

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 856**

51 Int. Cl.:

**C08F 220/54** (2006.01)

**C08F 220/36** (2006.01)

**C08F 220/28** (2006.01)

**A61K 47/58** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2012 PCT/AU2012/001566**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13091001**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2012 E 12859961 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2794701**

54 Título: **Material compuesto de péptido-hidrogel**

30 Prioridad:

**19.12.2011 AU 2011905293**

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

**31.07.2017**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF SYDNEY (100.0%)  
Parramatta Road The University of Sydney  
New South Wales 2006, AU**

72 Inventor/es:

**DEGHANI, FARIBA;  
WEISS, ANTHONY;  
WEI, HUA;  
MITHIEUX, SUZANNE y  
FATHI, ALI**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 627 856 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

Material compuesto de péptido-hidrogel

Campo de la invención

5 La invención se refiere a polímeros para la formación de hidrogeles, y a composiciones e hidrogeles que incluyen tales polímeros. También se describe en el presente documento el uso de hidrogeles para la reparación o restauración de tejido, en particular, para la reparación o restauración de cartílago, especialmente cartílago articular.

Antecedentes de la invención

10 El cartílago articular es un tejido altamente especializado que reduce la fricción articular en los extremos de los huesos largos. Es predominantemente avascular, aneural y alinfático y consiste esencialmente en condrocitos, algunas células progenitoras y una matriz extracelular (MEC). La MEC se compone de una red de colágenos, en particular colágeno de tipo II, que proporciona al tejido su conformación y resistencia mecánica, y proteoglicanos, que proporcionan resistencia a tensiones mecánicas. También se encuentran fibras de elastina, predominantemente en la zona superficial.

15 La reparación de daño al cartílago articular es uno de los asuntos más desafiantes de la medicina musculoesquelética debido a la escasa capacidad intrínseca del cartílago para la reparación.<sup>1</sup> La reparación de cartílago natural es limitada porque el metabolismo y la densidad de condrocitos son bajos y el cartílago no tiene riego sanguíneo.<sup>2</sup>

20 Los tratamientos habituales para la reparación de cartílago incluyen trasplante autólogo de condrocitos (TAC), microfractura, mosaicoplastia y trasplante de aloinjerto osteocartilaginoso. Se ha usado TAC durante casi tres décadas para tratar defectos cartilaginosos de espesor completo a nivel mundial. Sin embargo, limitaciones inherentes de TAC incluyen la baja eficacia de las células debido principalmente a los números escasos obtenidos a través de biopsia y disimilitud estructural entre el tejido reparado y el cartílago nativo. Otros inconvenientes de estos tratamientos incluyen morbilidad de sitio de donante, intervenciones quirúrgicas complicadas, riesgos de infección y rechazo de injerto.<sup>3</sup>

25 Debido a su capacidad limitada de autorreparación, el cartílago es un candidato ideal para la ingeniería de tejidos. Puesto que el propio colágeno es un andamiaje tridimensional natural para células *in vivo*, se ha usado colágeno aislado de animales para varios andamiajes para ingeniería de tejidos *in vitro*, en formas tanto de gel o sólidas. Por ejemplo, el gel de colágeno tipo I, cuando se usa como andamiaje tridimensional para encapsulación celular, potencia la estabilidad y diferenciación de células encapsuladas.

30 Un problema con el colágeno es que solo no puede proporcionar la resiliencia a la compresión requerida en el cartílago articular que se proporciona normalmente por el proteoglicano, especialmente agregano y otras moléculas de tejido conjuntivo con capacidad de unión a agua. Además, cuando se reticula, el colágeno puede ser difícil de inyectar a temperatura ambiente.

35 Desafortunadamente, debido a varias características del colágeno que son confusas, se ha avanzado poco en la producción de andamiajes híbridos que incorporan tanto colágeno como moléculas sintéticas con capacidad de unión a agua. En particular, debido a su estructura reticular difusa, el colágeno es ineficaz en la retención de moléculas adsorbidas de manera pasiva, que residen principalmente en los espacios altamente hidratados entre las fibras de colágeno, que carecen de fuerzas de atracción. Otros problemas, tales como una escasa resistencia mecánica y la falta de adhesión específica de tejido y moléculas de señalización, también limitan el uso de colágeno purificado como andamiaje para ingeniería de tejidos. Además la composición química heterogénea del colágeno y su arquitectura molecular compleja presentan retos importantes cuando se realizan reacciones químicas con colágeno para modular sus propiedades bioquímicas.

40 Por otra parte, los andamiajes sintéticos, tales como hidrogeles, ofrecen un mejor control de la composición química y la arquitectura de la matriz. Sin embargo, se aplican varias limitaciones al uso de hidrogeles que consisten en moléculas sintéticas. En primer lugar, sin colágeno u otros componentes de la MEC, las características necesarias de conformación y resistencia mecánica del cartílago articular que surgen del colágeno no pueden derivarse de un hidrogel sintético. En segundo lugar, se forman hidrogeles a partir de polímeros que deben reticularse inicialmente antes de que pueda formarse el hidrogel. La reticulación es una etapa de fabricación adicional que aumenta la posibilidad de contaminación del hidrogel, particularmente con componentes tóxicos, o disminuye de otro modo la posibilidad de biocompatibilidad con el tejido. En tercer lugar, los hidrogeles sintéticos tienen bajas actividades biológicas y, por tanto, son limitados en la medida en que pueden proporcionar a un sustrato interacción con elementos biológicos.

5 Hasta la fecha, ha sido difícil proporcionar un andamiaje en el que se asocien colágeno y polímero sintético entre sí, de modo que se proporcione un hidrogel que tenga la resistencia mecánica, conformación y resiliencia a la compresión del cartílago articular. Aplicar simplemente una composición de colágeno y polímero sintético no funciona porque el colágeno y el polímero tienden a disociarse *in vivo* de modo que no se forma un hidrogel útil para la reparación del cartílago articular.

10 Lee *et al.*<sup>4</sup> describen un material compuesto en el que un polímero reticulado con UV se une químicamente a proteína modificada de colágeno (PMC). El material compuesto forma un sustrato sobre el que pueden crecer células y depositarse colágeno. El colágeno se une entonces a la PMC a través de interacciones no covalentes, formando de ese modo un material compuesto de hidrogel biosintético *in vivo*. El problema con este enfoque es que se basa en células existentes en tejido cartilaginoso para proporcionar colágeno. Eso requiere o bien que se infiltren células endógenas a través del cartílago articular, lo que es poco probable dado que el cartílago es esencialmente acelular, o bien el trasplante de condrocitos o células relacionadas. Además, el enfoque requiere una reticulación previa de polímeros para formar el hidrogel.

15 El documento WO 01/70288 A2 se refiere a una formulación de polímero sensible a la temperatura para la administración de proteínas osteoinductoras. El documento WO 2008/045904 A2 se refiere a copolímeros biocompatibles y a composiciones que comprenden los copolímeros. El documento WO 2010/127254 A2 se refiere a copolímeros biocompatibles y a composiciones que comprenden los copolímeros. Schmaljohann *et al.* (2003) *Biomacromolecules*, vol. 4, n.º 6, págs. 1733-1739, se refiere a películas de PNiPAAm-g-PEG termosensibles para el desprendimiento celular controlado.

