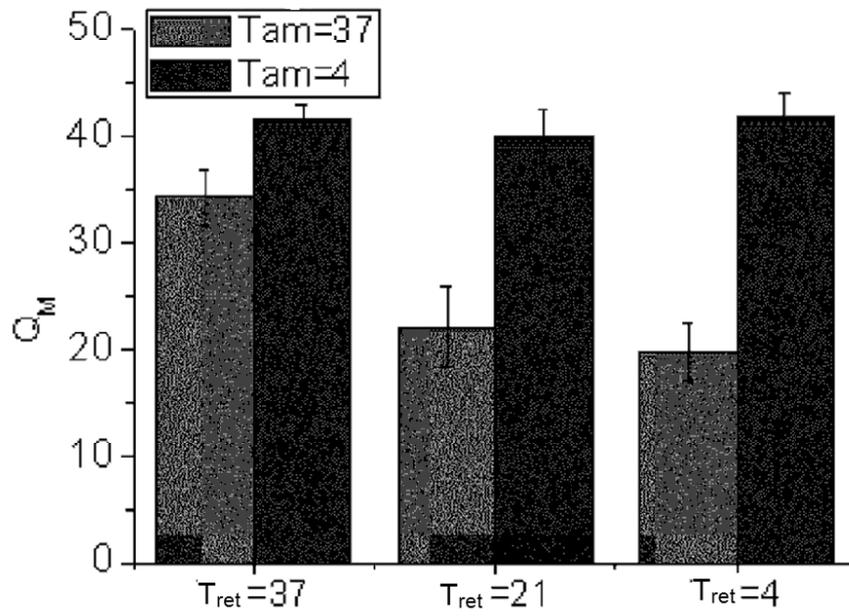


FIG. 15

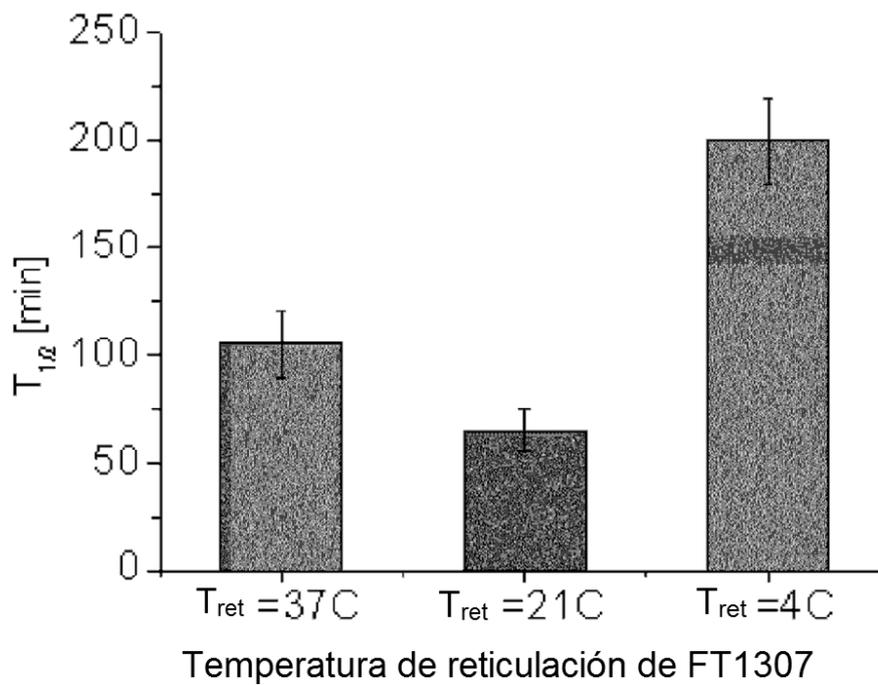
