(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 596 707**

(51) Int. CI.:

A61L 27/22 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2008 E 12167510 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2497505**

(54) Título: **Composiciones y métodos para la formación de armazones**

(30) Prioridad:

16.04.2007 US 907765 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.01.2017

(73) Titular/es:

REGENTIS BIOMATERIALS LTD. (100.0%)
12 Hallan Street, P.O. Box 260, North Industry Zone
3060000 Or-Akiva, IL

(72) Inventor/es:

SELIKTAR, DROR y
GONEN--WADMANY, MAYA

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para la formación de armazones

Campo y antecedentes de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a un armazón que comprende una proteína reticulada mediante un polímero sintético, y más particularmente, pero no exclusivamente, a métodos de generación y uso del mismo en diseño tisular.

El diseño tisular, es decir, la generación *in vitro* de nuevos tejidos vivos, se utiliza ampliamente para reemplazar tejidos enfermos, traumatizados y otros no sanos. La estrategia clásica de diseño tisular utiliza células vivas y un armazón básico para el cultivo celular. Por tanto, la estructura del armazón intenta imitar la estructura natural del tejido, es decir, reemplazar y proporcionar un soporte funcional temporal para las células.

Los armazones de diseño tisular se fabrican a partir de materiales biológicos o sintéticos, tales como polímeros. Los materiales sintéticos, tales como polietilenglicol (PEG), polihidroxiapatita/policaprolactona (HA/PLC), ácido poliglicólico (PGA), ácido poli-L-láctico (PLLA), polimetilmetacrilato (PMMA), polihidroxialcanoato (PHA), poli-4-hidroxibutirato (P4HB), fumarato de polipropileno (PPF), dimetacrilato de polietilenglicol (PEG-DMA), fosfato beta-tricálcico (beta TCP) y politetrafluoroetileno (PTFE) proporcionan un control exacto sobre las otras propiedades mecánicas del material [Drury y Mooney (2003)].

Los métodos habituales de fabricación de armazones se basan en espumas de polímeros sintéticos. Sin embargo, la migración celular en las profundidades de los armazones sintéticos está limitada por la ausencia de oxígeno y de aporte de nutrientes. Para superar dichas limitaciones, se han desarrollado nuevas estrategias que utilizan fabricaciones sólidas de forma libre y una arquitectura vascular interna [Sachlos y Czernuszka (2003)]. Del mismo modo, también se emplean métodos de criodesecación para crear estructuras tridimensionales exclusivas con distinta porosidad y permeabilidad.

Los armazones fabricados con PEG son enormemente biocompatibles [Merrill y Salzman (1983)] y presentan características físicas versátiles basadas en su porcentaje en peso, longitud de cadena molecular y densidad de reticulación [Temenoff *et al*. (2002)]. Además, los hidrogeles de PEG tiene la capacidad de experimentar una transición de líquido a sólido (gelificación) controlada en presencia de una suspensión celular [Elbert y Hubbell (2001)]. Además, la reacción de gelificación con PEG (es decir, PEGilación) puede realizarse en condiciones no tóxicas en presencia de un fotoiniciador [Elisseeff *et al*. (2000); Nguyen y West (2002)] o mezclando una solución reactiva en dos partes de constituyentes de PEG funcionalizados y reticulantes [Lutolf y Hubbell (2003)].

Actualmente se está desarrollando una serie de productos de diseño tisular que se basa en armazones de colágeno, algunos de los cuales han llegado al comercio. Por ejemplo, los geles de colágeno sembrados con fibroblastos se han utilizado como la capa “dérmica” de la piel artificial y se comercializan con la marca registrada APLIGRAFT (Sandoz A G, Basel, Suiza), y se han utilizado esponjas de colágeno como un transportador osteoconductor de la proteína 2 morfogénica ósea (BMP-2) para la espondilodesis y el tratamiento de fracturas de huesos largos.

Los biomateriales basados en colágeno se han formado en fibras, películas, láminas, esponjas y dispersiones de fibrillas. Posiblemente, muchas de estas formas podrían utilizarse como armazones de diseño tisular en la reparación o aumento de tejido corporal.

Los geles de colágeno se fabrican a partir de una red de fibrillas que presentan poca resistencia física y una porosidad tisular superfisiológica. La conformación específica de las fibrillas combinada con la estructura abierta de poros de la red interpenetrante deja a la estructura de la proteína fácilmente accesible y susceptible a proteasas que se difunden libremente desde los tejidos hospedadores circundantes o desde el sistema del cultivo celular. A menudo esto produce un deterioro incontrolado y prematuro del armazón en presencia de proteasas secretadas por las células [Hubbell (2003); Friess (1998); Nicolas y Gagnieu (1997)]. Las discrepancias en cuanto a la estructura y a la susceptibilidad proteolítica de los hidrogeles de proteína reconstituidos, en comparación con los tejidos naturales, aun deja mucho que desear con respecto a los sistemas de armazones biológicos en muchas aplicaciones prácticas de diseño tisular.

Algunas técnicas, para mejorar las propiedades físicas de los geles de colágeno, se basan en reticulaciones covalentes, utilizando aldehídos, carbodiimidas y N-hidroxi-succinimidas (NHS) [Park *et al*. (2002); Ma *et al*. (2004)], por ejemplo. Muchos de los procedimientos de reticulación ofrecen algunas mejoras sobre la estabilidad física y la susceptibilidad enzimática reducida del armazón, pero lo hacen introduciendo una etapa de fabricación citotóxica que requiere lavados exhaustivos y aumenta la probabilidad de que las toxinas residuales presentes en los armazones afecten a la actividad celular [Nimni *et al*. (1987); Friess (1998)].

El colágeno y los geles de fibrina también se han procesado por criodesecación para aumentar la resistencia a la tracción y el módulo de la red proteica [Schoof *et al*. (2001); Buttafoco *et al*. (2006); Pieters *et al*. (2002)]. Fortier y

colaboradores han descrito un proceso unietapa para generar un armazón que comprende albúmina y polietilenglicol, que tiene una enzima inmovilizada [Jean-Francois y Fortier (1996); Jean-Francois *et al*. (1997); Gayet y Fortier (1995); D'Urso *et al*. (1995)].

El documento WO 1995/015352 describe un hidrogel que comprende albúmina y óxido de polietileno bifuncionalizado.

El documento WO 2005/061018 describe un armazón que comprende una proteína de origen natural tal como fibrinógeno reticulado con PEG, uniendo moléculas de PEG modificadas a restos de cisteína de la proteína.

Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una composición de materia que comprende una molécula precursora de polímero-proteína que comprende dicha albúmina no tiolada y al menos dos polímeros sintéticos unidos de manera covalente a dicha albúmina, teniendo cada uno de los al menos dos polímeros sintéticos un grupo funcional, seleccionándose el grupo funcional de manera que pueda ser capaz de reticularse con un grupo funcional de al menos otro polímero sintético que está unido de manera covalente a al menos otra molécula precursora que comprende albúmina no tiolada-polímero para formar un armazón.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un armazón formado por reticulación de una composición de materia descrita anteriormente en el presente documento.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un armazón que comprende una pluralidad de moléculas de albúmina no tiolada y una pluralidad de polímeros sintéticos unidos de manera covalente a dichas moléculas de albúmina no tiolada, estando cada una de las moléculas de albúmina no tioladas unidas de manera covalente a al menos dos de los polímeros sintéticos, en el que los polímeros sintéticos están reticulados.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un hidrogel formado a partir de un armazón descrito anteriormente en el presente documento.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una composición cosmética que comprende el hidrogel descrito anteriormente en el presente documento.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un uso de una composición de materia, un armazón o hidrogel descritos anteriormente en el presente documento, para la fabricación de un medicamento identificado para la reparación de lesión tisular.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la lesión tisular se asocia con un trastorno seleccionado del grupo que consiste en cirrosis hepática, diabetes de tipo 1, fibrosis quística, cáncer de hueso, reparación de quemaduras y heridas, degeneración macular relacionada con la edad, cicatrización, infarto de miocardio, reparación miocárdica, lesiones del SNC, defectos del cartílagos articular, degeneración de la vejiga y degeneración intestinal.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el medicamento identificado para la reparación de la lesión tisular es un adhesivo.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la lesión tisular es un cosmético.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el grupo funcional se selecciona del grupo que consiste en acrilato y vinil sulfona.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, cada uno de los polímeros sintéticos comprende de 1 a 7 grupos acrilato.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de generación de un armazón, comprendiendo el método:

(a) la unión de manera covalente de albúmina no tiolada a al menos dos polímeros sintéticos por medio de un primer grupo funcional de los al menos dos polímeros sintéticos, teniendo cada uno de los al menos dos polímeros sintéticos un segundo grupo funcional, para obtener de este modo una molécula precursora de albúmina no tiolada-polímero; y a continuación
(b) la reticulación de una pluralidad de las moléculas precursoras para generar de este modo el armazón.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método descrito anteriormente en el presente documento comprende adicionalmente retirar la forma no conjugada del polímero sintético antes de la etapa (b).

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el primer grupo funcional de los polímeros sintéticos está unido de manera covalente a un resto de cisteína de la albúmina no tiolada.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el primer y segundo grupos funcionales son idénticos.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el primer y segundo grupos funcionales se seleccionan del grupo que consiste en acrilato y vinil sulfona.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, los polímeros sintéticos comprenden PEG que tiene de 2 a 8 grupos acrilato.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la albúmina no tiolada está desnaturaliza.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el armazón comprende al menos el 0,5% de albúmina no tiolada por peso seco.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el armazón o hidrogel descrito anteriormente en el presente documento comprende adicionalmente células vivas embebidas en su interior.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el polímero sintético se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), policaprolactona (PLC), ácido poliglicólico (PGA), ácido poli-L-láctico (PLLA), polimetilmetacrilato (PMMA), polihidroxi alcanoato (PHA), poli-4-hidroxibutirato (P4HB), fumarato de polipropileno (PPF) y politetrafluoroetileno (PTFE), y copolímeros de los mismos.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el polímero sintético es PEG.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención el PEG tiene un peso molecular en el intervalo de 4 kDa a 20 kDa.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el grupo funcional se selecciona de manera que pueda ser capaz de reticularse con un grupo funcional de al menos otro polímero sintético por polimerización en cadena.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el armazón es biodegradable.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, una concentración de la composición de materia está en un intervalo de 1 mg/ml a 200 mg/ml.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la reticulación es por iluminación con luz ultravioleta.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la reticulación comprende adicionalmente añadir un fotoiniciador.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la reticulación comprende reticular una pluralidad de moléculas precursoras con una pluralidad de polímeros sintéticos, teniendo cada uno de los polímeros sintéticos al menos dos grupos funcionales, seleccionándose dichos grupos funcionales de manera que puedan ser capaces de reticularse con un grupo funcional de las moléculas precursoras.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, una concentración de la pluralidad de polímeros sintéticos está en un intervalo de 1 mg/ml a 150 mg/ml.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y/o científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el habitualmente entendido por un experto habitual en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Aunque en la realización práctica o en ensayos de realizaciones de la invención pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, más adelante se describen ejemplos de métodos y/o materiales. En caso de conflicto, se controlará la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser necesariamente limitantes.

Breve descripción de las figuras

Algunas realizaciones de la invención se describen en el presente documento, únicamente a modo de ejemplo, con referencia a las imágenes acompañantes. Con referencia específica ahora a las imágenes con detalle, cabe destacar las particularidades se muestran a modo de ejemplo y con fines ilustrativos del análisis de realizaciones de la invención. En este sentido, la descripción tomada con las imágenes pone de manifiesto para los expertos en la técnica cómo pueden llevarse a la práctica las realizaciones de la invención.