20 Existe la necesidad de hidrogeles mejorados que modelen eficazmente las características de conformación, resistencia mecánica y resiliencia del cartílago articular.

Existe la necesidad de materiales compuestos que contienen MEC que modelen eficazmente las características de capacidad de unión a agua y resiliencia del cartílago articular proporcionadas en otros casos por el componente de proteoglicano del cartílago articular.

25 Existe la necesidad de hidrogeles sintéticos que modelen eficazmente las características de conformación y resistencia mecánica del cartílago articular proporcionadas en otros casos por el colágeno y componente de MEC del cartílago articular.

Existe la necesidad de hidrogeles sintéticos que puedan formarse sin el uso de reticulación química, o reticulación mediante irradiación UV o similar.

30 Existe la necesidad de hidrogeles que se unan a factores de crecimiento, fármacos y similares, y que sean un sustrato útil para el crecimiento de células sobre el mismo.

Existe la necesidad de composiciones para la reparación del cartílago articular que sean inyectables a temperatura ambiente y que formen un hidrogel a la temperatura corporal.

#### Sumario de la invención

35 La invención trata de abordar, o al menos proporcionar una mejora de, una o más de las limitaciones, necesidades o problemas mencionados anteriormente y en una realización proporciona un polímero para la formación de un hidrogel. El polímero incluye:

40 - un primer monómero con capacidad de unión a agua en el que el primer monómero es un poliéter seleccionado de polietilenglicol (PEG), oligo(etilenglicol) (OEG), poli(óxido de etileno) (PEO), poli(óxido de etileno-co-óxido de propileno) (PPO), copolímeros de bloque o al azar de co-poli(óxido de etileno) y poli(alcohol vinílico) (PVA);

- un segundo monómero para conferir propiedades mecánicas a un hidrogel en el que el segundo monómero es un metacrilato o un poliéster seleccionado de metacrilato de hidroxietilo (HEMA), poli(ácido láctico), poli(caprolactona), poli(glicolida), poli(glicolida-co-lactida), poli(glicolida-co-caprolactona) y copolímeros al azar de los mismos; y

45 - un tercer monómero para la unión a una proteína de la matriz extracelular en el que el tercer monómero tiene grupos funcionales electrófilos para la unión a una proteína de la matriz extracelular seleccionados de N-hidroxisuccinimidas (NHS), N-hidroxisulfosuccinimida (SNHS), succinimida N-hidroxietoxilada (ENHS) y N-acriloxisuccinimida (NAS).

En determinadas realizaciones, el polímero incluye además:

- un cuarto monómero para conferir características de transición de fase a un hidrogel que permitan la inyección a temperatura ambiente, y la formación de gel a la temperatura corporal.

En otras realizaciones se proporciona una composición para la formación de un hidrogel. La composición incluye:

- una proteína de la matriz extracelular; y

5 - un polímero según la invención.

La unión de la proteína de la matriz extracelular al tercer monómero reticula el polímero en la composición, permitiendo de ese modo la formación de un hidrogel cuando la composición se pone en contacto con agua.

Este segundo monómero permite que el polímero en la composición contribuya a propiedades mecánicas adicionales (tal como resistencia mecánica y resiliencia) para el hidrogel.

10 En realizaciones adicionales, el polímero en la composición incluye además:

- un cuarto monómero para conferir características de transición de fase a un hidrogel que permitan la inyección a temperatura ambiente, y la formación de gel a la temperatura corporal.

Aún en realizaciones adicionales, se proporciona un hidrogel que incluye:

- agua;

15 - una proteína de la matriz extracelular; y

- un polímero según la invención.

La unión de la proteína de la matriz extracelular al tercer monómero reticula el polímero en el hidrogel, formando de ese modo el hidrogel.

20 Tal como se mencionó anteriormente, el segundo monómero permite que el polímero contribuya a propiedades mecánicas adicionales (tal como resistencia mecánica y resiliencia) para el hidrogel.

En realizaciones adicionales, el polímero en el hidrogel incluye además:

- un cuarto monómero para conferir características de transición de fase a un hidrogel que permitan la inyección a temperatura ambiente, y la formación de gel a la temperatura corporal.

25 También se describen en el presente documento métodos y usos proporcionados del polímero y la composición descritos anteriormente para la formación de un hidrogel, y usos del hidrogel para la reparación o restauración del cartílago articular.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Diferentes métodos para la conjugación de proteína y PNPFO para la formación de hidrogeles de proteína-PNPFO.

30 Figura 2. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de PNPFO.

Figura 3. Solubilidad de copolímeros sintetizados a diferente fracción molar de HEMA-PLA en disolución acuosa a 4°C para un índice de lactato de 3 (a) y 6 (b). (\*, \*\* y \*\*\* representan  $p < 0,05$ ,  $< 0,01$ , y  $< 0,001$ , respectivamente).

35 Figura 4. Bioconjugación de elastina y copolímero de PNPFO en PBS (a), formación de hidrogel de biopolímero a 37°C (b), espectros de FTIR de hidrogel de biopolímero y copolímero de PNPFO (c) y prueba de estabilidad de hidrogeles de elastina-PNPFO y PNPFO en un entorno fisiológico (d).

Figura 5. Espectros de ATR-FTIR de polímero (color rojo) e hidrogel (color negro).

Figura 6. Imagen macroscópica del hidrogel (polímero y colágeno) formado a 37°C.

Figura 7. Efecto de la temperatura sobre el módulo de elasticidad de diferente composición de copolímero (a)

módulo de elasticidad de diferente composición de copolímero a lo largo del tiempo a 37°C (e). Temperatura de gelificación ((b) y (c)) y tiempo de gelificación ((e) y (f)) de diferentes composiciones de copolímero sintetizadas con índices de lactato de 3 ((b) y (e)) y 6 en HEMA-PLA ((c) y (f)).

5 Figura 8. Eficiencia de conjugación de elastina a diferentes copolímeros. Se midió la concentración de elastina después de una incubación durante 24 h en PBS a 37°C. HEMA-PLA con índice de lactato de 3 (a) y 6 (b).

Figura 9. Temperatura de gelificación de precursores de biopolímero formados con copolímero antes y después de degradación (a) y pérdida de peso de diferentes hidrogeles de biopolímero a lo largo del tiempo en PBS a 37°C (b).

Figura 10. Retención de la estructura de hidrogeles de proteína-PNPHO con diferentes grados de conjugación (a) y el efecto del nivel de conjugación sobre varianzas volumétricas de los hidrogeles (b).

10 Figura 11. Imagen de microscopía óptica de fibroblastos que crecen sobre matraz de ingeniería de tejidos después de 24 horas (a) y 48 horas (b) en las proximidades de hidrogeles de elastina-PNPHO<sub>8(6)5</sub>.

Figura 12. Tinción de nucleolos de Hoechst 33258 de fibroblastos, encapsulados dentro de un hidrogel de elastina-PNPHO después de 24 horas (a) y 72 horas ((b)-(d)).