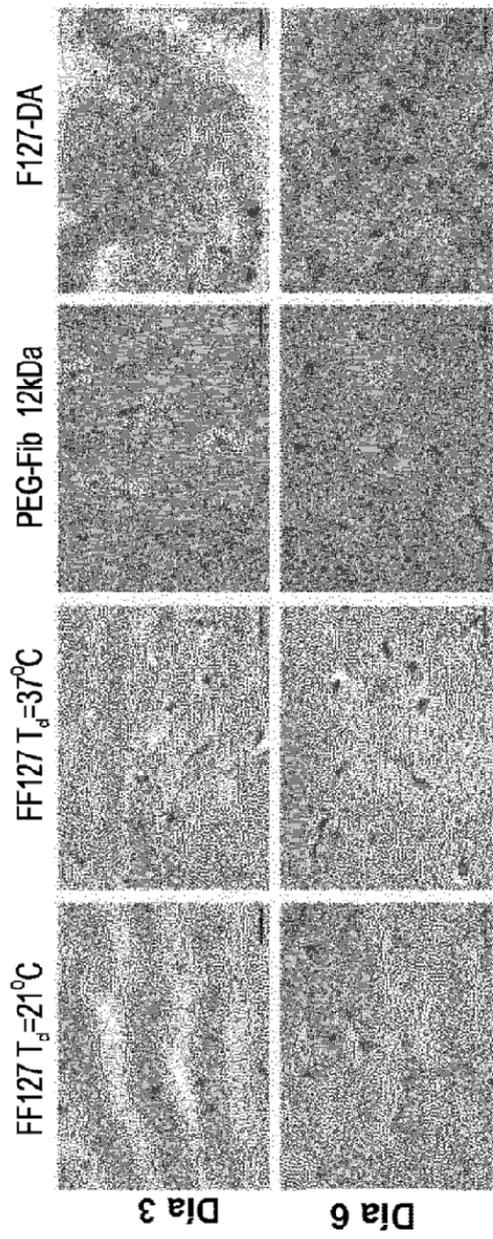
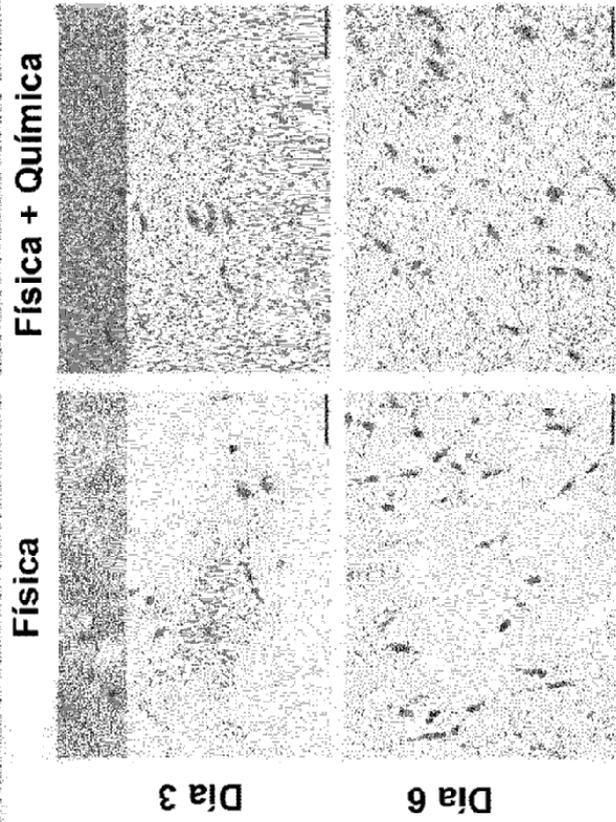