En las imágenes:

La FIGURA 1 presenta imágenes que muestran los resultados de una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de colágeno, albúmina y fibrinógeno tiolado PEGilado y no PEGilado; el carril “a” muestra la proteína PEGilada y el carril “b” muestra la proteína no PEGilada;
La FIGURA 2 presenta un gráfico que muestra el módulo de almacenamiento (G’) de la albúmina PEGilada (Alb-PEG), fibrinógeno PEGilado (Fib-PEG) y colágeno tiolado PEGilado (Col-PEG) en función del tiempo, antes y durante la iluminación con luz ultravioleta (UV);
La FIGURA 3 presenta un gráfico que muestra la degradación de hidrogeles de albúmina PEGilada (Alb-PEG), fibrinógeno PEGilado (Fib-PEG) y colágeno PEGilado (Col-PEG) tiolado en función del tiempo en una solución de colagenasa;
Las FIGURAS 4A-F presentan micrografías con contraste de fase de células de músculo liso en hidrogeles de albúmina PEGilada (Figuras 4A y 4B), colágeno tiolado PEGilado (Figuras 4C y 4D) y fibrinógeno PEGilado (Figuras 4E y 4F), 2 horas (Figuras 4A, 4C y 4E) y 24 horas (Figuras 4B, 4D y 4F) después de sembrar células en hidrogeles; se observa propagación parcial 2 horas después de la siembra (Figuras 4C y 4E) y propagación completa 24 horas después de la siembra (Figuras 4D y 4F) en hidrogeles de colágeno tiolado y fibrinógeno mientras que no se observa propagación en hidrogel de albúmina; las barras de escala son equivalen a 500 µm;
Las FIGURAS 5A-I presentan micrografías con contraste de fase de células de músculo liso encapsuladas en hidrogeles de albúmina PEGilada (Figuras 5A-C), colágeno tiolado PEGilado (Figuras 5D-F) y fibrinógeno PEGilado (Figuras 5G-I), mostrando células redondas inmediatamente después de la siembra de las células en los hidrogeles (Figuras 5A, 5D y 5G); 4 horas después de la siembra se observan células con algunas extensiones (Figuras 5E y 5H), y 24 horas después de la siembra (Figuras 5G y 5I) se observan células completamente extendidas y muy ahusadas en hidrogeles de fibrinógeno y colágeno tiolado mientras que las células en el hidrogel de albúmina continúan siendo redondas; las barras de escala equivalen a 500 µm; y
Las FIGURAS 6A-C presentan micrografías con contraste de fase (Figuras 6A y 6B) y un gráfico (Figura 6C) que muestra la invasión de células de músculo liso desde tejido denso (oscuro) al interior de hidrogeles de colágeno tiolado PEGilado (Col-PEG), fibrinógeno PEGilado (Fib-PEG) y albúmina PEGilada (Alb-PEG) (transparente); la Figura 6A muestra un aumento gradual en la distancia cubierta por células de musculo liso invasoras durante 5 días (las barras de escala equivalen a 500 µm); la Figura 6B muestra imágenes a gran aumento de áreas invadidas en hidrogeles de fibrinógeno y colágeno tiolado (las barras de escala equivalen a 100 µm); la Figura 6C presenta un gráfico de las distancias cubiertas por las células de musculo liso invasoras en hidrogeles de fibrinógeno y colágeno tiolado en función del tiempo.

Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente invención se refiere a un armazón que comprende una proteína reticulada por un polímero sintético, y más particularmente, pero no exclusivamente, a métodos de generación y uso del mismo tal como en diseño tisular.

Los principios y operativa del método de generación de un armazón de acuerdo con la presente invención puede entenderse mejor con referencia a los dibujos y a las descripciones acompañantes.

Antes de explicar al menos una realización de la invención con detalle, ha de entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ilustrados por los Ejemplos. La invención puede tener otras realizaciones o puede llevarse a cabo o realizarse de diversas maneras. Además, ha de entenderse que la fraseología y terminología empleadas en el presente documento es con fines descriptivos y no deben considerarse como limitantes.

Aunque reduciendo la presente invención a la práctica y mediante una experimentación laboriosa, los autores de la misma pudieron sintetizar armazones híbridos biosintéticos compuestos de una estructura de colágeno tiolado (que no forma parte de la invención) o de albúmina con cadenas laterales de polietilenglicol (PEG) funcionales. Estos armazones son excelentes armazones biodegradables y pueden utilizarse en diversas aplicaciones clínicas y de investigación.

Como se muestra más adelante en la sección de Ejemplos, los autores de la presente invención generaron moléculas precursoras de colágeno-PEG y de albúmina-PEG que posteriormente se utilizaron para formar armazones de hidrogel. Las moléculas precursoras pueden transformarse rápidamente en un hidrogel (Figura 2) y son biodegradables (Figura 3). Los armazones de colágeno-PEG presentan un soporte fuerte para la propagación y extensión celular (Figuras 4C-D, 5D-F y 6A-C), mientras que los armazones de albúmina-PEG presentan resistencia a la propagación y extensión celular (Figuras 4A-B, 5A -C y 6A). La variedad de propiedades exhibidas permite seleccionar hidrogeles apropiados para propósitos particulares, así como combinar diferentes tipos de moléculas precursoras para obtener hidrogeles que tengan propiedades intermedias.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto de realizaciones de la presente invención, se proporciona una molécula precursora de albúmina no tiolada-polímero que tiene la capacidad de reticularse con al menos otra molécula precursora de proteína-polímero para formar un armazón.

Como se usa en el presente documento, el término “tiolato” se refiere a la modificación de una molécula (por ejemplo, una proteína) de tal manera que la molécula modificada comprende más grupos tiol que la molécula no modificada.

Los expertos en la técnica conocerán diversos métodos de tiolación de una proteína. En una realización ejemplar, restos de lisina de la proteína se tiolan uniéndose de manera covalente a un residuo (por ejemplo, HS-CH_2-C(=O)-) que comprende un grupo tiol. Los grupos amina de los restos de lisina son particularmente adecuados para reaccionar con un residuo que comprende un grupo tiol, por ejemplo, mediante reacción nucleófila con un reactivo tiolante. Como un ejemplo, la tiolación de colágeno con succinimidil acetiltioacetato (SATA) se demuestra en los Ejemplos mostrados más adelante en el presente documento (en la sección titulada “tiolación y PEGilación de colágeno”).

Como se usa en el presente documento, el término “tiol” se refiere a un grupo -SH.

Como se usa en el presente documento, se dice que un residuo que está unido a un grupo tiol describe un -S-M, en el que M es la fracción unida a un grupo tiol.

Como se usa en el presente documento, el término “proteína” incluye cualquier polipéptido de origen natural que comprende al menos 10 restos peptídicos, así como sus fragmentos biológicamente activos (por ejemplo, fragmentos que inducen la adhesión celular y/o señalización celular). Los fragmentos biológicamente activos pueden generarse mediante cualquier método conocido en la técnica (por ejemplo, escisión mediante una enzima y/o un reactivo químico).

De acuerdo con otra realización de la presente invención, la molécula precursora de polímero-proteína comprende una molécula de albúmina no tiolada y al menos dos polímeros sintéticos unidos de manera covalente a la molécula de albúmina no tiolada, teniendo cada uno de los al menos dos polímeros sintéticos un grupo funcional, seleccionándose el grupo funcional de manera que pueda ser capaz de reticularse con un grupo funcional de al menos otro polímero sintético unido de manera covalente a una molécula de albúmina no tiolada de al menos otra molécula precursora de albúmina no tiolada-polímero para formar un armazón.

La albúmina es albúmina no tiolada.

De acuerdo con una realización opcional de la presente invención, la albúmina está desnaturaliza.

Sin ligarse a ninguna teoría particular, se piensa que las proteínas desnaturalizadas tienen típicamente más sitios disponibles para unirse a polímeros sintéticos.

Las proteínas pueden desnaturalizarse mediante diversos métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las proteínas pueden desnaturalizarse por calentamiento o exposición a agentes desnaturalizantes, tales como urea o cloruro de guanidinio. Como se ilustra con ejemplos a continuación en el presente documento, la proteína puede desnaturalizarse en una solución que comprenda urea 8 M.

El término “polímero” se refiere a una molécula compuesta principalmente de una pluralidad de unidades de repetición. La frase “polímero sintético” se refiere a cualquier polímero que esté fabricado de un material sintético, es decir, un material no natural, no celular.

Los polímeros sintéticos de este aspecto de la presente invención pueden ser idénticos o diferentes. Cada uno de los polímeros sintéticos en la composición de materia puede comprender opcionalmente un grupo funcional que une el polímero sintético a la albúmina y/o proteína tiolada.

Opcionalmente, el polímero sintético es adecuado para el diseño tisular, por ejemplo, un polímero que sea relativamente no perjudicial cuando se implanta en un sujeto. Los polímeros sintéticos adecuados incluyen, sin limitación, polietilenglicol (PEG), policaprolactona (PLC), ácido poliglicólico (PGA), ácido poli-L-láctico (PLLA), polimetilmetacrilato (PMMA), polihidroxialcanoato (PHA), poli-4-hidroxibutirato (P4HB), fumarato de polipropileno (PPF) y politetrafluoroetileno (PTFE), y copolímeros de los mismos. En realizaciones ejemplares, el copolímero sintético es PEG. El PEG puede ser lineal o ramificado. Opcionalmente, el PEG tiene un peso molecular en el intervalo de 4 kDa a 20 kDa.

Debe entenderse que los nombres de los polímeros indicados anteriormente se refieren a las unidades de repetición que constituyen la mayoría de la estructura de los polímeros sintéticos, y no pretende excluirse la presencia de grupos funcionales adicionales en el polímero sintético. Por tanto, por ejemplo, un polímero sintético que consiste en polietilenglicol con dos grupos acrilato (es decir, diacrilato-PEG) queda incluido en el presente documento por los términos “polietilenglicol” y “PEG”.

Como grupos funcionales ejemplares, con capacidad de reticulación, se incluyen, sin limitación, acrilato y vinil sulfona.

En la técnica se conocen métodos de preparación de moléculas de PEG funcionalizadas. Por ejemplo, la vinil sulfona-PEG puede prepararse opcionalmente con argón haciendo reaccionar una solución de diclorometano (DCM) del OH-PEG con NaH y después con divinilsulfona (opcionalmente a proporciones molares de: OH 1: NaH 5: divinil sulfona 50, y con 0,2 gramos de PEG por ml de DCM). Opcionalmente, puede prepararse Ac-PEG con argón haciendo reaccionar una solución de DCM del OH-PEG con cloruro de acriloilo y trietilamina (opcionalmente a proporciones molares des: OH 1: cloruro de acriloilo 1,5: trietilamina 2 y con 0,2 gramos de PEG por ml de DCM).

De acuerdo con una realización opcional de la presente invención, el grupo funcional del polímero sintético tiene la capacidad de reticularse con un grupo funcional de al menos otro polímero sintético mediante polimerización en cadena.

Como se usa en el presente documento, la frase “polimerización en cadena” describe la unión conjunta de una pluralidad (opcionalmente al menos 10) de monómeros insaturados y/o cíclicos. La polimerización en cadena de monómeros insaturados produce el reemplazo de enlaces insaturados con enlaces que unen los monómeros. La polimerización en cadena de monómeros cíclicos saturados produce la apertura del anillo de los monómeros cíclicos.

En el contexto de las realizaciones de la presente invención, los monómeros con capacidad de experimentar polimerización en cadena, son grupos funcionales de los polímeros sintéticos descritos anteriormente en el presente documento, mediante la cual la polimerización de los grupos funcionales reticula los polímeros sintéticos que comprenden los grupos funcionales y, por consiguiente, las moléculas precursoras de polímero-proteína que comprenden los polímeros sintéticos.

Los polímeros sintéticos pueden tener uno o más grupos funcionales. Opcionalmente, los polímeros sintéticos comprenden de 1 a 7 grupos funcionales. De acuerdo con realizaciones ejemplares, los grupos funcionales son grupos acrilato.