15 Figura 13. Crio-sección que muestra condrocitos ovinos primarios (algunos en división) en lagunas en un hidrogel de elastina (a) y sección teñida con hematoxilina adyacente que confirma condrocitos viables (b). La barra de escala es de 100 µm.

#### Descripción detallada de las realizaciones

20 Al reconocer las limitaciones anteriores en el campo de los hidrogeles sintéticos biocompatibles, los inventores han diseñado un nuevo polímero que permite la formación de un hidrogel útil para la reparación del cartílago articular. Consideraciones clave en el diseño del polímero han sido garantizar que (i) todos los componentes del hidrogel pueden suministrarse desde fuentes externas y sin basarse en maquinaria celular o tisular; (ii) los componentes, en particular el polímero sintético y la proteína de la matriz extracelular (PMEC) se unen de modo que no pueden disociarse *in vivo*; (iii) no se requiere reticulación química y UV; (iv) el hidrogel puede inyectarse a temperatura ambiente; (v) el hidrogel es un sustrato compatible para células y tejido.

25 Al diseñar el polímero, los inventores han reconocido que un potencial aún sin aprovechar de polímeros basados en proteína tales como colágeno como agente de reticulación de polímeros sintéticos podría realizarse incorporando un monómero que tiene un grupo funcional para la unión a colágeno u otras PMEC a un polímero sintético, permitiendo de ese modo que la PMEC reticule el polímero para la formación de andamiajes de hidrogel que pueden usarse para la ingeniería de tejidos, y en particular en la reparación y regeneración de cartílago. Los hidrogeles de la presente invención se forman combinando simplemente una PMEC (por ejemplo, colágeno) con un polímero hidrófilo que puede unirse a la PMEC. Por tanto, los hidrogeles de la presente invención pueden formarse sin el uso de ningún agente adicional (por ejemplo, iniciadores de la reticulación) o condiciones especiales (por ejemplo, irradiación de los polímeros con radiación UV y/o IR) para efectuar la reticulación de los polímeros, mientras que se proporciona todavía un andamiaje que puede usarse para encapsular células y otros componentes de la MEC para ayudar en la reparación y regeneración de cartílago, tras la administración del hidrogel al sitio deseado. El hidrogel de la presente invención también tiene la ventaja añadida de poder administrarse fácilmente (por ejemplo, mediante inyección) directamente al sitio deseado, debido sus propiedades de transición de fase.

30 Las propiedades ventajosas de los hidrogeles de la presente invención pueden atribuirse a la combinación de las PMEC y los componentes particulares de los polímeros de la presente invención. En particular, los polímeros de la presente invención presentan la capacidad de unión a agua y capacidad de reticulación (que también puede denominarse capacidad de conjugación) requeridas, de tal manera que pueden unirse a las PMEC y formar hidrogeles que contienen las PMEC, además de tener, en algunas realizaciones, componentes particulares que contribuyen a las propiedades de resistencia mecánica, conformación, resiliencia y transferencia de fase del hidrogel, una vez formado. Las PMEC, además de proporcionar un entorno que imita, en cierta medida, el entorno natural del tejido que va a sustituirse y/o repararse, también proporcionan la resistencia mecánica y conformación requeridas a los hidrogeles de la presente invención. Esto es particularmente importante en aplicaciones tales como la reparación y sustitución de cartílago, en las que es necesario que los hidrogeles resistan las tensiones impuestas normalmente sobre regiones de soporte de cartílago, tales como las articulaciones.

45 Los presentes inventores han desarrollado polímeros que tienen las características deseadas para su uso en hidrogeles destinados para la reparación de tejido, y en particular aquellos hidrogeles destinados para la reparación y/o sustitución de cartílago, combinando componentes que o bien presentan de manera inherente algunas de estas características, o bien que pueden proporcionar tales características al hidrogel una vez que se forma. Por consiguiente, los polímeros de la presente invención incluyen, dentro de su estructura, unidades particulares (por

ejemplo, monómeros, macromonómeros, y similares) que se han elegido basándose en su capacidad para conferir las propiedades deseadas de capacidad de unión a agua, reticulación, resistencia mecánica, resiliencia y transferencia de fase a los polímeros de la presente invención, y posteriormente a los hidrogeles formados a partir de tales polímeros. Además, pueden ajustarse las propiedades de estos polímeros (y, por tanto, los hidrogeles formados a partir de estos polímeros), en el sentido de que diferentes monómeros, así como diferentes proporciones de estos monómeros, pueden incorporarse selectivamente en los polímeros

Estas propiedades ventajosas de los hidrogeles de la presente invención se analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva, y en particular, se presentan en los ejemplos, que muestran que los hidrogeles de la presente invención pueden prepararse de manera simple usando una simple combinación de los polímeros de la presente invención con las P MEC, y que los hidrogeles así formados presentan las propiedades requeridas de resistencia mecánica, resiliencia y conformación, lo que permite que se usen en aplicaciones de ingeniería de tejidos.

#### A. Polímeros

El término "polímero", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula grande (macromolécula) que se compone de unidades estructurales de repetición (monómeros). Estas subunidades se conectan normalmente mediante enlaces químicos covalentes. Los polímeros pueden ser polímeros lineales o ramificados. Los polímeros de la presente invención son copolímeros que comprenden tres o más monómeros diferentes.

El polímero de la presente invención incluye un primer monómero con capacidad de unión a agua, un segundo monómero que puede conferir propiedades mecánicas a un hidrogel, y un tercer monómero que tiene un grupo funcional para la unión a una P MEC.

El término "monómero", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad estructural que puede combinarse para formar un polímero, pero que puede ser a su vez un polímero, o un derivado de un monómero o polímero. Los monómeros de este tipo también se denominan en el presente documento "macromonómeros".

#### A1. Monómeros con capacidad de unión a agua

Tal como se comentó anteriormente, las propiedades ventajosas de los hidrogeles de la presente invención pueden atribuirse a la combinación de las P MEC y los componentes particulares de los polímeros de la presente invención. Una propiedad ventajosa particular de los polímeros de la presente invención es su capacidad de unión a agua. La presencia de agua en los hidrogeles de la presente invención proporciona tanto un entorno que se asemeja al entorno natural del tejido dañado (lo que ayuda en la regeneración del tejido), como la resistencia a la compresión requerida al hidrogel.

Por consiguiente, los polímeros de la presente invención deben incluir monómeros o unidades que puedan unirse a agua hasta una capacidad tal que pueda formarse un hidrogel cuando el polímero se pone en contacto con una P MEC y agua. Además, el hidrogel así formado debe tener la resistencia a la compresión y resiliencia requeridas. Esto es importante para aplicaciones tales como la reparación y restauración de cartílago, porque, tal como se comentó anteriormente, el cartílago está sometido habitualmente a tensiones mecánicas significativas.