FIG. 16



**FIG. 17**



**FIG. 18**

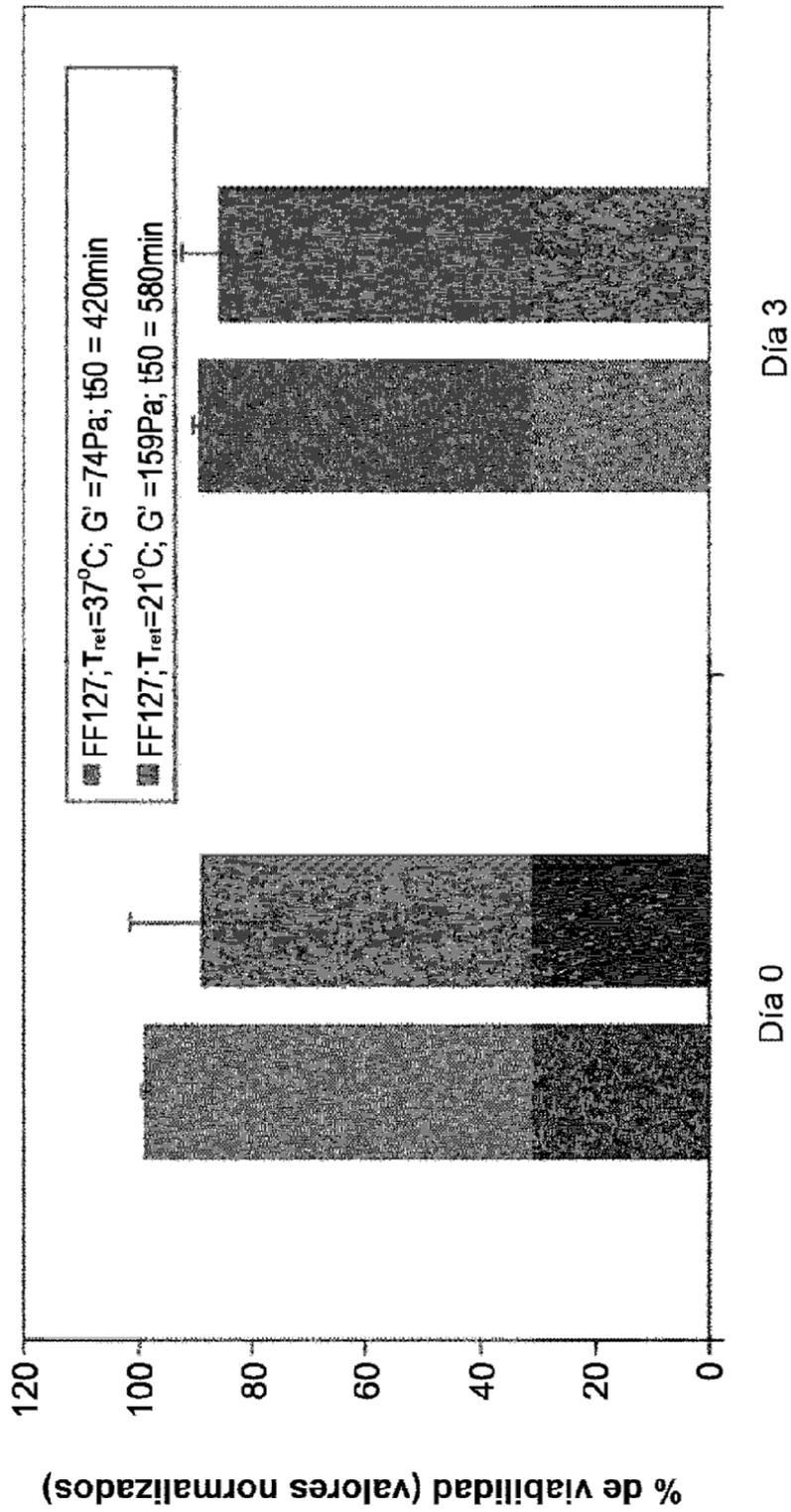


FIG. 19

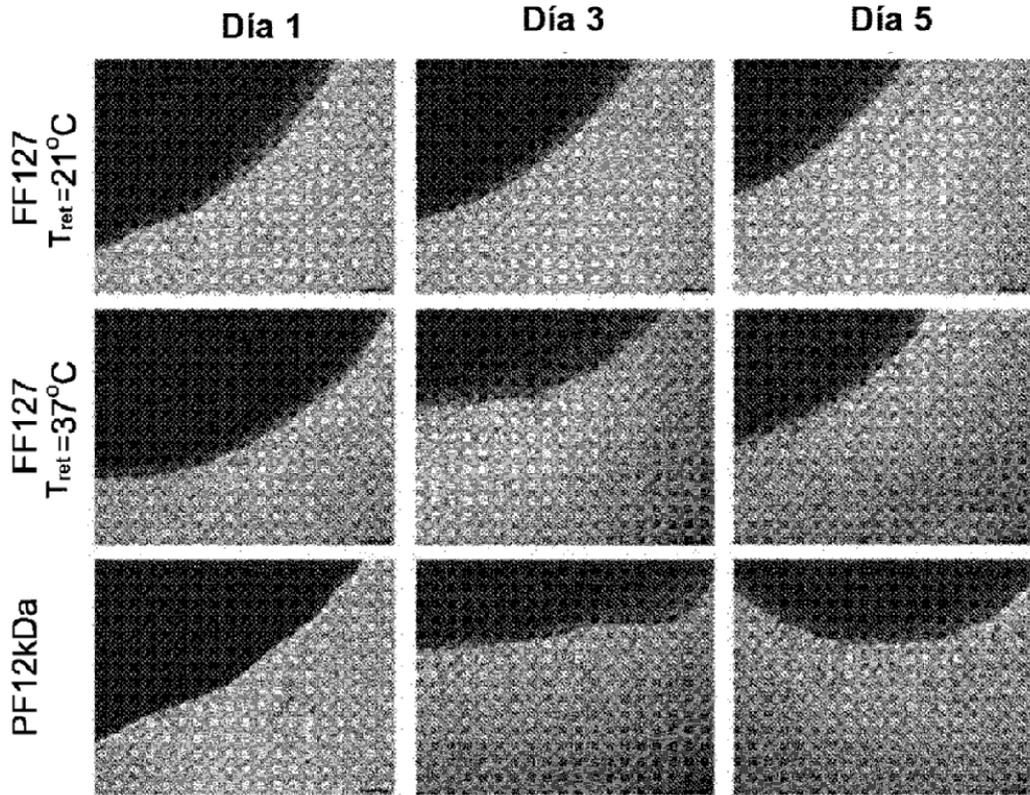