Por tanto, por ejemplo, el PEG lineal puede unirse a una proteína tiolada en un extremo, y unirse en el otro extremo a un grupo acrilato (por ejemplo, -OC(=O)-CH=CH_2). Un PEG ramificado de 4 brazos puede unirse en un extremo a una proteína tiolada, y unirse a los otros 3 extremos por grupos acrilato. Un PEG ramificado de 8 brazos puede unirse en un extremo a una proteína tiolada, y unirse a los otros 7 extremos por grupos acrilato. Por tanto, las moléculas de PEG que tienen de 2 a 8 extremos son particularmente adecuadas para comprender de 1 a 7 grupos funcionales.

Como se describe anteriormente en el presente documento, las composiciones de materia de las realizaciones de la presente invención tienen la capacidad de reticularse para formar un armazón.

Por tanto, de acuerdo con otro aspecto de las realizaciones de la presente invención, se proporciona un armazón que comprende albúmina no tiolada unida de manera covalente a polímeros sintéticos reticulados. Opcionalmente, el armazón comprende más de un tipo de albúmina no tiolada y/o más de un tipo de polímero sintético.

De acuerdo con otra realización opcional de la presente invención, el armazón comprende una pluralidad de moléculas de albúmina no tioladas y una pluralidad de polímeros sintéticos, unidos de manera covalente a las moléculas de albúmina no tioladas, estando cada una de las moléculas de albúmina no tioladas unidas de manera covalente a al menos dos de los polímeros sintéticos, en el que los polímeros sintéticos están reticulados entre sí.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un armazón formado por la reticulación de una composición de materia descrita anteriormente en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la frase “armazón” se refiere a un esqueleto de soporte bidimensional o tridimensional. Controlando la reticulación, el armazón de la presente invención puede formar una estructura bi- o tridimensional de cualquier tamaño, estructura o porosidad. El armazón de la presente invención puede estar embebido en, o formarse alrededor de, otro armazón o gel o puede unirse a materiales adicionales para formar un armazón híbrido o recubierto.

En algunas realizaciones de la presente invención, el armazón de la presente invención puede utilizarse para dar soporte al crecimiento, a la adhesión y a la propagación celular, y por tanto facilitar el crecimiento celular y la regeneración y/o reparación tisular.

En realizaciones alternativas de la presente invención, el armazón puede utilizarse como un adhesivo, y por tanto facilitar la reparación tisular. Opcionalmente, el adhesivo no da soporte al crecimiento celular.

De acuerdo con una realización opcional de la presente invención, el armazón es biodegradable.

Como se usa en el presente documento, los términos “biodegradable” y “biodegradabilidad” se refieren a la capacidad de poder degradarse (es decir, descomponerse) mediante proteasas biológicas u otras biomoléculas.

La biodegradabilidad depende de la disponibilidad de sustratos de degradación (es decir, materiales biológicos o partes de los mismos), de la presencia de materiales de biodegradación (por ejemplo, microorganismos, enzimas, proteínas) y de la disponibilidad de oxígeno (para organismos, microorganismos aerobios, o partes de los mismos), de dióxido de carbono (para organismos, microorganismos anaerobios, o partes de los mismos) y/o de otros nutrientes. Además, la biodegradabilidad de un material, tal como del armazón de la presente invención, también depende de la estructura y/o de las propiedades mecánicas del material, es decir, la porosidad, flexibilidad, viscosidad, densidad de reticulación, hidrofobicidad/hidrofilicidad y elasticidad que pueden afectar al tránsito y a la disponibilidad de gases y nutrientes, así como a la adhesión y propagación celular.

La biodegradabilidad del armazón proviene, al menos en parte, de la biodegradabilidad de la albúmina no tiolada en el armazón que forma la estructura del armazón. Como se ilustra en la sección de ejemplos más adelante en el presente documento, la biodegradabilidad del armazón puede determinarse seleccionando una albúmina no tiolada que proporcione un nivel de biodegradabilidad particular. Adicionalmente, la biodegradabilidad puede determinarse seleccionando un polímero sintético biodegradable o no biodegradable. La biodegradabilidad también está afectada por las diversas moléculas sintéticas unidas a cada proteína, ya que una gran cantidad de moléculas sintéticas unidas puede reducir la biodegradabilidad ocultando sitios de escisión.

La biodegradabilidad de un armazón de hidrogel de las realizaciones de la presente invención puede determinarse sometiendo dichos hidrogeles a degradación enzimática utilizando proteasas tales como plasmina, tripsina, colagenasa, quimiotripsina y similares, como se ilustra más adelante en el presente documento en la sección de Ejemplos.

En general, las propiedades biológicas y mecánicas del armazón se determinarán en parte por la proporción de la albúmina no tiolada con respecto al polímero sintético en el armazón. Por ejemplo, armazones con un contenido alto de albúmina no tiolada presentarán las propiedades biológicas, tales como señalización celular, de las albúminas no tioladas incluidas en su interior, conservando al mismo tiempo las propiedades mecánicas ventajosas del polímero sintético incluido en su interior. Opcionalmente, el armazón comprende al menos 0,5 % de albúmina no tiolada por peso seco, opcionalmente al menos 1,5 %, opcionalmente al menos 4 %, opcionalmente al menos 10 % y opcionalmente al menos 20 %. Los armazones ejemplares comprenden PEG y albúmina no tiolada a una proporción molar que varía de 25:1 PEG por proteína a 300:1 PEG por proteína.

En muchos casos, es deseable que haya células vivas creciendo en el espacio rellenado por un armazón usado en diseño tisular. Esto es posible sembrando células vivas en el armazón. Una ventaja de las realizaciones de la presente invención es que el armazón puede formarse a partir de una fase líquida (por ejemplo, una solución de una molécula precursora de polímero-proteína), utilizando condiciones suaves para iniciar la reticulación. Por consiguiente, las células vivas pueden dispersarse entre las moléculas precursoras, produciendo un armazón que tenga células vivas embebidas en su interior, ya que la reticulación puede realizarse en condiciones suaves que no perjudiquen a las células.

Por tanto, de acuerdo con una realización opcional de la presente invención, el armazón comprende células vivas embebidas en su interior.

Como ejemplos de células que son adecuadas para su inclusión en las realizaciones de la presente invención que tienen la capacidad de formar un tejido, se incluyen, sin limitación, células madre, tales como células madre embrionarias, células madre de médula ósea, células de sangre de cordón umbilical, células madre mesenquimales, células madre de tejido adulto; o células diferenciadas tales como células neuronales, células retinianas, células epidérmicas, hepatocitos, células pancreáticas (de los islotes), células óseas, células cartilaginosas, células elásticas, células fibrosas, miocitos, células miocárdicas, células endoteliales, células del músculo liso y células hematopoyéticas.

Como se usa en el presente documento, el término “siembra” se refiere a encapsulación, atrapamiento, recubrimiento, colocación y/o dejar caer células en el armazón de la presente invención. Se apreciará que la concentración de las células que se siembran sobre o dentro del armazón de la presente invención, depende del tipo de células que se utilice y de la composición de armazón utilizado (es decir, de la proporción molar entre el polímero sintético y la proteína dentro de las moléculas precursoras y del porcentaje de la molécula reticulante utilizada).

Se apreciará que la siembra de las células puede realizarse después de la formación del armazón o del hidrogel formado a partir del armazón (como se describe más adelante en el presente documento), o mezclando las células con las moléculas precursoras antes de la reticulación que genera el armazón. La concentración de las células a sembrar sobre el armazón y/o hidrogel depende del tipo de célula y de las propiedades del armazón y/o del hidrogel, y los expertos en la técnica podrán determinar una concentración adecuada de células en cada caso.

Se apreciará que, después de la siembra de las células sobre el armazón y/o hidrogel, para mantener su viabilidad, las células se cultivan opcionalmente en presencia de medio de cultivo tisular y/o factores de crecimiento.

Después de la siembra, el armazón y/o el hidrogel puede examinarse (por ejemplo, utilizando un microscopio invertido) para evaluar el crecimiento celular, la propagación y la formación de tejido, como se ilustra en la sección de Ejemplos.

Como se ilustra en la sección de Ejemplos más adelante en el presente documento, los armazones de las realizaciones de la presente invención pueden formar hidrogeles, por ejemplo, combinando el armazón con un líquido acuoso.

Por tanto, de acuerdo con otro aspecto de las realizaciones de la presente invención, se proporciona un hidrogel formado a partir de un armazón descrito anteriormente en el presente documento.

De acuerdo con otro aspecto de las realizaciones de la presente invención, se proporciona una composición cosmética que comprende un hidrogel descrito anteriormente en el presente documento.

Las propiedades de un hidrogel vendrán determinadas, en parte, por la concentración de una composición de materia en el hidrogel. En resumen, concentraciones más altas de la composición de materia producirán hidrogeles con un grado de reticulación más alto, una mayor resistencia mecánica y una menor porosidad, mientras que concentraciones más bajas de la composición de materia producirán hidrogeles con un grado de reticulación más bajo, una menor resistencia mecánica y una mayor porosidad.

De acuerdo con una realización opcional de la presente invención, el hidrogel comprende la composición de materia a una concentración en un intervalo de 1 mg/ml a 200 mg/ml. Opcionalmente, la concentración está en un intervalo de 3 mg/ml a 50 mg/ml, y opcionalmente de 3 mg/ml a 30 mg/ml.

Como se describe en el presente documento, y se ilustra en la sección de Ejemplos más adelante, las moléculas precursoras de polímero-proteína descritas anteriormente en el presente documento, permiten generar un armazón de una manera sencilla y conveniente. Adicionalmente es convenientemente posible ajustar las propiedades biológicas y mecánicas del armazón modificando la proporción de proteína con respecto a polímero, la concentración de moléculas precursoras y así sucesivamente, como se describe en el presente documento.

Por tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de generación de un armazón.

De acuerdo con otra realización opcional de la presente invención, el método es de generación de un armazón que comprende una albúmina no tiolada, comprendiendo el método unir de manera covalente albúmina no tiolada con al menos dos polímeros sintéticos a través de un primer grupo funcional de los al menos dos polímeros sintéticos, teniendo cada uno de los al menos dos polímeros sintéticos un segundo grupo funcional, para obtener de este modo una molécula precursora de albúmina no tiolada-polímero; y posteriormente reticular una pluralidad de las moléculas precursoras para generar de este modo dicho armazón. Opcionalmente, el primer grupo funcional de los polímeros sintéticos está unido de manera covalente a un resto de cisteína (por ejemplo, al grupo tiol de cisteína) de la albúmina no tiolada. Los restos de cisteína pueden reducirse, de manera que los restos de cisteína estén en la forma tiol, y no en la forma disulfuro. Opcionalmente, para unirse al polímero sintético se utiliza una solución sin titular de albúmina no tiolada.

Como ejemplos de primer grupo funcional (es decir, grupos con capacidad para unirse a la albúmina no tiolada) se incluyen, sin limitación, acrilato, aldehído, tosilo, tresilo, diclorotriacina, epóxido, succinato de succinimidilo, éster de succinimidilo, p-nitrofenil carbonato, benzotriazolil carbonato, 2,3,5-triclorofenil carbonato, succinimidil carbonato, piridildisulfuro, maleimida, vinilsulfona y yodoacetamida.

De acuerdo con realizaciones opcionales de la presente invención, el primer y segundo grupo funcional anteriormente mencionados, son idénticos entre sí.

El primer grupo funcional ha de tener la capacidad de unirse a la albúmina no tiolada, mientras que el segundo grupo funcional ha de tener la capacidad de reticularse con otros segundos grupos funcionales. Por tanto, cualquier grupo funcional que tenga la capacidad de unirse tanto a albúmina no tiolada como de reticularse con grupos similares, puede utilizarse como primer grupo funcional y como segundo grupo funcional. Como ejemplos de grupos se incluyen, sin limitación, acrilato y vinil sulfona. Por tanto, por ejemplo, el doble enlace del acrilato y de la vinil sulfona puede unirse a albúmina no tiolada (por ejemplo, a un grupo tiol de la proteína) mediante una reacción de adición de tipo Michael, y puede reticularse con el doble enlace de otros grupos funcionales mediante polimerización en cadena.