Un experto en la técnica entenderá que es necesario que estén presentes monómeros con capacidad de unión a agua en los polímeros de la presente invención en proporciones que sean suficientes para producir un polímero que cumpla estos requisitos. Generalmente, la proporción de monómeros con capacidad de unión a agua en el polímero es una razón molar de aproximadamente 10:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:5 de monómeros con capacidad de unión a agua:resistencia mecánica. De hecho, es necesario que los monómeros con capacidad de unión a agua hagan no solo que el polímero sea hidrófilo, sino que confieran capacidades de unión a agua mucho más significativas al polímero. Por consiguiente, los polímeros según la presente invención tendrán capacidades de unión a agua de entre aproximadamente el 70% y aproximadamente el 500%, entre aproximadamente el 80% y aproximadamente el 400%, entre aproximadamente el 90% y el 300% o entre aproximadamente el 100% y el 200%. Por ejemplo, la capacidad de unión a agua de los polímeros de la presente invención es de aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 100%, aproximadamente el 110%, aproximadamente el 120%, aproximadamente el 130%, aproximadamente el 140%, aproximadamente el 150%, aproximadamente el 160%, aproximadamente el 170%, aproximadamente el 180%, aproximadamente el 190%, aproximadamente el 200%, aproximadamente el 210%, aproximadamente el 220%, aproximadamente el 230%, aproximadamente el 240%, aproximadamente el 250%, aproximadamente el 260%, aproximadamente el 270%, aproximadamente el 280%, aproximadamente el 290%, aproximadamente el 300%, aproximadamente el 310%, aproximadamente el 320%, aproximadamente el 330%, aproximadamente el 340%, aproximadamente el 350%, aproximadamente el 360%, aproximadamente el 370%, aproximadamente el 380%, aproximadamente el 390%, aproximadamente el 400%, aproximadamente el 410%, aproximadamente el 420%, aproximadamente el 430%, aproximadamente el 440%, aproximadamente el 450%,

aproximadamente el 460%, aproximadamente el 470%, aproximadamente el 480%, aproximadamente el 490% o el aproximadamente el 500%. Los ejemplos de monómeros con capacidad de unión a agua incluyen aquellos que pueden sintetizarse para dar polímeros tales como poliéteres (por ejemplo, poli(óxidos de alquileo) tales como polietilenglicol (PEG), oligo(etilenglicol) (OEG), poli(óxido de etileno) (PEO), poli(óxido de etileno-co-óxido de propileno) (PPO), copolímeros de bloque o al azar de co-poli(óxido de etileno), poli(alcohol vinílico) (PVA)), poli(vinil-pirrolidinona) (PVP), poli(aminoácidos) y dextrano. Los poliéteres, y más particularmente oligo(oxialquilenos) (por ejemplo, OEG), se prefieren especialmente, porque tienen la capacidad de unión a agua requerida, son sencillos de sintetizar y/o adquirir, y son inertes, en el sentido de que producen una respuesta inmunitaria mínima o ausente a partir de los tejidos en los que se sitúan. Además, cualquiera de una variedad de funcionalidades hidrófilas pueden usarse para hacer que un monómero (y, por tanto, un polímero formado a partir de un monómero de este tipo) sea soluble en agua. Por ejemplo, pueden incorporarse grupos funcionales como fosfato, sulfato, amina cuaternaria, hidroxilo, amina, sulfonato y carboxilato, que son solubles en agua, en un monómero para hacer que sea soluble en agua.

Un polímero según la invención incluye un monómero con capacidad de unión a agua en el que el monómero es un poliéter seleccionado de polietilenglicol (PEG), oligo(etilenglicol) (OEG), poli(óxido de etileno) (PEO), poli(óxido de etileno-co-óxido de propileno) (PPO), copolímeros de bloque o al azar de co-poli(óxido de etileno) y poli(alcohol vinílico) (PVA).

#### A2. Conferir propiedades mecánicas

Tal como se comentó anteriormente, las propiedades ventajosas de los hidrogeles de la presente invención pueden atribuirse, en parte, a los componentes particulares que componen los polímeros de la presente invención. Los polímeros de la presente invención pueden contribuir a propiedades mecánicas adicionales a los hidrogeles de la presente invención, lo que produce hidrogeles que, debido a su resistencia mecánica y resiliencia, pueden usarse en la reparación y restauración de tejidos (por ejemplo, cartílago) que residen en entornos de altas tensiones, tales como articulaciones.

Por consiguiente, los polímeros de la presente invención pueden incluir monómeros o unidades que pueden proporcionar la resistencia mecánica y resiliencia requeridas en el cartílago articular. Esto es importante para aplicaciones tales como la reparación y restauración de cartílago, porque, tal como se comentó anteriormente, el cartílago está sometido habitualmente a tensiones mecánicas significativas.

Un experto en la técnica entenderá que es necesario que estén presentes monómeros que puedan conferir propiedades mecánicas a un hidrogel en los polímeros de la presente invención en proporciones que sean suficientes para producir un hidrogel que tiene las propiedades mecánicas deseadas. Generalmente, la proporción de monómeros "mecánicos" en el polímero es una razón molar de aproximadamente 10:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:5 de monómeros con capacidad de unión a agua:resistencia mecánica.

Los ejemplos adecuados de monómeros que pueden conferir propiedades mecánicas (por ejemplo, resistencia a la compresión) a un hidrogel incluyen acrilatos tales como metacrilato de hidroxietilo (HEMA), poliésteres tales como poli(ácido láctico), poli(caprolactona), poli(glicolida) y sus copolímeros al azar (por ejemplo, poli(glicolida-co-lactida) y poli(glicolida-co-caprolactona)).

#### A3. Unión a P MEC

Tal como se comentó anteriormente, los hidrogeles de la presente invención se forman combinando un polímero de la presente invención con una P MEC, en presencia de agua. Con el fin de combinar eficazmente los polímeros de la presente invención con una P MEC, los inventores han incluido, en los polímeros de la presente invención, monómeros o unidades que tienen capacidad de reticulación.

Esta capacidad de reticulación significa que los polímeros pueden unirse a las P MEC (tal como se comenta adicionalmente a continuación) y, al hacerlo, reticulan las P MEC para formar hidrogeles que contienen las P MEC. Alternativamente, mediante un mecanismo similar, las P MEC actúan como agente de reticulación, reticulando de ese modo el polímero para formar un hidrogel.

Concibiendo un diseño de polímero único mediante el cual se proporciona un monómero que tiene un grupo funcional para la unión con colágeno, elastina o similar en el polímero, los inventores han reconocido que no es necesario que se reticulen adicionalmente los polímeros con, por ejemplo, reticulación química o UV, para formar un hidrogel.

Además, mediante la unión covalente de la P MEC al polímero, la P MEC se retiene de manera más eficaz en la red

del hidrogel, lo que significa que, una vez que se administra el hidrogel al sitio de reparación, la PMEC no puede migrar fácilmente lejos del sitio. Esto significa que se mantiene la integridad estructural del gel en el sitio de reparación (debido a las propiedades mecánicas de las PMEC, tal como se mencionó anteriormente) y ayuda a proporcionar un entorno en el sitio de reparación que imita estrechamente el entorno natural del tejido.

- 5 Con el fin de producir un polímero que pueda unirse a una PMEC, un experto en la técnica entenderá que es necesario que estén presentes monómeros que puedan unirse a una PMEC en los polímeros de la presente invención en proporciones que sean suficientes para reticularse con una PMEC, de tal manera que pueda formarse un hidrogel en presencia de agua. Generalmente, la proporción de monómeros de "reticulación" en el polímero es una razón molar de al menos aproximadamente 1:1 de monómero de reticulación: monómero con capacidad de unión a agua. Esta razón puede aumentarse hasta, por ejemplo, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 6:1, aproximadamente 7:1, aproximadamente 8:1, aproximadamente 9:1 y aproximadamente 10:1.