FIG. 20A

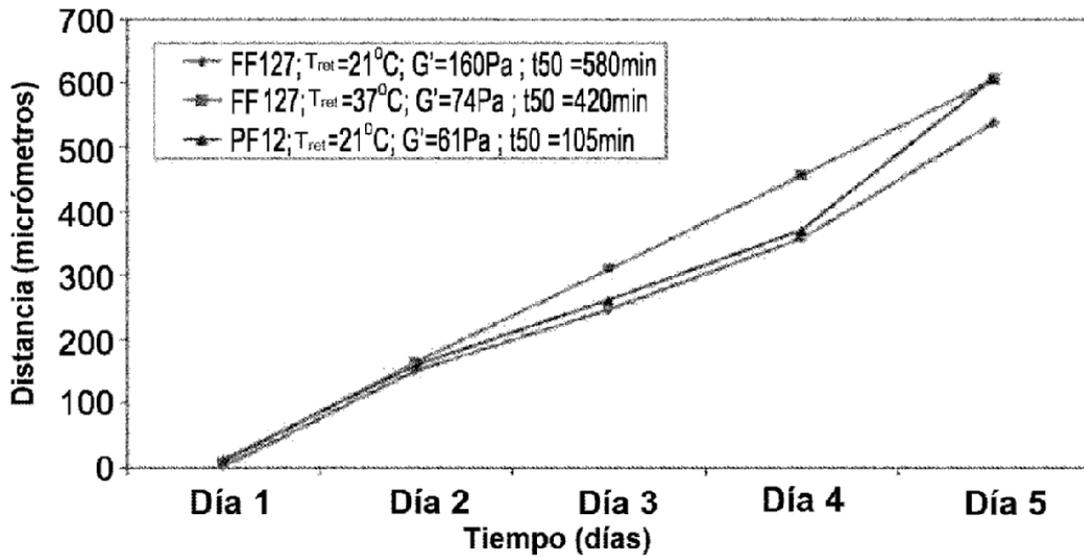


FIG. 20B

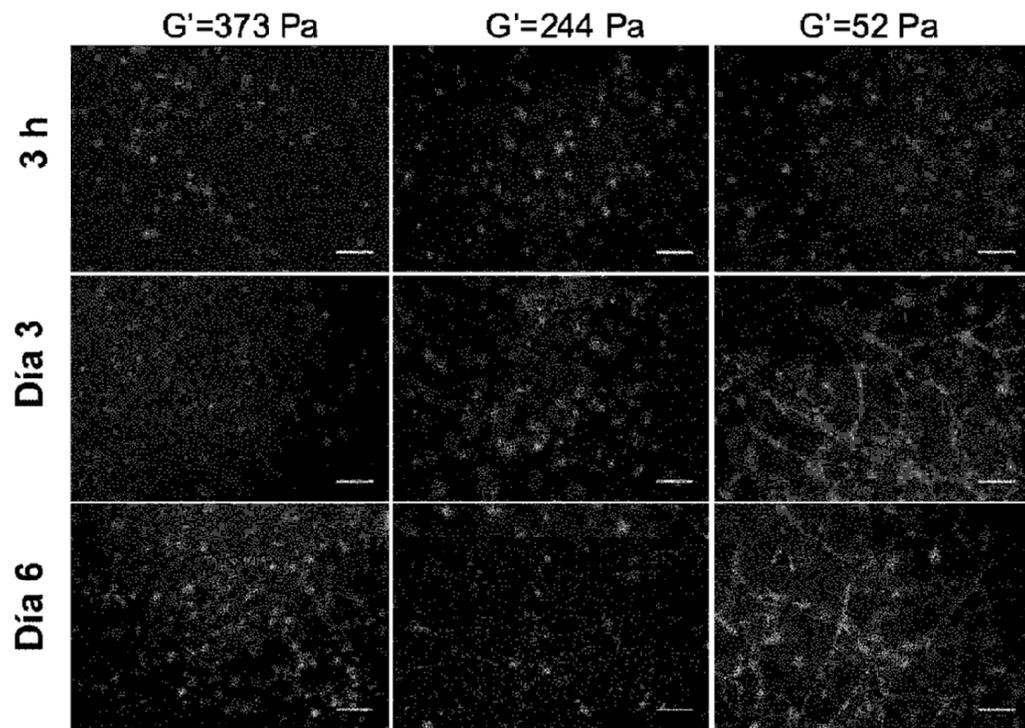


FIG. 21

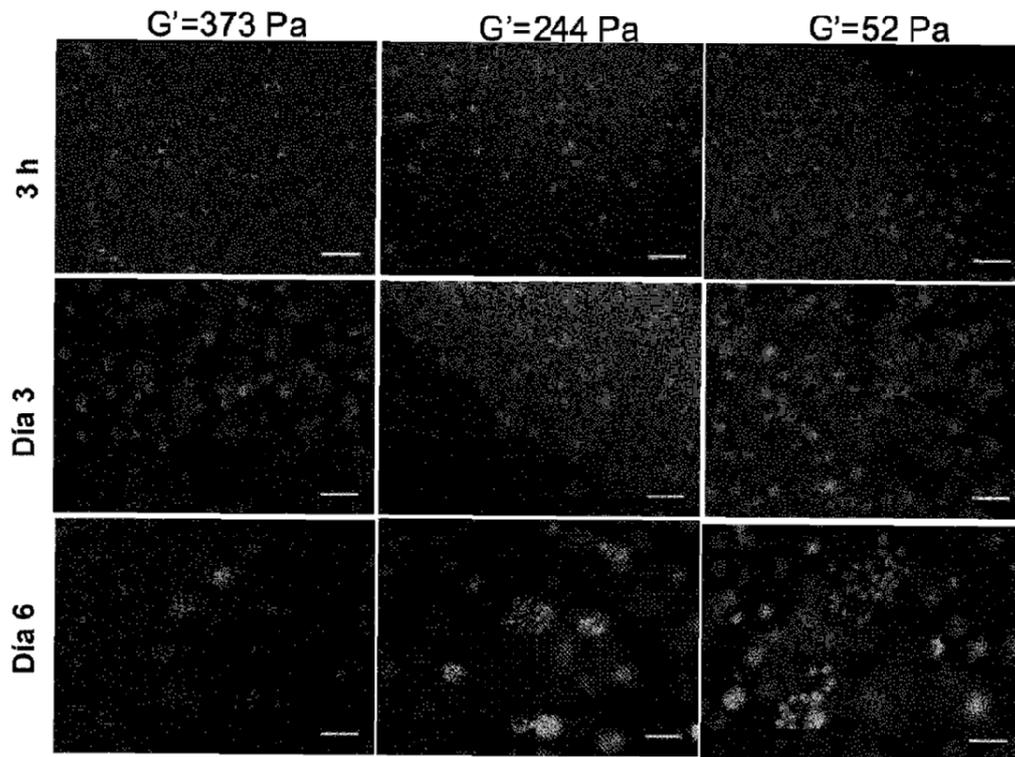