De acuerdo con una realización opcional de la presente invención, el polímero sintético comprende PEG. Opcionalmente, el PEG tiene de 2 a 8 grupos acrilato. Opcionalmente, los 2 a 8 grupos acrilato incluyen el primer y segundo grupos funcionales descritos anteriormente en el presente documento.

Los métodos descritos anteriormente en el presente documento pueden realizarse opcionalmente de tal manera que el porcentaje de polímeros sintéticos unidos a la albúmina no tiolada en un solo sitio se maximiza, y el porcentaje de polímeros sintéticos unidos a la proteína en más de un sitio se minimiza. Esto puede conseguirse, por ejemplo, haciendo reaccionar la albúmina no tiolada con un exceso de polímero sintético, como se ilustra en el presente documento más adelante. Por tanto, por ejemplo, una molécula de PEG que tiene de 2 a 8 grupos acrilato se uniría a la proteína mediante un solo acrilato, dejando de 1 a 7 grupos acrilato, disponibles para la reticulación.

Debido a la fácil reticulación de las moléculas precursoras de las realizaciones de la presente invención para formar de este modo un armazón, la reticulación de las moléculas precursoras puede realizarse bien dentro (es decir, *in vivo*) o fuera de un organismo. La reticulación *in vivo*, por ejemplo, puede usarse para generar un armazón que tenga la forma exacta de la cavidad en el organismo que va a rellenarse con el armazón.

En la técnica se conocen diversos métodos de reticulación. Por ejemplo, la reticulación puede efectuarse con iluminación (por ejemplo, con luz ultravioleta), con reactivos químicos (por ejemplo, donantes de radicales libres) y/o con calor.

De acuerdo con una realización opcional de la presente invención, la reticulación es por iluminación con luz ultravioleta (por ejemplo, a una longitud de onda de aproximadamente 365 nm).

Como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” se refiere a ± 10 %.

Cuando la reticulación es *in vivo*, es preferible evitar dosis de luz ultravioleta que sean perjudiciales. La dosis máxima no perjudicial dependerá, por ejemplo, de la longitud de onda de la luz ultravioleta que se utilice, y por otra parte del organismo expuesto a la luz ultravioleta. Un experto en la técnica podrá determinar fácilmente si una dosis es o no perjudicial.

Opcionalmente, para facilitar la reticulación se añade un fotoiniciador. La adición de un fotoiniciador permitirá típicamente utilizar dosis más bajas de luz ultravioleta para la reticulación.

Como se usa en el presente documento, el término “fotoiniciador” describe un compuesto que inicia una reacción química (por ejemplo, una reacción de reticulación, una polimerización en cadena) cuando se expone a iluminación ultravioleta. El experto en la técnica conocerá muchos fotoiniciadores adecuados. Como ejemplos de fotoiniciadores se incluyen, sin limitación, óxido de bis(2,4,6-trimetilbenzoil) fenilfosfina (BAPO), 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPA), canforquinona (CQ), 1-fenil-1,2-propanodiona (PPD), el complejo organometálico Cp’Pt(CH(3))(3) (Cp’ = eta(5)-C(5)H(4)CH(3)), 2-hidroxi-1-[4-(hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona (por ejemplo, Irgacure™ 2959), dimetilaminoetil metacrilato (DMAEMA), 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona, benzofenona (BP) y flavinas.

De acuerdo con una realización opcional de la presente invención, las moléculas poliméricas sintéticas no conjugadas (es decir, moléculas poliméricas sintéticas que no se unen a la proteína) se retiran de las moléculas precursoras antes de la reticulación de las moléculas precursoras.

De acuerdo con una realización opcional de la presente invención, la reticulación de las moléculas precursoras comprende adicionalmente la reticulación de las moléculas precursoras con una pluralidad de polímeros sintéticos, teniendo cada uno de los polímeros sintéticos al menos dos grupos funcionales, seleccionándose los grupos funcionales con capacidad de reticularse con un grupo funcional de moléculas precursoras. Opcionalmente, la pluralidad de polímeros sintéticos está en un intervalo 1 mg/ml a 150 mg/ml, opcionalmente en un intervalo de 2 mg/ml a 50 mg/ml, y opcionalmente en un intervalo de 5 mg/ml a 15 mg/ml. Los polímeros sintéticos y los grupos funcionales adecuados para la reticulación son como se describe anteriormente en el presente documento.

La adición de polímeros sintéticos aumentará la resistencia mecánica del armazón que se genera. Si el polímero sintético no es biodegradable, la biodegradabilidad del armazón se reducirá. Por tanto, las propiedades del armazón pueden modificarse según se desee añadiendo una cantidad apropiada de polímero sintético para reticularse con las moléculas precursoras.

Opcionalmente, el polímero sintético no conjugado (es decir, un polímero sintético que no es un componente de la molécula precursora), que va a reticularse para formar un armazón, es menor que el 20 %, opcionalmente menor que el 15 %, opcionalmente menor que el 10 % y opcionalmente menor que el 5 %, del peso total de todo el material (por ejemplo, moléculas precursoras y polímero sintético no conjugado).

Debe observarse que el polímero sintético no conjugado puede retirarse antes de la reticulación de las moléculas precursoras, y después añadir el mismo polímero sintético no conjugado para reticularse con las moléculas precursoras. Por ejemplo, puede ser deseable retirar el polímero sintético no conjugado cuya concentración es indeterminada, y después añadir polímero sintético no conjugado a una concentración conocida.

Opcionalmente, las realizaciones de la presente invención pueden incluir además componentes que no son reactivos con el armazón y/o hidrogel. Como ejemplos de dichos componentes que no son reactivos se incluyen, sin

limitación, fármacos tales como antisépticos, agentes quimioterapéuticos, agentes antimicrobianos, agentes antivíricos, hemostáticos, antiflogísticos, anestésicos, analgésicos, complementos nutricionales, biopolímeros tales como péptidos, proteínas derivadas de plasma, enzimas o mezclas de los mismos.

Dichos componentes pueden incluirse en el hidrogel, por ejemplo, disolviendo o suspendiendo los componentes no reactivos en el líquido acuoso incluido en el hidrogel. Los métodos de carga de hidrogeles con agentes farmacéuticos son muy conocidos en la técnica.

Además, la biofuncionalidad del armazón y/o hidrogel descrito anteriormente en el presente documento puede aumentarse adicionalmente uniendo al hidrogel, o impregnando en el mismo, una proteína, tal como una proteína de señalización celular, o un factor de crecimiento (por ejemplo, un factor de crecimiento nervioso).

La unión de dichas proteínas al armazón de hidrogel de la presente invención se emplea opcionalmente reticulando una molécula precursora que comprende la proteína deseada con las otras moléculas precursoras del armazón. Opcionalmente, la molécula precursora adicional es cualquier molécula precursora descrita anteriormente en el presente documento. Como alternativa, la molécula precursora es una que se describe, por ejemplo, en el documento WO 2005/061018.

Como alternativa, el hidrogel puede impregnarse con una proteína deseada deshidratando el armazón y después sumergiendo el hidrogel en una solución que contenga la proteína deseada y agitando suavemente durante algunas horas hasta que la proteína deseada penetre en el armazón durante el proceso de hidratación. Del mismo modo, el hidrogel puede impregnarse con una proteína deseada por incubación en una solución que comprenda la proteína deseada hasta que la proteína se difunda al interior de la red polimérica del armazón por difusión lenta, pasiva. Esto último está influenciado por el grado de reticulación, la porosidad del armazón y las propiedades estructurales descritas en el presente documento.

Aparte de ser asequible de producir, el armazón de la presente invención es muy reproducible, flexible (puede tensionarse o estirarse fácilmente), presenta propiedades estructurales controlables y puede prestarse a controlar la biodegradación; características que lo hacen muy adecuado para el diseño *in vivo* o *ex vivo* de tejidos tales como hueso, nervios, cartílagos, músculo cardiaco, tejido dérmico, vasos sanguíneos y otros tejidos (blandos y rígidos) en el organismo. Por ejemplo, un armazón y/o hidrogel de acuerdo con las realizaciones de la presente invención puede colocarse fácilmente en intersticios dentro de un tejido o de un órgano, después de lo cual este puede rellenar el espacio vacío e iniciar el proceso de regeneración a medida que el armazón se va degradando.

Por tanto, de acuerdo con otro aspecto de realizaciones de la presente invención, se proporciona el uso de una composición de materia y/o armazón y/o hidrogel descritos anteriormente en el presente documento, para la fabricación de un medicamento identificado para la reparación de lesión tisular.

Los ejemplos de trastornos o afecciones en los que la reparación de la lesión tisular resulta ser beneficiosa incluyen, pero sin limitación, cirrosis hepática tal como en pacientes con hepatitis C (hígado), diabetes de tipo 1 (páncreas), fibrosis quística (pulmón, hígado, páncreas), cáncer de huesos (hueso), reparación de quemaduras y heridas (piel), degeneración macular relacionada con la edad (retina), infarto de miocardio, reparación miocárdica, lesiones del SNC (mielina), defectos del cartílago articular (condrocitos), degeneración de la vejiga, degeneración intestinal y similares. Además, la reparación de la lesión tisular que es cosmética es frecuentemente beneficiosa.

Como se usa en el presente documento, el término “cosmético” se refiere a tejido aparente (por ejemplo visible), incluyendo, pero sin limitación, tejido dérmico. La lesión tisular cosmética es típicamente perjudicial desde el punto de vista estético y puede ser perjudicial por otras razones (por ejemplo, factores sicológicos).

La frase “*in vivo*” se refiere a dentro de un organismo vivo, tal como una planta o un animal, preferentemente en mamíferos, preferentemente, en sujetos humanos.

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

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

Se apreciará que, la formación *in vivo* de un tejido también puede realizarse administrando las moléculas precursoras al sujeto y reticulando adicionalmente las moléculas precursoras *in vivo*. La reticulación puede realizarse como se describe anteriormente en el presente documento usando agentes y/o condiciones que no sean tóxicos ni peligrosos.

El armazón y/o hidrogel de la presente invención también puede utilizarse para la formación *ex vivo* de un tejido.

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

Se apreciará que las células que se siembran en el armazón para la formación *ex vivo* de un tejido pueden proceder del individuo tratado (fuente autóloga) o de fuentes alogénicas tales como células madre embrionarias, que no se espera que induzcan una reacción inmunogénica.

Después de la formación tisular *ex vivo* el armazón sembrado se implanta en el sujeto. Los expertos en la técnica podrán determinar cuándo y cómo implantar el armazón para inducir a través del mismo la regeneración tisular y tratar la enfermedad.

Por ejemplo, para cartílago articular el armazón se siembra opcionalmente con condrocitos y después de 14-21 días en cultivo el armazón puede implantarse posteriormente en la superficie articular de la articulación.

Como alternativa, el armazón puede inyectarse como una solución precursora, con o sin células, y polimerizarse directamente en el sitio de la lesión del cartílago. El hidrogel polimerizado rellena el intersticio del defecto e inicia la regeneración de nuevo tejido cartilaginoso.

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

En determinadas realizaciones de la presente invención el tejido es un tejido acelularizado, es decir, que no comprende células.

Como se ilustra en la sección de Ejemplos en el presente documento, las moléculas precursoras comprenden albúmina ya que la proteína produce hidrogeles que son relativamente resistentes a la invasión celular. Dichos hidrogeles pueden usarse, por ejemplo, como un adhesivo. En cambio, como se ilustra adicionalmente en el presente documento, las moléculas precursoras que comprenden una proteína de la matriz extracelular (por ejemplo, colágeno tiolado) producen un hidrogel que se degrada fácilmente y que las células invaden. Dichos hidrogeles pueden usarse, por ejemplo, cuando es deseable reemplazar el hidrogel por tejido natural.