15 Los monómeros que pueden unirse a las PMEC tienen generalmente grupos funcionales o bien electrófilos o bien nucleófilos, de tal manera que un grupo funcional nucleófilo en, por ejemplo, una PMEC puede reaccionar con un grupo funcional electrófilo en el monómero, para formar un enlace covalente. Preferiblemente, el polímero comprende más de dos monómeros con capacidad de unión a PMEC, de modo que, como resultado de reacciones de tipo electrófilo-nucleófilo, el polímero se combina con la PMEC para formar productos poliméricos reticulados. Tales reacciones se denominan "reacciones de reticulación".

20 Por tanto, por ejemplo, si una PMEC tiene grupos funcionales nucleófilos tales como aminas, el polímero puede tener grupos funcionales electrófilos tales como *N*-hidroxisuccinimidas (NHS). Otros grupos funcionales electrófilos que son adecuados para su uso en la presente invención son *N*-hidroxisulfosuccinimida (SNHS) y succinimida *N*-hidroxietoxilada (ENHS). Un ejemplo de un monómero de este tipo es *N*-acriloxisuccinimida (NAS). Por otra parte, si una PMEC tiene grupos funcionales electrófilos, entonces el polímero puede tener grupos funcionales nucleófilos tales como aminas o tioles.

25 Un polímero según la invención incluye un monómero para la unión a una proteína de la matriz extracelular, en el que el monómero tiene grupos funcionales electrófilos para la unión a una proteína de la matriz extracelular seleccionados de *N*-hidroxisuccinimidas (NHS), *N*-hidroxisulfosuccinimida (SNHS), succinimida *N*-hidroxietoxilada (ENHS) y *N*-acriloxisuccinimida (NAS).

#### A4. Monómeros con transición de fase

30 En otra realización de la presente invención, el polímero puede incluir además un cuarto monómero que puede conferir características de transición de fase al hidrogel, permitiendo de ese modo que el material compuesto esté en forma inyectable a temperatura ambiente, y en una forma de hidrogel a la temperatura corporal. Además, estas características de transición de fase permiten que los polímeros de la presente invención formen hidrogeles, pudiendo variarse diversas propiedades (tal como viscosidad) de los cuales alterando factores tales como pH y temperatura. Se diseñan hidrogeles inyectables termosensibles de tal manera que la temperatura crítica de disolución inferior (LCST) está por debajo de la temperatura corporal. Por tanto, puede lograrse la gelificación simplemente aumentando la temperatura del hidrogel, por ejemplo, dejando que se caliente hasta la temperatura corporal (lo que se produce cuando se administra el hidrogel al organismo). Diversos polímeros termosensibles e inyectables incluyendo copolímeros de poli(óxido de etileno)/poli(óxido de propileno) y poli(*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) son adecuados para su uso en la presente invención. PNIPAAm es particularmente adecuado, ya que tiene una LCST de 32°C, permitiendo que esté en forma de gel a la temperatura corporal.

45 Con el fin de producir un polímero que sea termosensible, un experto en la técnica entenderá que es necesario que estén presentes monómeros con transición de fase en los polímeros de la presente invención en proporciones que sean suficientes como para permitir que se varíe la viscosidad de un hidrogel que incluye el polímero mediante la exposición del hidrogel a diferentes condiciones de temperatura y pH. Generalmente, la proporción de monómeros con "transición de fase" en el polímero es una razón molar de al menos aproximadamente 9:1 de monómero con transición de fase:monómero con capacidad de unión a agua. Esta razón puede aumentar hasta, por ejemplo, aproximadamente 10:1, aproximadamente 11:1, aproximadamente 12:1, aproximadamente 13:1, aproximadamente 14:1, aproximadamente 15:1, aproximadamente 16:1, aproximadamente 17:1, aproximadamente 18:1, aproximadamente 19:1, aproximadamente 20:1, aproximadamente 21:1, aproximadamente 22:1, aproximadamente 23:1, aproximadamente 24:1, aproximadamente 25:1, aproximadamente 26:1, aproximadamente 27:1, aproximadamente 28:1, aproximadamente 29:1 y una razón molar de aproximadamente 30:1 de monómero con transición de fase:monómero con capacidad de unión a agua.

55 Los presentes inventores han encontrado que la viscosidad de los hidrogeles de la presente invención, a menores temperaturas (por ejemplo, 4°C), es tal que el hidrogel puede inyectarse. El hidrogel se vuelve entonces más viscoso a medida que aumenta la temperatura, formándose un gel que tiene la viscosidad deseada a una temperatura de aproximadamente 37°C. Esto significa que el hidrogel de la presente invención, a temperaturas más frías, puede

administrarse fácilmente al sitio de reparación, por ejemplo, mediante inyección. El hidrogel se transforma entonces, calentándose en el organismo hasta la temperatura corporal natural, en un gel más viscoso, que tiene las propiedades deseadas de resistencia mecánica y elasticidad.

A5. Otras propiedades de polímeros y síntesis de polímeros

5 Un experto en la técnica entenderá que, combinando diferentes tipos de monómeros, pueden producirse polímeros que tienen una gama de diferentes propiedades. Además, incorporando monómeros o grupos funcionales particulares en un polímero preexistente, pueden modificarse las propiedades del polímero. Por ejemplo, puede usarse la copolimerización de monómeros de HEMA con otros monómeros (tales como metacrilato de metilo) para modificar propiedades tales como el hinchamiento y propiedades mecánicas. Los monómeros también pueden  
10 hacerse reaccionar con otros compuestos para formar "macromonómeros" (mencionados anteriormente) que se incluyen entonces en los polímeros de la presente invención. Por ejemplo, puede hacerse reaccionar HEMA con lactida para formar un polímero de HEMA-poli-(ácido láctico) (HEMA-PLA), que puede usarse a su vez como monómero en los polímeros de la presente invención. Además, los propios monómeros pueden ser combinaciones de unidades monoméricas, que se incorporan entonces en el polímero. Un ejemplo de este tipo de monómero es metacrilato de monometil éter de oligo(etilenglicol) (OEGMA), que es un monómero hidrófilo que se compone de dos  
15 monómeros hidrófilos: etilenglicol y metacrilato.

Los polímeros de la presente invención pueden modificarse adicionalmente con uno o más restos y/o grupos funcionales. Cualquier resto o grupo funcional puede usarse según la presente invención. En algunas realizaciones, pueden modificarse polímeros con polietilenglicol (PEG), con un hidrato de carbono, y/o con poliacetales acíclicos derivados de polisacáridos. Además, tal como se comentó anteriormente, pueden incorporarse grupos hidrófilos en  
20 monómeros (y, por tanto, polímeros) para aumentar la capacidad de unión a agua de un polímero.