FIG. 22

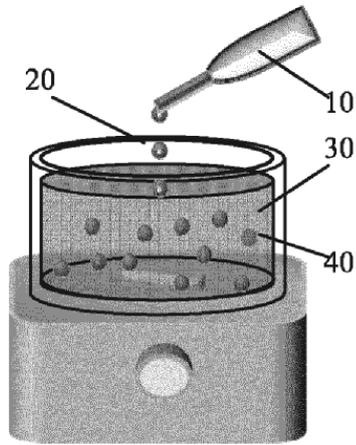


FIG. 23A

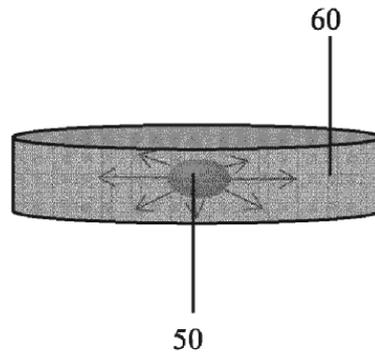


FIG. 23B

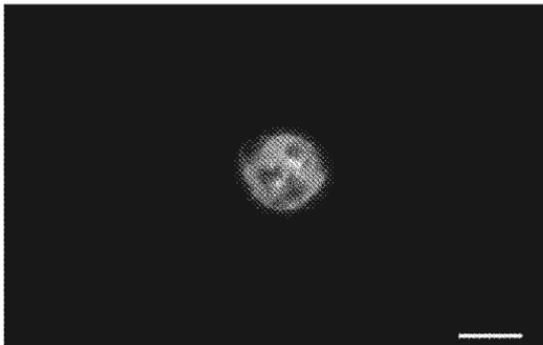


FIG. 24A

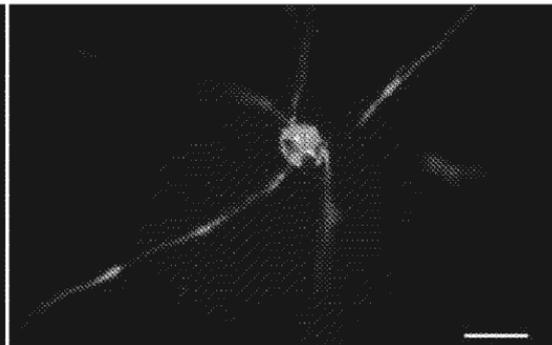


FIG. 24B

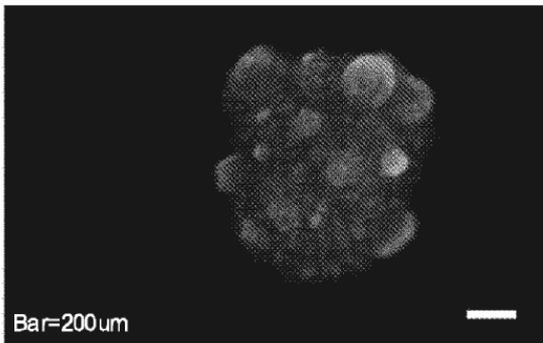