Los medicamentos de acuerdo con las realizaciones de la presente invención pueden presentarse opcionalmente en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit autorizado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria (por ejemplo, 100 mg), tal como para el uso personalizado que contenga el principio activo (por ejemplo, las moléculas precursoras que aún no se han reticulado), y opcionalmente medios desechables estériles para el suministro (por ejemplo, una jeringa) y para la iluminación (por ejemplo, fundas negatoscópicas). El envase puede comprender, por ejemplo, un papel metalizado o de plástico, tal como un envase de tipo blíster. El envase o dispositivo dispensador puede venir acompañado de instrucciones para la administración. El envase o el dispositivo dispensador también puede venir acompañado de una advertencia en una forma prescrita por una agencia gubernamental reguladora de la fabricación, uso o venta de los productos farmacéuticos, cuya nota refleja la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones para la administración humana o veterinaria. Dicha advertencia puede incluir, por ejemplo, una etiqueta aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos para la prescripción de fármacos o un prospecto del producto aprobado. Las composiciones que comprenden una preparación de la invención, formuladas en un transportador farmacéuticamente aceptable también pueden prepararse, colocarse en un recipiente apropiado y marcarse para el tratamiento de una afección indicada, como también se ha detallado anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" incluye la anulación, sustancialmente la inhibición, el retraso o la inversión de la progresión de una afección, sustancialmente la mejoría de síntomas clínicos o estéticos de una afección o sustancialmente la prevención de la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluye pero sin limitación".

La expresión “que consiste en” significa “que incluye y limitado a”.

Como se usa en el presente documento, las formas en singular “un”, “uno” y “una” y “el”, “la” incluyen referencias en plural salvo que el contexto dictamine claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión “un compuesto” o “al menos un compuesto” puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

A lo largo de esta solicitud, pueden presentarse diversas realizaciones de la invención en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en un formato de intervalo es exclusivamente por conveniencia y brevedad y no debe considerarse como una limitación inflexible sobre el alcance de la invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo tiene específicamente todos los posibles subintervalos desvelados, así como los valores numéricos individuales dentro de este intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 debe considerarse que tiene específicamente los subintervalos desvelados tales 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., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica con independencia de la amplitud del intervalo.

Siempre que en el presente documento se indique un intervalo numérico, significa que se incluye cualquier sistema numérico (fraccionado o entero) citado dentro del intervalo indicado. Las frases “que varía/varía entre” un primer número y un segundo número indicado y “que varía/ varía de” un primer número indicado “a” un segundo número indicado se usan en el presente documento de manera indistinta y significan que incluyen el primer y segundo número indicado y todos los números fraccionados o enteros entre ellos.

Como se usa en el presente documento, el término “método” se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para realizar una labor determinada incluyendo, sin limitación, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos bien conocidos, o fácilmente desarrollados de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los especialistas de las técnicas química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

Se aprecia que, determinadas características de la invención, que por claridad se describen en el contexto de realizaciones distintas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. Por el contrario, diversas características de la invención, que por brevedad se describen en el contexto de una sola realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como adecuada en cualquier otra realización descrita de la invención. Determinadas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no se consideran características esenciales de estas realizaciones al menos que la realización sea inoperativa sin estos elementos.

Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención se han esbozado anteriormente en el presente documento y como se reivindica en la sección de reivindicaciones más adelante encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención y de una manera no limitante.

Síntesis de diacrilato-PEG:

Se preparó diacrilato-PEG (DA-PEG) a partir de OH-PEG lineal de 10 kDa (Fluka, Aldrich) como se describe en cualquier parte. Resumiendo, la acrilación de OH-PEG se realizó con argón haciendo reaccionar una solución de diclorometano de OH-PEG con cloruro de acriloilo (Merck) y trietilamina (Fluka) a una proporción molar de 1,5:1 de cloruro de acriloilo con respecto a grupos -OH. El producto final se precipitó en éter dietílico enfriado con hielo y se secó al vacío durante 48 horas. Para verificar la conversión del grupo terminal y la pureza del producto final se utilizó espectroscopia ^{1}H-NMR

Tiolación y PEGilación de colágeno:

(ejemplo comparativo, no forma parte de la invención)

Se aisló colágeno (de tipo I) de tendón de cola de rata según protocolos publicados. La tiolación de colágeno se realizó usando succinimidil-acetil-tioacetato (SATA) (Pierce) como describen Chen *et al*. (2002). En resumen, el colágeno se disolvió en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 150 mM con urea 8 M a una concentración de 5 mg/ml. El SATA reaccionó con el colágeno durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación a una concentración de 0,075 mg por mg de colágeno. Los grupos -SH acetilados resultantes unidos a restos de lisina se desprotegieron después haciendo reaccionar el colágeno con clorhidrato de hidroxilamina 0,5 M (Sigma-Aldrich) durante 2 horas a una concentración de 0,125 ml por mg de colágeno. El producto se dializó durante una noche frente a PBS con urea 8 M.

El colágeno tiolado se PEGiló mediante reacción con HCl-TCEP clorhidrato de (*tris*(2-carboxietil)fosfina) a una proporción molar de 2:1 de TCEP con respecto a los grupos tiol del colágeno tiolado. El colágeno tiolado reaccionó después durante 3 horas con DA-PEG 10 kDa a una proporción molar de 1,5:1 DA-PEG por grupo tiol a un pH de 8 a temperatura ambiente. El colágeno tiolado PEGilado se precipitó en acetona y volvió a disolverse en PBS con urea 8 M y se dializó en un Slide-A-Lyzer (MWCO 10.000, Pierce) a 37 ºC durante 2 días a una concentración final de 4 mg/ml de colágeno. El producto PEGilado se caracterizó de acuerdo con protocolos publicados.

PEGilación de albúmina y fibrinógeno (ejemplo comparativo, no forma parte de la invención):

La albúmina se PEGiló sin tiolación, para preparar hidrogeles de albúmina PEGilada. El fibrinógeno se PEGiló (ejemplo comparativo, no forma parte de la invención) y se usó para preparar hidrogeles con el propósito de comparar con la albúmina y con el colágeno tiolado.

Cada uno de fibrinógeno de bovino (Sigma-Aldrich) y albúmina de suero bovino (MP Biomedicals) se disolvieron en PBS 150 mM con urea 8 M para dar soluciones de 7 mg/ml. Se añadió HCl-TCEP a las soluciones de proteína a una proporción molar de 1,5:1 de TCEP con respecto a cisteínas de fibrinógeno y a una proporción de 2:1 con respecto a cisteínas de albúmina. Después de la disolución, se añadió una solución de DA-PEG 280 mg/ml (diacrilato-PEG lineal, 10 kDa) en PBS 150 mM con urea 8 M y reaccionó durante 3 horas a temperatura ambiente. La proporción molar de PEG con respecto a cisteínas de fibrinógeno fue de 4:1. La proporción molar de PEG con respecto a cisteínas de albúmina fue de 2:1. Después de la incubación, las proteínas PEGiladas se diluyeron con un mismo volumen de PBS 150 mM que contenía urea 8 M y se precipitó añadiendo 5 volúmenes de acetona. Los precipitados volvieron a disolverse en PBS que contenía urea 8 M usando un homogeneizador, a ~2 mg/ml de concentración de proteína para la albúmina, y a ~7 mg/ml para fibrinógeno, y se dializó frente a PBS 150 mM a 4 ºC durante 2 días con dos cambios de PBS. Las soluciones de proteína PEGilada se liofilizaron después durante al menos 2 días y volvieron a disolverse en PBS 150 mM para alcanzar una concentración de proteína de ~8 mg/ml.

Análisis SDS-PAGE de la PEGilación de las proteínas:

La reacción de PEGilación se confirmó por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico). Este es un método directo para evaluar cualitativamente la PEGilación de proteínas, ya que el injerto de PEG sobre una proteína tiene un efecto detectable sobre la movilidad de la proteína en el gel de poliacrilamida. Las proteínas PEGiladas y no PEGiladas se cargaron en geles de poliacrilamida al 8 %. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie® y se formaron digitalmente imágenes usando una estación de trabajo de documentación en gel.

Como se muestra en la Figura 1, la PEGilación de la albúmina, el colágeno tiolado y el fibrinógeno no tiolado causaron un aumento notable en el PM aparente. La albúmina PEGilada, el colágeno y fibrinógeno PEGilados son visibles como una mancha continua en la parte más superior del gel. Algo de colágeno y fibrinógeno permaneció no PEGilado como lo indica la banda de colágeno de aproximadamente 105 kDa y la banda de fibrinógeno de aproximadamente 50 kDa.

Formación del hidrogel:

Se formaron precursores de proteína PEGilada en hidrogeles por fotopolimerización usando Irgacure ™ 2959 (Ciba Specialty Chemicals) al 0,1 % (p/v) y exponiendo a luz ultravioleta (365 nm, 4-5 mW/cm^2) durante 5 minutos. Todos los experimentos de cultivo tisular se realizaron con precursor de proteína PEGilada 4 mg/ml complementado con 10 mg/ml de DA-PEG (10 kDa) lineal.

La formación del hidrogel se confirmó por reometría de cizalla controlada por velocidad de esfuerzo. Se realizaron ensayos de tiempo de barrido dinámico en geometría de placa-placa a 37 ºC, a una frecuencia constante de 1 radiante/segundo y a una tensión sinusoidal del 5 % usando un Sistema de Expansión Reométrica de Advanced (ARES, Rheometer Scientific). Los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G") se registraron en función del tiempo durante hasta 10 minutos mediante el programa informático RSI Orchestrator 6.5.8. Después de 20 segundos, la solución se polimerizó por fotoiniciación usando una fuente de luz ultravioleta (4-5 mW/cm^2). El módulo de cizalla indicado se tomó como una parte real del módulo de cizalla complejo G* = G' + iG" al finalizar el ensayo de tiempo de barrido.

Como se muestra en la Figura 2, para los precursores PEGilados de albúmina, fibrinógeno, y colágeno tiolado, el valor G' aumentó inmediatamente después de encender la lámpara ultravioleta y alcanzó una estabilización después de aproximadamente dos minutos, indicando la finalización de la reacción de polimerización.

Caracterización de la turgencia:

Se realizaron experimentos de turgencia en tapones cilíndricos (5 mm de diámetro) polimerizados a partir de 100 µl de precursor de proteína PEGilada. Los tapones de hidrogel se incubaron en PBS 10 ml que contenía azida sódica al 0,1 % a temperatura ambiente durante 24 horas. El peso húmedo de cada tapón se registró antes de liofilizarse durante una noche. El peso seco se midió, y se calculó la razón de turgencia (Q) dividiendo el peso seco entre el

peso húmedo después de la turgencia. La masa estimada de sales y azida sódica en PBS se restó del peso seco. Se definió un parámetro de turgencia adicional, el % de la proporción de volumen, como el % de aumento entre el volumen final del tapón en comparación con el volumen inicial en el momento del moldeo ([$V_{final}/V_{inicial}$] x100).

La proporción del volumen del colágeno tiolado PEGilado fue de 215 ± 21 %, mientras que la proporción de la turgencia fue de 145 ± 27.

La proporción del volumen de la albúmina PEGilada fue de 238 ± 27 %, mientras que la proporción de la turgencia fue de 87 ± 10.

En comparación, la proporción del volumen del fibrinógeno PEGilado fue de 155 ± 25 %, mientras que la proporción de la turgencia fue de 179 ± 29.

Caracterización de la biodegradación:

Se realizaron experimentos de biodegradación en tapones cilíndricos sin células, fabricados a partir de proteína PEGilada marcada con fluorescencia como describen Peled *et al.* (2007). En resumen, 0,1 mg/ml de succinimidil acridin-9-carboxilato (SAC) (Pierce) se reconstituyeron en PBS que contenía DMSO para preparar una solución de tinción SAC. Cada tapón se incubó en la solución de tinción SAC durante una noche, seguido de un lavado amplio en PBS y azida sódica al 0,1 % durante 3 días. Cada tapón se incubó en 3 ml de solución de colagenasa de tipo IA 0,01 mg/ml (Sigma-Aldrich) en PBS y azida sódica al 0,1 % a 37 ºC con agitación continua. Se usó un lector multimodo de barrido espectral Varioscan (Thermo Electron Corp.) para medir la intensidad de fluorescencia del sobrenadante (excitación 364 nm, emisión 460 nm) cada 5 minutos durante hasta 10 horas. Los datos sin procesar se normalizaron por la intensidad de fluorescencia final del hidrogel completamente degradado. Se usaron dos grupos de control independientes para validar los resultados experimentales: tapones de hidrogel teñidos con SAC en PBS y azida sódica sin colagenasa; y tapones de hidrogel no teñidos en PBS, colagenasa y azida sódica.