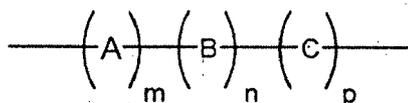
En cuanto a la secuencia, los copolímeros pueden ser copolímeros de bloque, copolímeros de injerto, copolímeros al azar, combinaciones, mezclas y/o aductos de cualquiera de los anteriores polímeros y otros. Normalmente, los polímeros según la presente invención son polímeros orgánicos. Preferiblemente, los polímeros de la presente  
25 invención son biocompatibles. En algunas realizaciones, los polímeros son biodegradables. En otras realizaciones, los polímeros son tanto biocompatibles como biodegradables.

Los polímeros de la presente invención también pueden incluir otros monómeros en su estructura. Por ejemplo, los monómeros pueden ser polímeros tales como poli(alcohol vinílico) (PVA), poliésteres, polímeros acrílicos y polímeros iónicos, o monómeros de estos.

30 Si se desea que el polímero sea biodegradable o absorbible, pueden usarse uno o más monómeros que tienen uniones biodegradables. Como alternativa, o además, los monómeros pueden elegirse de tal manera que el producto de la reacción entre ellos dé como resultado una unión biodegradable. Para cada enfoque, pueden elegirse monómeros y/o iones de tal manera que el polímero biodegradable resultante se degrade o absorba en un periodo de tiempo deseado. Preferiblemente, los monómeros y/o uniones se seleccionan de tal manera que, cuando el  
35 polímero se degrada en condiciones fisiológicas, los productos resultantes no son tóxicos.

La unión biodegradable puede ser hidrolizable o absorbible química o enzimáticamente. Las uniones biodegradables hidrolizables químicamente ilustrativas incluyen polímeros, copolímeros y oligómeros de glicolida, lactida, caprolactona, dioxanona y carbonato de trimetileno. Las uniones biodegradables hidrolizables enzimáticamente  
40 ilustrativas incluyen uniones peptídicas escindibles por metaloproteinasas y colagenasas. Uniones biodegradables ilustrativas adicionales incluyen polímeros y copolímeros de poli(hidroxiácidos), poli(ortocarbonatos), poli(anhídridos), poli(lactonas), poli(aminoácidos), poli(carbonatos) y poli(fosfonatos).

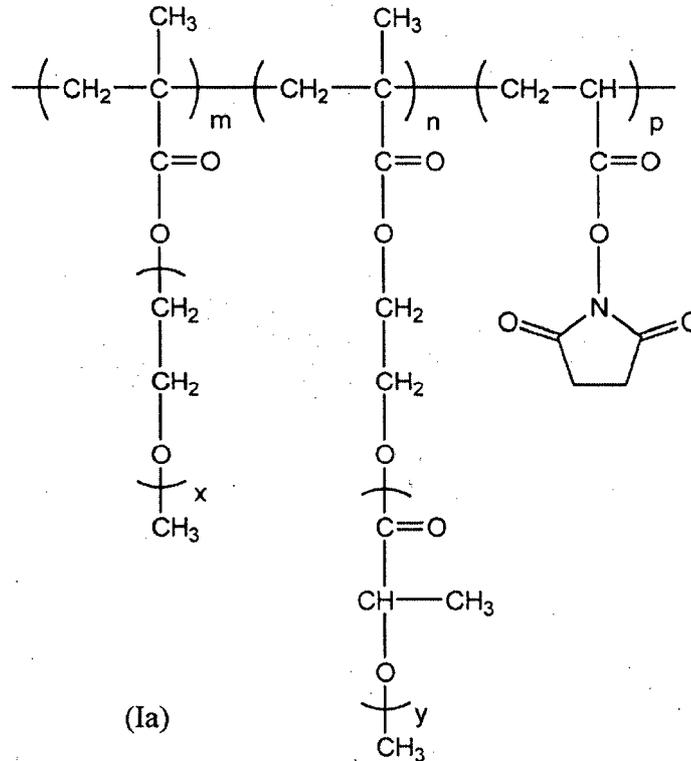
En una realización, el polímero de la presente invención es un polímero de fórmula (I):



(I)

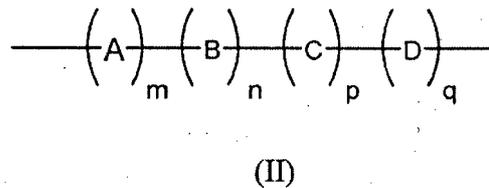
45 en la que A es un monómero con capacidad de unión a agua, B es un monómero que puede conferir propiedades mecánicas a un hidrogel, C es un monómero que tiene un grupo funcional para la unión a una PMEC, m es un número entero desde 1 hasta 10, n es un número entero desde 1 hasta 10, y p es un número entero desde 1 hasta 10.

Por consiguiente, el polímero de la presente invención puede ser un polímero de fórmula (Ia):

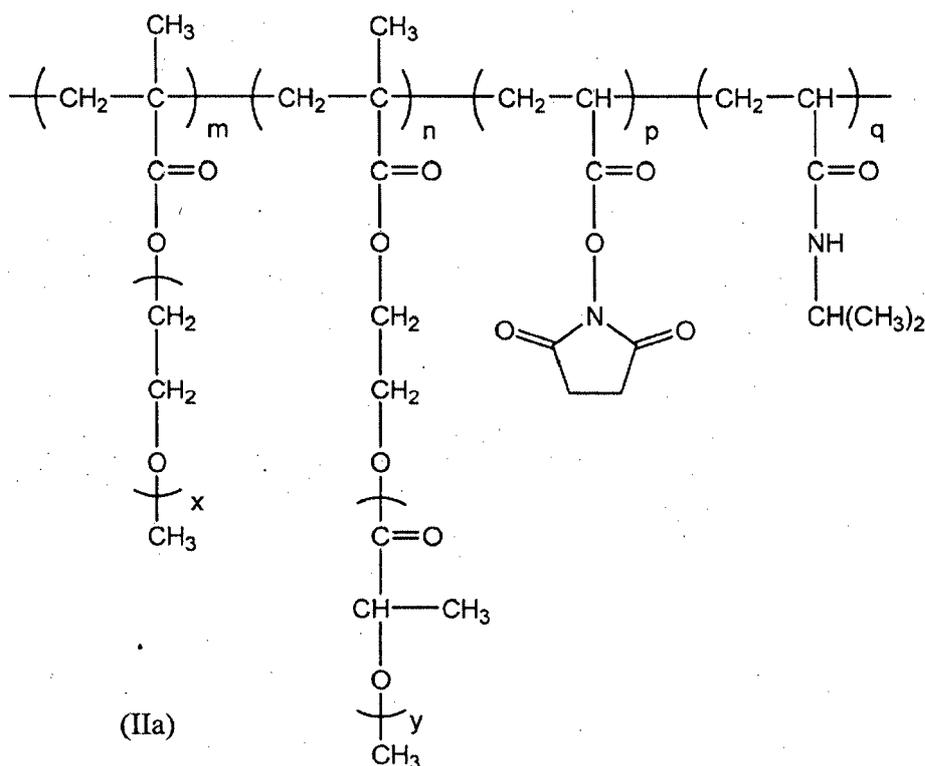


5 en la que A es el monómero con capacidad de unión a agua OEGMA, B es el monómero que confiere resistencia mecánica HEMA-PLA, C es el agente de reticulación NAS, m, n y p son tal como se definieron anteriormente, x es un número entero desde 1 hasta 1000, e y es un número entero desde 1 hasta 1000.