FIG. 25A

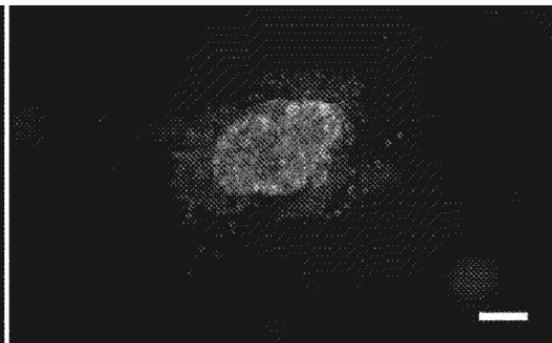
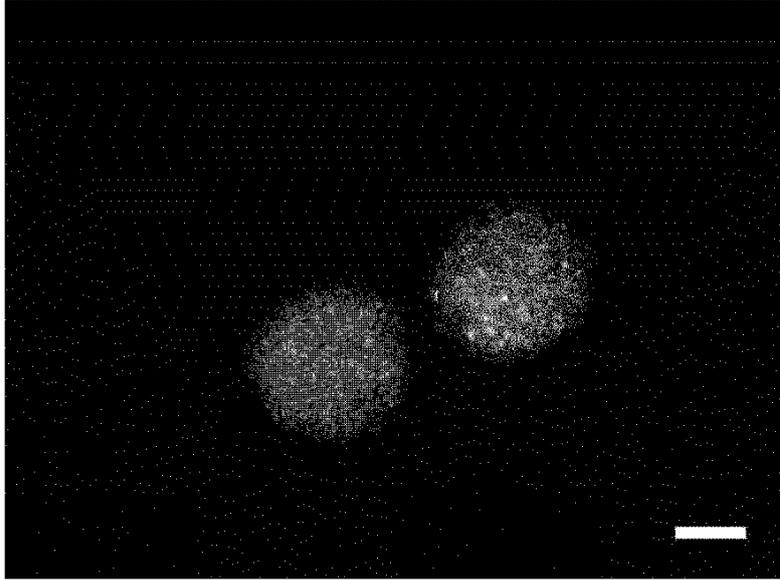
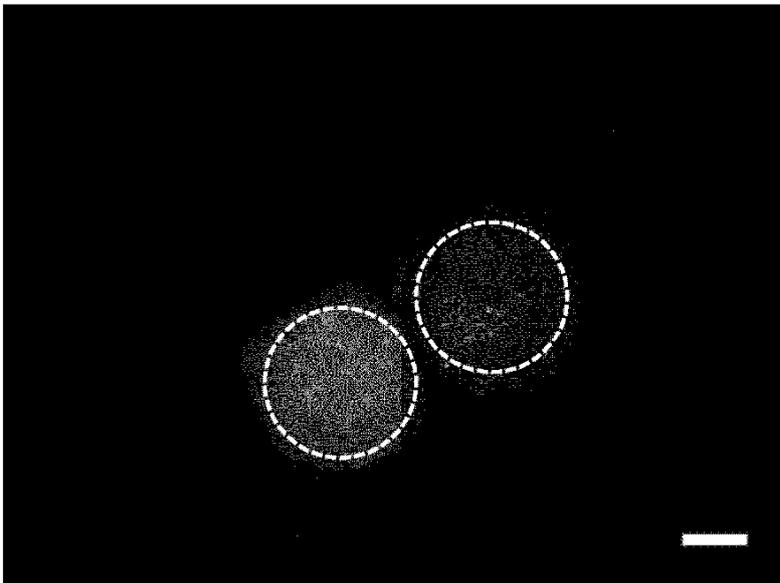