Como se muestra en la Figura 3, la semivida del hidrogel de colágeno tiolado PEGilado en la solución de colagenasa 0,01 mg/ml fue de 20 minutos, lo que indica una biodegradabilidad significativa del hidrogel. La semivida del hidrogel de albúmina PEGilada en la solución de colagenasa fue de 70 minutos, lo que indica una biodegradabilidad significativamente más baja que la del hidrogel de colágeno. En comparación, la semivida del hidrogel de fibrinógeno PEGilado en las mismas condiciones fue de 40 minutos.

Preparación del sustrato celular (2-D):

Los hidrogeles fabricados a partir de proteína PEGilada se usaron como sustratos para cultivos bidimensionales de células de músculo liso (SMC). Las SMC de aorta de cabra se cultivaron hasta el pase 8 en Medio de Eagle Modificado con Dulbecco (DMEM) (Gibco, UK) que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10 % (Biological Industries, Israel). Se prepararon hidrogeles premoldeados a partir de solución de precursor de proteína PEGilada (4 mg/ml), DA-PEG lineal 10 kDa (10 mg/ml) y fotoiniciador (0,1 % p/v). Los geles se fijaron en la parte inferior de una placa de 24 pocillos y se sembraron con una suspensión de SMC (70.000 células por pocillo) en 1 ml de cultivo celular. La propagación celular se monitorizó inmediatamente después de la siembra usando un microscopio de contraste de fase (Nikon Eclipse TS100) y la morfología celular se documentó con una cámara CCD digital.

Se utilizaron hidrogeles de cultivo tisular de plástico y solo de PEG como controles positivo y negativo respectivamente, para la propagación celular (datos no mostrados).

Como se muestra en las Figuras 4C-F, la propagación celular comenzó inmediatamente después de la siembra sobre las SMC en hidrogeles tanto de fibrinógeno PEGilado (Figura 4E) como de colágeno PEGilado (Figura 4C) y las células se propagaron completamente sobre la superficie de ambos hidrogeles después de 24 horas (Figuras 4D y 4F).

Como se muestra en las Figuras 4A-B, no se produjo propagación celular sobre el hidrogel de albúmina PEGilada, incluso después de 24 horas.

Penetración de la construcción celularizada (3-D):

Se prepararon construcciones celularizadas fotopolimerizando una solución precursora de proteína PEGilada en presencia de SMC dispersas. Las células de los pases se trataron con tripsina y se suspendieron en 300 µl de precursor de proteína PEGilada (0,5 x 10^6 células por ml) que contenía fotoiniciador (0,1 % p/v). Las construcciones cilíndricas se moldearon en tubos de silicona estéril de 8 mm de diámetro y se transfirieron a una placa de Petri que contenía medio de cultivo. Las células encapsuladas se monitorizaron y documentaron diariamente usando un microscopio de contraste de fase. Algunos experimentos se monitorizaron continuamente usando un sistema de microscopio hecho a medida de lapso de tiempo de incubación (Nikon Eclipse TE-2000). Los experimentos de lapso de tiempo registraron visualmente la remodelación activa de células en diversas localizaciones dentro de cada hidrogel formando secuencialmente imágenes en cada campo cada 10 minutos durante hasta 96 horas.

Como se muestra en las Figuras 5E y 5H, comenzaron a formarse extensiones después de 4 horas sobre células encapsuladas en matrices de hidrogel tanto de fibrinógeno PEGilado (Figura 5H) como de colágeno PEGilado (Figura 5E). Después de 24 horas, las células se propagaron y comenzaron a ahusarse enormemente en ambas matrices de hidrogel (Figuras 5F y 5I).

Como se muestra en las Figuras 5B y 5C, en una matriz de hidrogel de albúmina no se formaron extensiones en células, incluso después de 24 horas.

Estudios de extensión tisular:

Se realizaron experimentos de extensión usando construcciones tisulares densas fabricadas con geles de colágeno compacto sembrado con SMC, que se encapsularon dentro de hidrogeles de proteína PEGilada. Se preparó tejido basado en colágeno a partir de una solución de DMEM 5X (Biological Industries, Israel), FBS al 10 %, solución de colágeno de tipo I reconstituida en ácido acético 0,1 N, y NaOH 0,01 M con las SMC dispersas (0,5 x 10^6 células por ml). Los geles de colágeno sembrados con células se cultivaron en una placa de 48 pocillos durante 2 días en 500 µl de medio antes de colocar el tejido compacto en 300 µl de solución precursora de proteína PEGilada y fotoiniciador. Después de la exposición a 5 minutos de luz ultravioleta, el tejido encapsulado se cultivó dentro del hidrogel con 500 µl de medio de cultivo. Los experimentos de extensión celular se monitorizaron diariamente mediante microscopia de contraste de fase para visualizar la penetración de las células desde el tejido al interior del hidrogel circundante. Los resultados de la extensión se cuantificaron midiendo la distancia de recorrido promedio de las células desde los márgenes del tejido denso hacia el interior de los hidrogeles de la proteína PEGilada, usando micrografías de contraste de fase de las muestras tomadas a intervalos de tiempo determinados.

Como se muestra en la Figura 6A, las SMC comenzaron a invadir la matriz de colágeno PEGilado y la matriz de colágeno PEGilado inmediatamente después del moldeo y continuaron invadiendo ambas matrices durante todo el experimento. Mediciones cuantitativas en las matrices de fibrinógeno PEGilado y de colágeno PEGilado revelaron patrones de migración muy similares (Figura 6C). En cambio, no hubo invasión de matriz de albúmina PEGilada, incluso después de 5 días (Figura 6A).

Aunque la invención se ha descrito junto con sus realizaciones específicas, para los expertos en la materia es obvio que se pongan de manifiesto muchas alternativas, modificaciones y variaciones.

Referencias

Buttafoco L, Engbers-Buijtenhuijs P, Poot AA, Dijk-stra PJ, Daamen WF, van Kuppevelt TH, *et al.* First steps towards tissue engineering of small-diameter blood vessels: preparation of flat scaffolds of collagen and elastin by means of freeze drying. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2006; 77(2): 357-368.

Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. Bio-materials 2003; 24(24): 4337-4351.

D'Urso EM, Jean-Francois J, Doillon CJ, Fortier G. Poly(ethylene glycol)-serum albumin hydrogel as matrix for enzyme immobilization: biomedical applications. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol. 1995; 23(5): 587-595.

Elbert DL, Hubbell JA. Conjugate addition reactions combined with free-radical cross-linking for the design of materials for tissue engineering. Biomacro-molecules 2001; 2(2): 430-441.

Elisseeff J, McIntosh W, Anseth K, Riley S, Ragan P, Langer R. Photoencapsulation of chondrocytes in poly(ethylene oxide)-based semi- interpenetrating networks. I Biomed Mater Res 2000; 51(2): 164-171.

Friess W. Collagen--biomaterial for drug delivery. Eur J Pharm Biopharm 1998; 45(2): 113-136.

Gayet JC, Fortier G. Drug release from new bioartificial hydrogel. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol. 1995; 23(5): 605-11.

Hubbell JA. Materials as morphogenetic guides in tissue engineering. Curr Opin Biotechnol 2003; 14(5): 551-558.

Jean-Francois J, Fortier G. Immobilization of L-asparaginase into a biocompatible poly(ethylene glycol)-albumin hydrogel: I: Preparation and in vitro characterization. Biotechnol Appl Biochem. 1996; 23 (Pt 3): 221-6.

Jean-Francois J, D'Urso EM, Fortier G. Immobilization of L-asparaginase into a biocompatible poly(ethylene glycol)-albumin hydrogel: evaluation of performance in vivo. Biotechnol Appl Biochem. 1997; 26 (Pt 3): 203-12.

Lutolf MP, Hubbell JA. Synthesis and Physicochemical Characterization of End-Linked Poly(ethylene glycol)-co-peptide Hydrogels Formed by Michael-Type Addition. Biomacromolecules 2003; 4(3): 713-722.

Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J. Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges. Biomaterials 2004; 25(15): 2997-3004.

Merrill EA, Salzman EW. Polyethylene oxide as a biomaterial. ASAIO J 1983; 6:60-64. Nguyen KT, West JL. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. Biomaterials 2002; 23(22): 4307-4314.

Nicolas FL, Gagnieu CH. Denatured thiolated collagen. II. Cross-linking by oxidation. Biomaterials 1997; 18(11): 815-821.

Nimni ME, Cheung D, Strates B, Kodama M, Sheikh K. Chemically modified collagen: a natural biomaterial for tissue replacement. J Biomed Mater Res 1987; 21(6): 741-771.

Park SN, Park JC, Kim HO, Song MJ, Suh H. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking. Biomaterials 2002; 23(4): 1205-1212.

Pieters M, Jerling JC, Weisel JW. Effect of freeze-drying, freezing and frozen storage of blood plasma on fibrin network characteristics. Thromb Res 2002; 107(5): 263-269.

Sachlos E, Czernuszka JT. Making tissue engineer-ing scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. Eur Cell Mater. 2003; 5: 29-39.

Schoof H, Apel J, Heschel I, Rau G. Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponges. J Biomed Mater Res 2001; 58(4): 352-357.

Temenoff JS, Athanasiou KA, LeBaron RG, Mikos AG. Effect of poly(ethylene glycol) molecular weight on tensile and swelling properties of oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels for cartilage tissue engineering. J Biomed Mater Res 2002; 59(3): 429-437.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de materia que comprende una molécula precursora que comprende albúmina no tiolada y al menos dos polímeros sintéticos unidos de manera covalente a dicha albúmina, teniendo cada uno de dichos al menos dos polímeros sintéticos un grupo funcional, seleccionándose dicho grupo funcional de manera que pueda ser capaz de reticularse con un grupo funcional de al menos otro polímero sintético por polimerización en cadena, formando dicho al menos otro polímero sintético una parte de al menos otra molécula precursora que comprende albúmina no tiolada y al menos dos polímeros sintéticos unidos de manera covalente a dicha albúmina, formando dicha reticulación un armazón.

2. Un armazón que comprende una pluralidad de moléculas de albúmina no tiolada y una pluralidad de polímeros sintéticos unidos de manera covalente a dichas moléculas de albúmina, estando cada una de dichas moléculas de albúmina unidas de manera covalente a al menos dos de dichos polímeros sintéticos, en el que dichos polímeros sintéticos están reticulados por polimerización en cadena.

3. Un hidrogel formado a partir del armazón de la reivindicación 2.

4. Una composición cosmética que comprende el hidrogel de la reivindicación 3.

5. Un método de generación de un armazón, comprendiendo el método:

(a) la unión de manera covalente de albúmina no tiolada a al menos dos polímeros sintéticos por medio de un primer grupo funcional de dichos al menos dos polímeros sintéticos, teniendo cada uno de dichos al menos dos polímeros sintéticos un segundo grupo funcional, para obtener de este modo una molécula precursora que comprende dicha albúmina y dichos polímeros sintéticos; y a continuación
(b) la reticulación de una pluralidad de dichas moléculas precursoras por polimerización en cadena de dicho segundo grupo funcional, para generar de este modo dicho armazón, por lo cual se excluyen los métodos de cirugía y terapia para el tratamiento del cuerpo humano o animal.

6. El método de la reivindicación 5, en el que dicho primer grupo funcional de dichos polímeros sintéticos está unido de manera covalente a un resto de cisteína de dicha albúmina.