Cuando el polímero de la presente invención incluye un cuarto monómero que puede conferir características de transición de fase al hidrogel, el polímero puede ser un polímero de fórmula (II):



10 en la que A, B, C, m, n, y p son tal como se definieron anteriormente, D es un monómero que puede conferir características de transición de fase al hidrogel, y q es un número entero desde 1 hasta 10. Un ejemplo de un polímero de este tipo es un polímero de fórmula (IIa):



en la que A es el monómero con capacidad de unión a agua OEGMA, B es el monómero que confiere resistencia mecánica HEMA-PLA, C es el agente de reticulación NAS, D es el monómero con transición de fase NIPAAm, y m, n, p, q, x e y son tal como se definieron anteriormente.

- 5 Los presentes inventores también han encontrado que algunos monómeros, tales como HEMA-PLA, poliésteres tales como poli(ácido láctico), poli(caprolactona), poli(glicolida) y sus copolímeros al azar (por ejemplo, poli(glicolida-co-lactida) y poli(glicolida-co-caprolactona) y otros polímeros biodegradables y biocompatibles, pueden elevar la LCST del polímero durante la degradación de segmentos biodegradables (por ejemplo, PLA) *in vivo*, lo que conduce a la biorresorción del polímero. Esto proporciona la ventaja adicional de que los polímeros de la presente invención pueden diseñarse de modo que sean biodegradables *in vivo*.
- 10

Un experto en la técnica conocerá que los monómeros A, B, C y D pueden estar presentes en el polímero en cualquier orden, siempre que se logren las capacidades requeridas de unión a agua, conferir resistencia mecánica y/o reticulación.

- 15 El tamaño global del polímero de la presente invención puede diferir, dependiendo de factores tales como los tipos de monómeros que se incorporan en el polímero, el tipo de PMEC que se pretende usar para formar el hidrogel, y las condiciones en las que va a acoplarse la proteína al polímero. Sin embargo, en general, el polímero de la presente invención puede ser una molécula de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 kDa, de aproximadamente 5 a aproximadamente 60 kDa, o de aproximadamente 30 kDa.

- 20 Tal como se usa en el presente documento, una redacción que define los límites de un intervalo o una longitud tal como, por ejemplo, "desde 1 hasta 5" significa cualquier número entero desde 1 hasta 5, es decir 1, 2, 3, 4 y 5. Dicho de otro modo, cualquier intervalo definido por dos números enteros mencionados explícitamente pretende comprender y dar a conocer cualquier número entero que definan dichos límites y cualquier número entero comprendido en dicho intervalo.

- 25 Un experto en la técnica conocerá métodos adecuados de síntesis de los polímeros de la presente invención. Estos incluyen métodos tales como polimerización por apertura de anillo, polimerización por adición (incluyendo polimerización por radicales libres) y polimerización por condensación.

#### B. Composiciones para la formación de hidrogeles

La presente invención también se refiere a una composición para la formación de un hidrogel, incluyendo la composición una proteína de la matriz extracelular y un polímero según la invención.

La unión de la proteína de la matriz extracelular al tercer monómero reticula el polímero, permitiendo de ese modo la formación de un hidrogel cuando la composición se pone en contacto con agua.

5 El término "composición", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una composición sólida o líquida que contiene los componentes mencionados anteriormente. En algunas realizaciones, también pueden incluirse en las composiciones de la presente invención otros componentes tales como excipientes farmacéuticamente aceptables y agentes biológicamente activos (por ejemplo, fármacos, vitaminas y minerales), para ayudar a la reparación y/o regeneración del tejido diana, y/o para proporcionar un método para lograr la administración dirigida de compuestos biológicamente activos.

10 En general, la cantidad de polímero en la composición de la presente invención es una cantidad que permite la formación de hidrogeles según la presente invención. En algunas realizaciones, la cantidad de polímero en la composición de la presente invención oscila entre aproximadamente el 1% p/p y aproximadamente el 90% p/p, entre aproximadamente el 2% p/p y aproximadamente el 80% p/p, entre aproximadamente el 4% p/p y aproximadamente el 70% p/p, entre aproximadamente el 5% p/p y aproximadamente el 60% p/p, entre aproximadamente el 5% p/p y aproximadamente el 50% p/p, entre aproximadamente el 6% p/p y aproximadamente el 40% p/p, entre aproximadamente el 7% p/p y aproximadamente el 30% p/p o entre aproximadamente el 8% p/p y aproximadamente el 20% p/p. En algunas realizaciones, la cantidad de polímero es de aproximadamente el 1% p/p, aproximadamente el 2% p/p, aproximadamente el 3% p/p, aproximadamente el 4% p/p, aproximadamente el 5% p/p, aproximadamente el 6% p/p, aproximadamente el 7% p/p, aproximadamente el 8% p/p, aproximadamente el 9% p/p, aproximadamente el 10% p/p, aproximadamente el 15% p/p, aproximadamente el 20% p/p, aproximadamente el 25% p/p, aproximadamente el 30% p/p, aproximadamente el 35% p/p, aproximadamente el 40% p/p, aproximadamente el 45% p/p, aproximadamente el 50% p/p, aproximadamente el 55% p/p, aproximadamente el 60% p/p, aproximadamente el 65% p/p, aproximadamente el 70% p/p, aproximadamente el 75% p/p, aproximadamente el 80% p/p o más. En algunas realizaciones, la cantidad de polímero es de aproximadamente el 85% p/p. Como regla general, la solidez del hidrogel aumenta con mayores concentraciones de polímero en la composición.

## 25 B1. Excipientes y agentes biológicamente activos

Pueden incluirse excipientes farmacéuticamente aceptables en las composiciones y/o los hidrogeles de la presente invención, e incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, diluyentes inertes, u otros vehículos líquidos, adyuvantes de dispersión o suspensión, agentes de granulación, agentes tensioactivos, agentes disgregantes, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, agentes aglutinantes, lubricantes, agentes tamponantes, aceites, y similares, según sea adecuado para la forma de dosificación particular deseada. Remington<sup>5</sup> da a conocer diversos excipientes usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de las mismas. Excepto en la medida en que cualquier excipiente convencional sea incompatible con una sustancia o sus derivados, tales como produciendo cualquier efecto biológico no deseado o interactuando de otro modo de manera perjudicial con cualquier otro componente de la composición farmacéutica, se contempla que su uso esté dentro del alcance de esta invención.

Excipientes tales como agentes colorantes, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes pueden estar presentes en la composición, según el criterio del formulador.

40 Los agentes biológicamente activos o compuestos farmacológicos que pueden añadirse a la composición y/o el hidrogel de la presente invención incluyen proteínas, glicosaminoglicanos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos y compuestos biológicamente activos inorgánicos y orgánicos, tales como enzimas, antibióticos, agentes antineoplásicos, anestésicos locales, hormonas, agentes angiogénicos, agentes antiangiogénicos, factores de crecimiento (por ejemplo, factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-I), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF $\beta$ )), anticuerpos, neurotransmisores, fármacos psicoactivos, fármacos contra el cáncer, fármacos quimioterápicos, fármacos que afectan a los órganos reproductores, genes y oligonucleótidos.