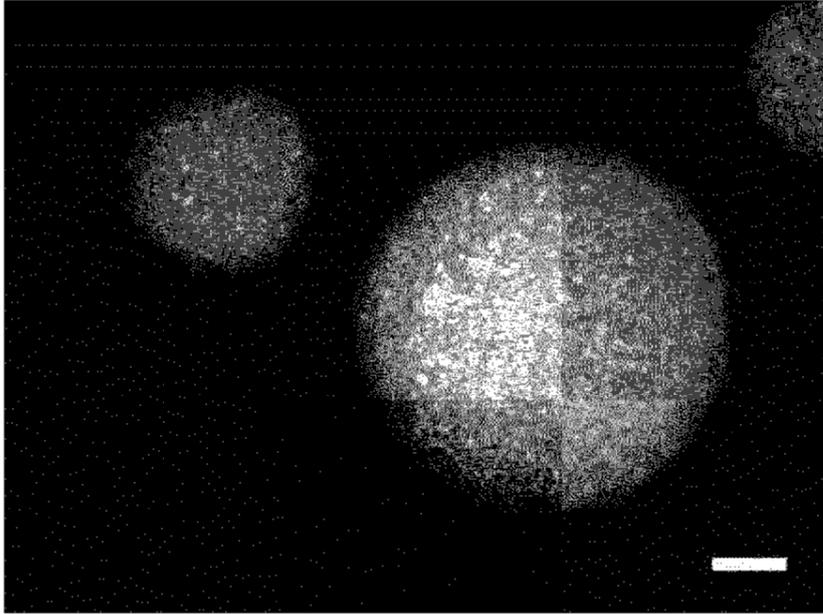
FIG. 25B



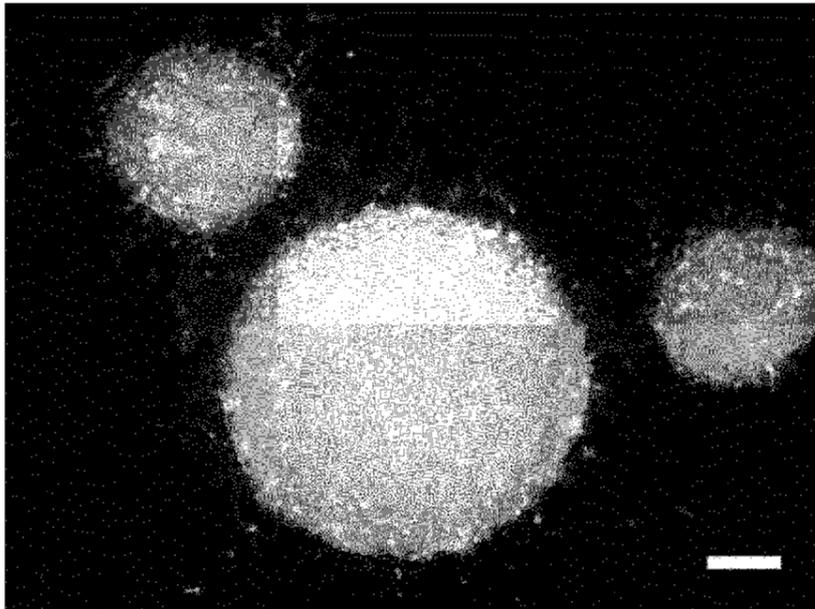
**FIG. 26A**



**FIG. 26B**



**FIG. 27A**



**FIG. 27B**