7. La composición de materia de la reivindicación 1, el armazón de la reivindicación 2, o el hidrogel de la reivindicación 3, para su uso en la reparación de lesiones tisulares.

8. La composición de materia de la reivindicación 1, el armazón de la reivindicación 2, o el hidrogel de la reivindicación 3, en los que dicho polímero sintético es PEG.

9. La composición de materia de la reivindicación 1, en la que dicho grupo funcional se selecciona del grupo que consiste en acrilato y vinil sulfona.

10. La composición de materia de la reivindicación 1, el armazón de la reivindicación 2, o el método de la reivindicación 5, en el que dicha polimerización en cadena produce el reemplazo de enlaces insaturados en los monómeros con enlaces que unen a los monómeros.

11. La composición de materia de la reivindicación 1, el armazón de la reivindicación 2, o el hidrogel de la reivindicación 3, en los que dicha albúmina está desnaturalizada.

12. El método de la reivindicación 5, en el que dichos primer y segundo grupos funcionales son idénticos.

13. El método de la reivindicación 5, en el que dicha reticulación comprende adicionalmente la reticulación de una pluralidad de dichas moléculas precursoras con una pluralidad de polímeros sintéticos, teniendo cada uno de dichos polímeros sintéticos al menos dos grupos funcionales, seleccionándose dichos grupos funcionales de manera que puedan ser capaces de reticularse con un grupo funcional de dichas moléculas precursoras.

14. El armazón de la reivindicación 2, el hidrogel de la reivindicación 3, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 5, 6, 12 y 13, en los que una concentración de dicha pluralidad de polímeros sintéticos está en un intervalo de 1 mg/ml a 150 mg/ml.

15. La composición de materia, el armazón o hidrogel de la reivindicación 7 en los que dicha utilización en la reparación de lesiones tisulares es una utilización como un adhesivo.

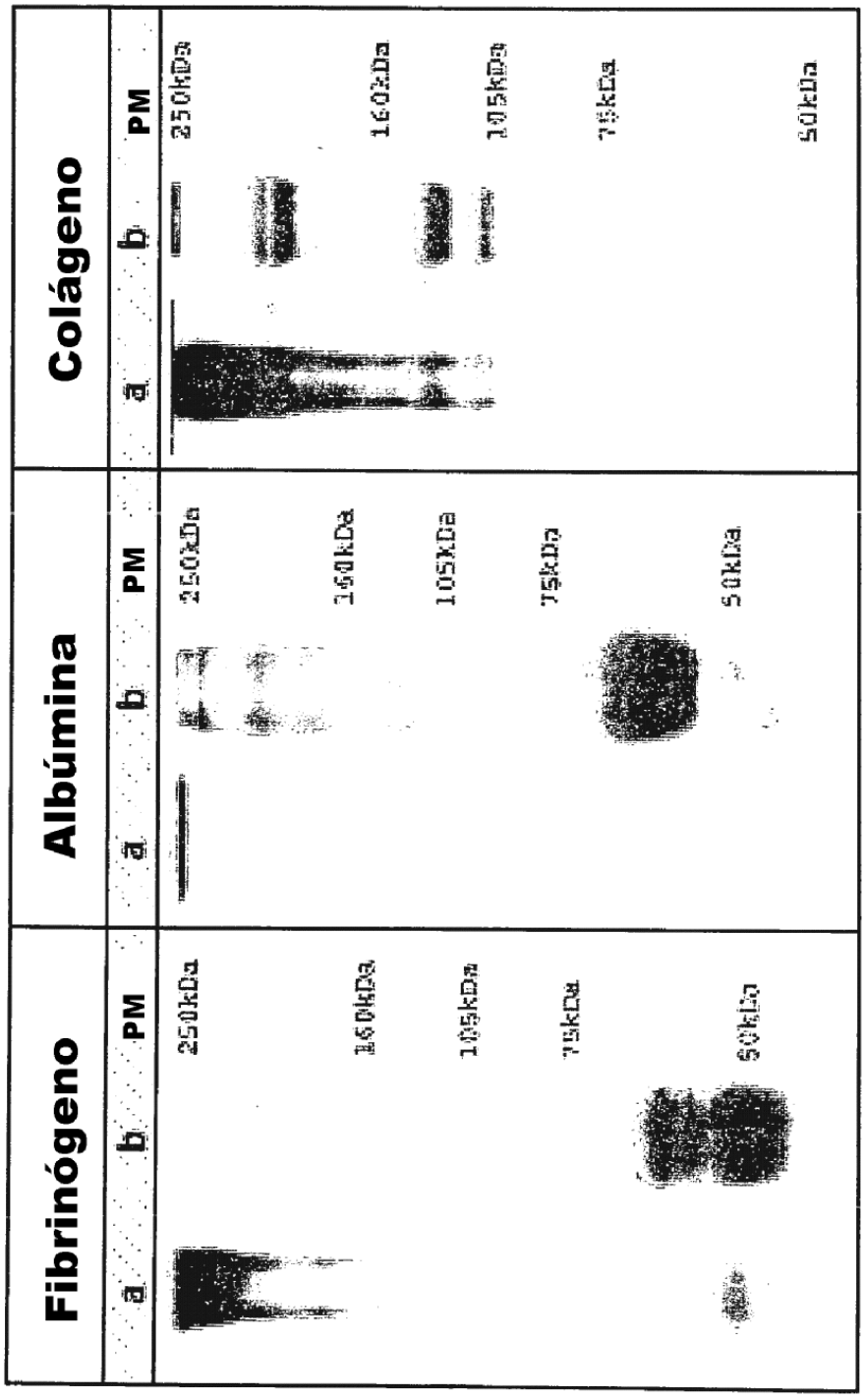
Fibrinógeno
a
b
PM
250kDa
160kDa
105kDa
75kDa
50kDa
Albúmina
a
b
PM
250kDa
160kDa
105kDa
75kDa
50kDa
Colágeno
a
b
PM
250kDa
160kDa
105kDa
75kDa
50kDa

Fig. 1

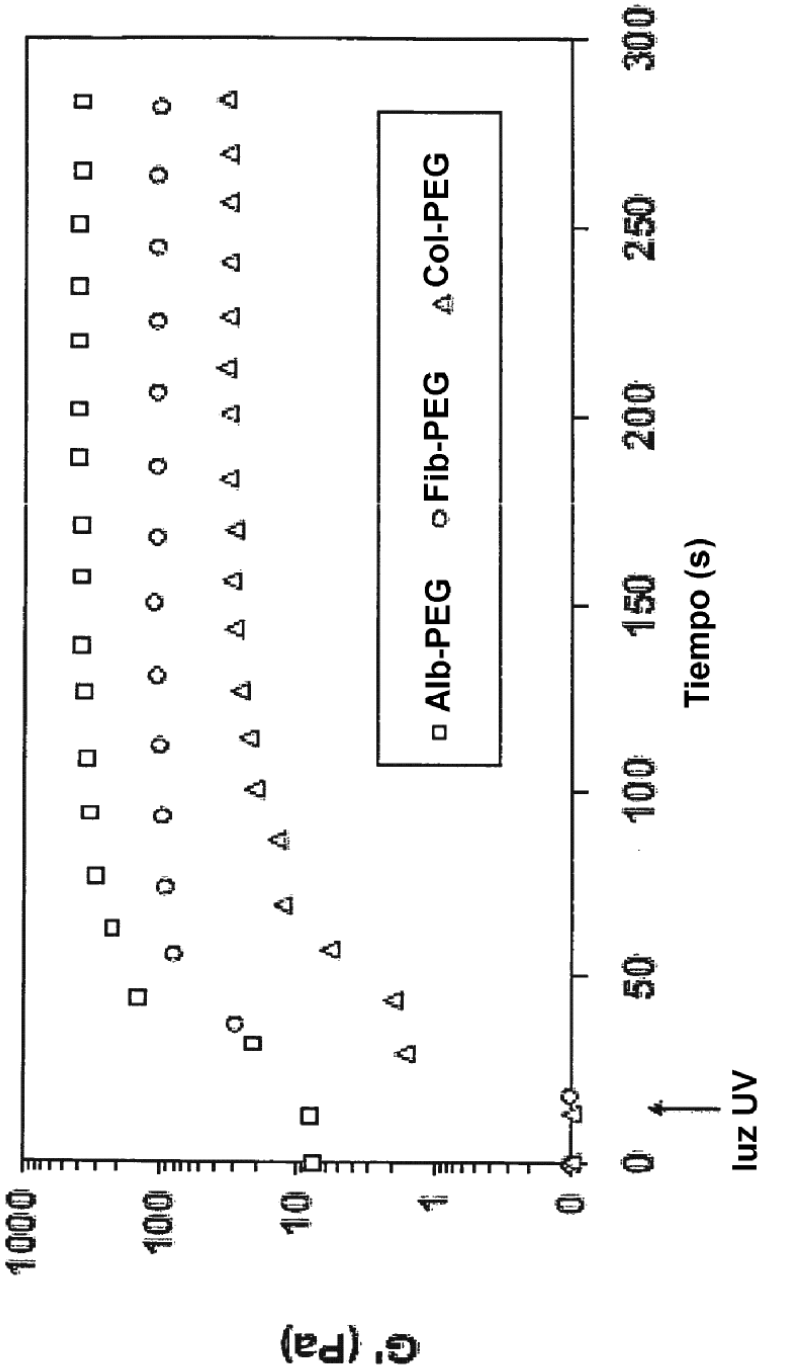
G' (Pa)
1000
100
10
1
0
0
50
100
150
200
250
300
Tiempo (s)
luz UV
Alb-PEG
Fib-PEG
Col-PEG

Fig. 2

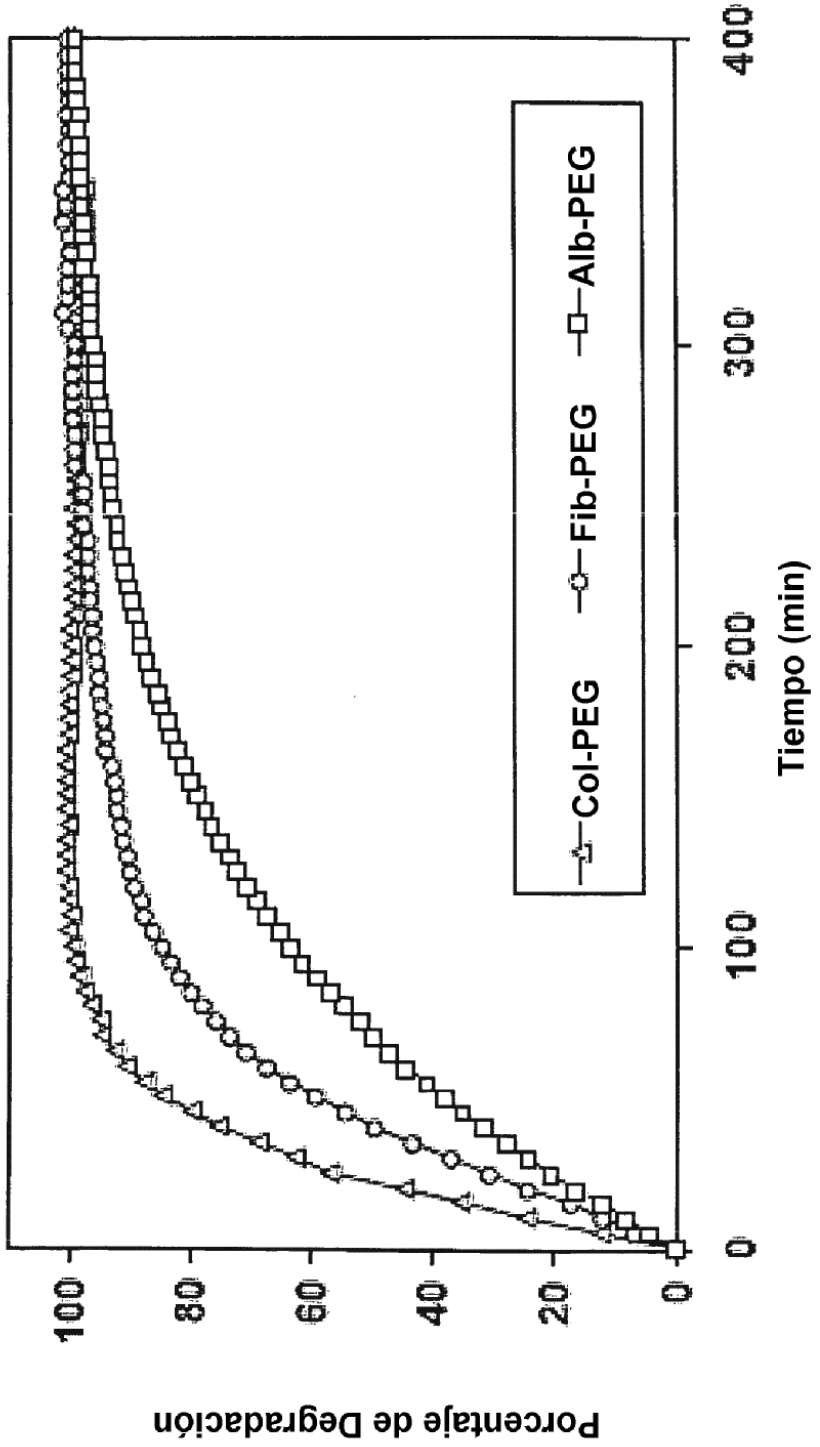
Porcentaje de Degradación
0
20
40
60
80
100
0
100
200
300
400
Tiempo (min)
Col-PEG
Fib-PEG
Alb-PEG

Fig. 3

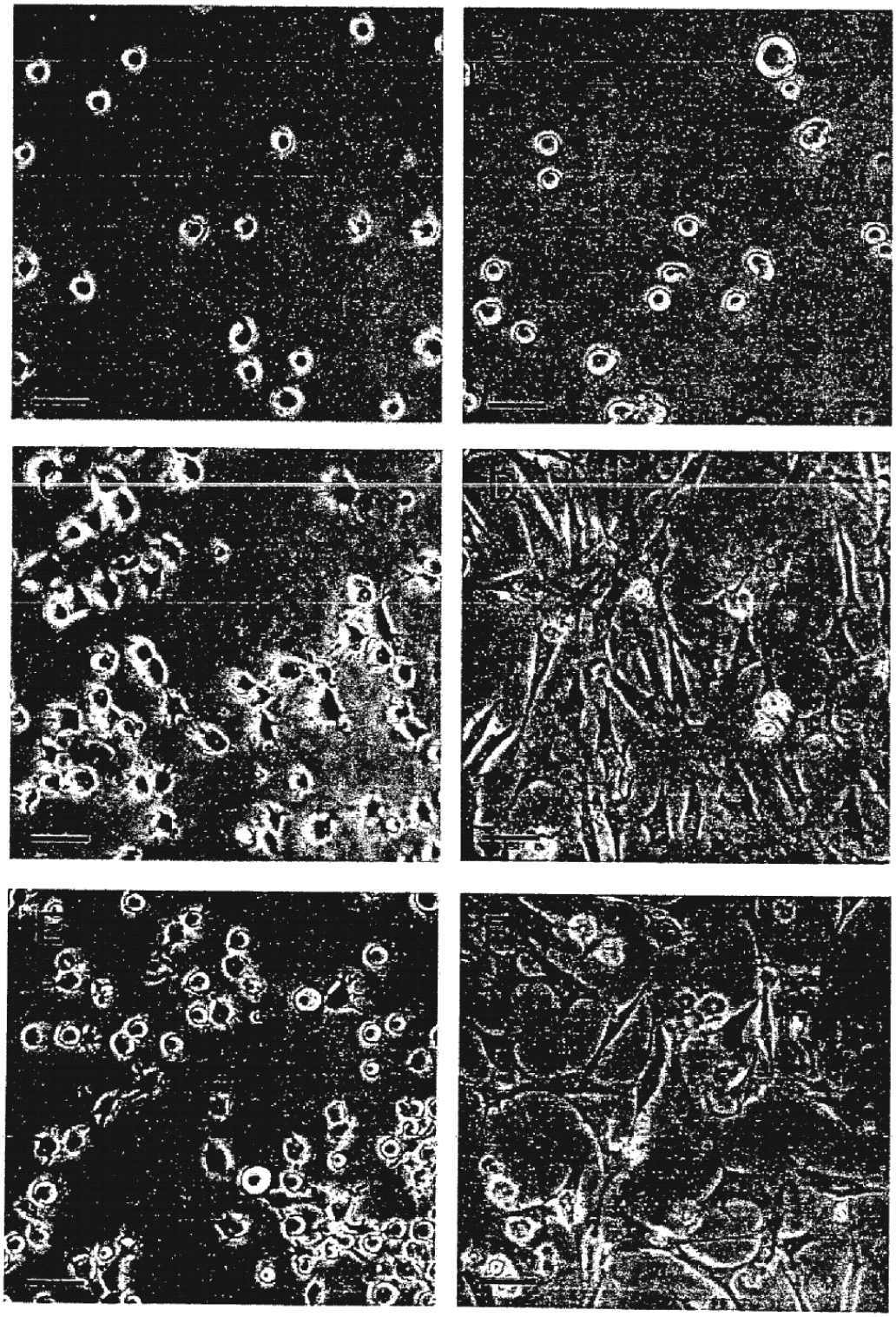

Fig. 4

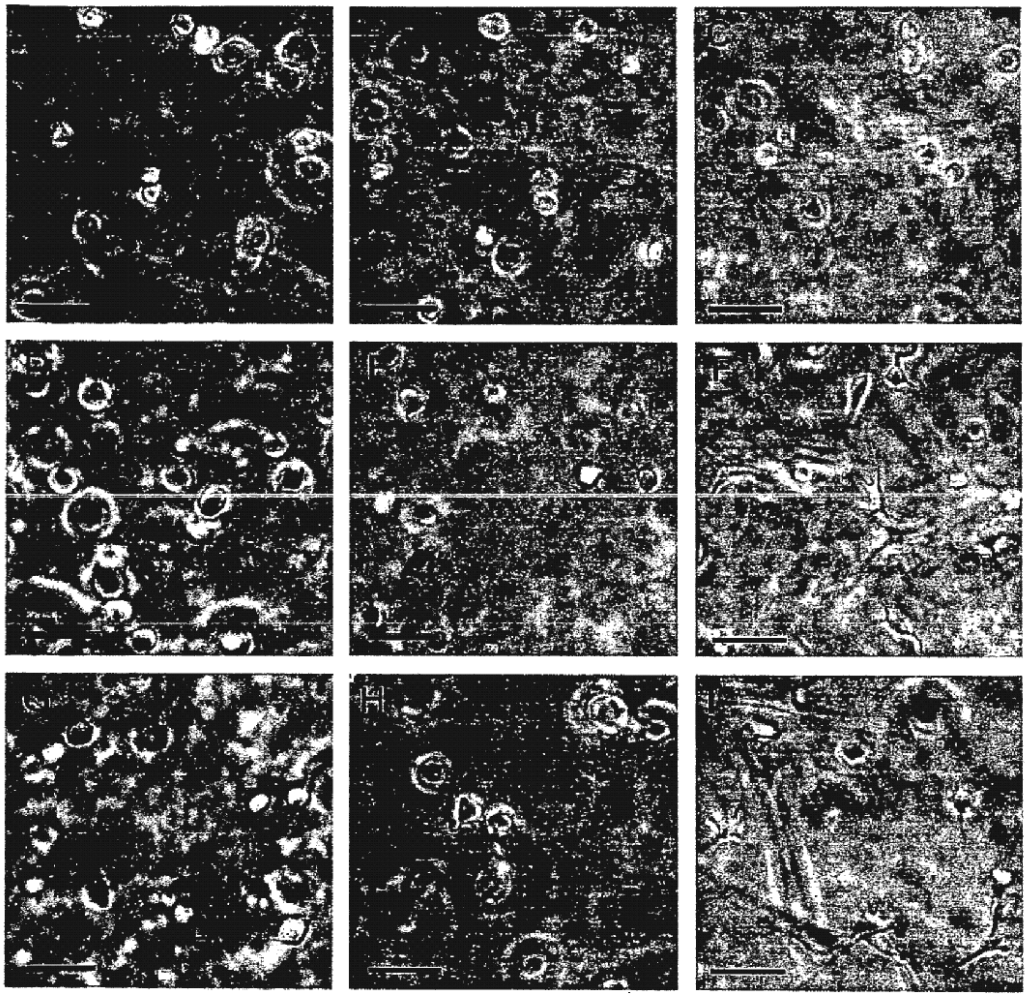

Fig. 5

Fig. 6a

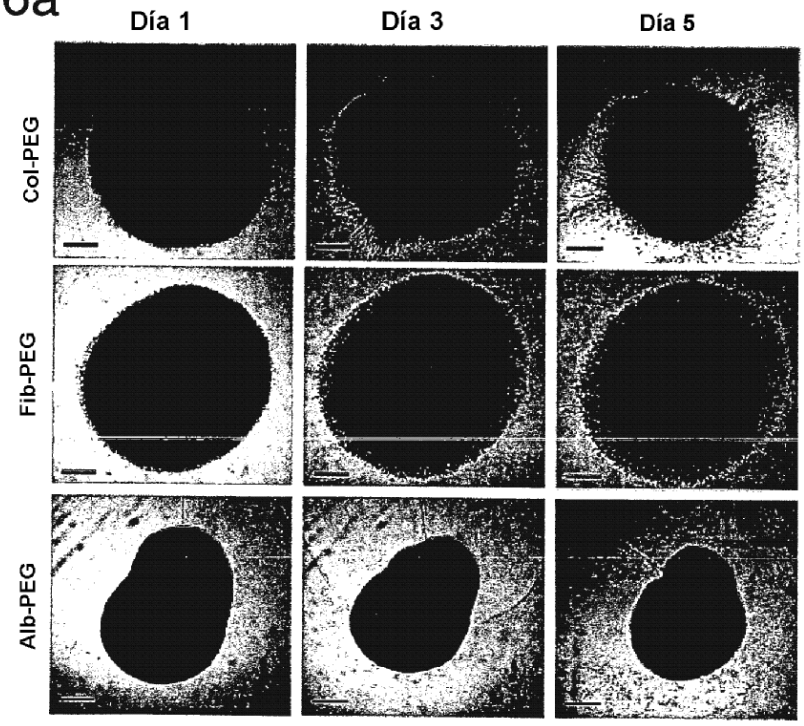

Fig. 6B

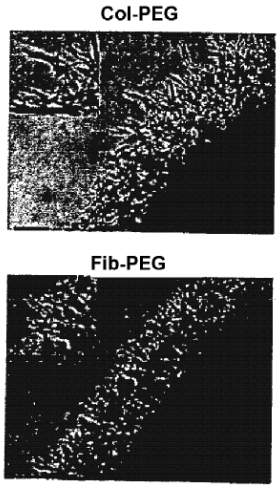
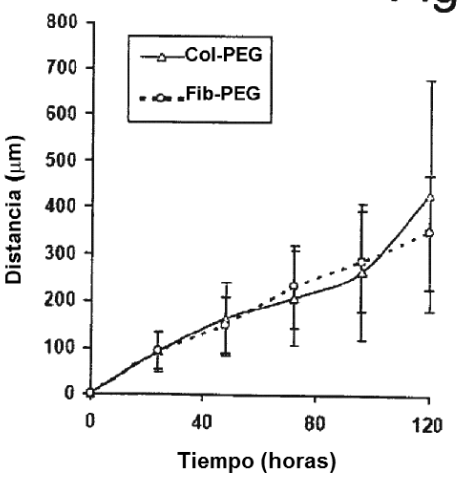
Fig. 6C