Una composición que contiene componentes tales como excipientes y/o agentes biológicamente activos puede producirse combinando un polímero de la presente invención con una PMEC, secando la composición resultante, y luego combinando esta con uno o más de otros componentes. La composición resultante puede estar en forma de un polvo y otra forma particulada, a la que se añade entonces agua para formar un hidrogel, según la presente invención. Por tanto, puede producirse un hidrogel que contiene estos componentes simplemente añadiendo el disolvente acuoso deseado a la composición.

La cantidad de polímero, PMEC y agente biológicamente activo presentes en la composición dependerá necesariamente del fármaco particular y el estado que va a tratarse. Un experto en la técnica conocerá cantidades y agentes apropiados para su uso para tratar el estado.

## 55 B2. PMEC

Tal como se usa en el presente documento, el término "proteína de la matriz extracelular" (o P MEC) se refiere a proteínas que están presentes de manera natural en la parte extracelular de tejido animal que proporciona soporte estructural a las células animales (además de realizar otras diversas funciones importantes). La matriz extracelular (o MEC) es la característica definitoria del tejido conjuntivo en animales. Las proteínas que se encuentran habitualmente en la MEC incluyen colágeno, elastina, fibrina, fibronectina y laminina (e isoformas de los mismos).

En el contexto de la presente invención, P MEC es importante porque, tal como se comentó anteriormente, reticula polímeros, lo que permite que los polímeros formen un hidrogel. Los hidrogeles de la presente invención pueden formarse, por ejemplo, exponiendo colágeno o elastina a un polímero de fórmula (I). P MEC es también importante porque proporciona propiedades mecánicas adicionales (tal como resistencia mecánica y resiliencia) al hidrogel, así como proporciona, en el sitio de reparación, un entorno que imita al entorno natural, ayudando de ese modo en la reparación y regeneración de tejido.

En una realización, la P MEC puede estar en forma de un monómero. Un ejemplo es tropoelastina. En otra realización, la P MEC puede estar en forma de monómeros reticulados. Un ejemplo es elastina. Aún en realizaciones adicionales, la P MEC puede ser una combinación de una gama de diferentes isoformas, por ejemplo, colágeno tipo 1, 2, 3, 4, o una gama de diferentes proteínas, por ejemplo, colágeno y elastina, etc.

Es importante que la P MEC contenga cadenas laterales u otros grupos funcionales que quedan expuestos para permitir la reacción con el grupo funcional del/de los monómero(s) con capacidad de unión a P MEC, uniéndose de ese modo la P MEC al polímero a través del/de los monómero(s) de con capacidad de unión a P MEC. Los ejemplos de cadenas laterales adecuadas incluyen cadenas laterales de ácido glutámico o lisilo.

La presente invención también incluye variantes de las P MEC, por ejemplo variantes de especie o variantes polimórficas. La presente invención pretende cubrir todas las variantes funcionalmente activas de las P MEC que presentan la misma actividad. Esto también incluye apo- y holo-formas de las P MEC, formas modificadas de manera postraduccional, así como derivados glicosilados o desglicosilados. Tales fragmentos y variantes funcionalmente activos incluyen, por ejemplo, los que tienen sustituciones de aminoácidos conservativas.

En general, la cantidad de P MEC en la composición de la presente invención es una cantidad que permite la formación de hidrogeles según la presente invención. En algunas realizaciones, la cantidad de P MEC en la composición de la presente invención oscila entre aproximadamente el 1% p/p y aproximadamente el 60% p/p, entre aproximadamente el 1% p/p y aproximadamente el 50% p/p, entre aproximadamente el 1% p/p y aproximadamente el 40% p/p, entre aproximadamente el 5% p/p y aproximadamente el 30% p/p, entre aproximadamente el 5% p/p y aproximadamente el 20% p/p, o entre aproximadamente el 5% p/p y aproximadamente el 10% p/p. En algunas realizaciones, el porcentaje de P MEC es de aproximadamente el 1% p/p, aproximadamente el 2% p/p, aproximadamente el 3% p/p, aproximadamente el 4% p/p, aproximadamente el 5% p/p, aproximadamente el 6% p/p, aproximadamente el 7% p/p, aproximadamente el 8% p/p, aproximadamente el 9% p/p, aproximadamente el 10% p/p, aproximadamente el 20% p/p, aproximadamente el 30% p/p, aproximadamente el 40% p/p, aproximadamente el 50% p/p, o más.

Preferiblemente, las P MEC para su uso en la presente invención se obtendrán de fuentes recombinantes, aunque también pueden extraerse de fuentes naturales o sintetizarse.

### C. Hidrogeles

La presente invención también se refiere a un hidrogel que incluye agua, una proteína de la matriz extracelular y un polímero según la invención.

La unión de la proteína de la matriz extracelular al tercer monómero reticula el polímero, formando de ese modo un hidrogel, con agua contenida en el mismo.

En una realización, el hidrogel incluye un polímero que tiene un monómero descrito anteriormente para permitir la transición de fase del hidrogel desde el estado líquido a menor temperatura al estado de gel a la temperatura corporal. Un ejemplo de un monómero útil para este fin es NIPAAM. Es un hallazgo particularmente sorprendente que pueda hacerse que una molécula por lo demás insoluble, tal como elastina o colágeno, presente una transición del estado líquido al de gel según el perfil de temperatura mediante el uso de este monómero. Por tanto, la ventaja es que el hidrogel de la presente invención, a temperaturas más frías, puede administrarse fácilmente, por ejemplo, mediante inyección. El hidrogel se transforma entonces en un gel más viscoso, que tiene las propiedades deseadas de resistencia mecánica y elasticidad, tras su calentamiento en el organismo hasta la temperatura corporal natural.

Habiendo proporcionado una composición de polímero descrita anteriormente, puede formarse el hidrogel añadiendo agua a la composición de cualquier modo conocido por un experto en la técnica. En efecto, una ventaja de la presente invención es que no es necesario que se reticule el polímero en modo alguno antes del contacto con la

PMEC, con el fin de que se forme un hidrogel.

#### C1. Células

El hidrogel de la presente invención también puede incluir células para ayudar a la reparación y/o regeneración del tejido diana.

- 5 En general, las células que van a usarse según la presente invención son cualquier tipo de células. Las células deben ser viables cuando se encapsulan dentro de los hidrogeles de la presente invención. En algunas realizaciones, las células que pueden encapsularse dentro de hidrogeles según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células de mamíferos (por ejemplo, células humanas, células de primate, células de mamíferos, células de roedores, etc.), células de aves, células de peces, células de insectos, células vegetales, células fúngicas, células bacterianas y células híbridas. En algunas realizaciones, las células a modo de ejemplo que pueden encapsularse dentro de hidrogeles incluyen células madre, células totipotentes, células pluripotentes y/o células madre embrionarias. En algunas realizaciones, las células a modo de ejemplo que pueden encapsularse dentro de hidrogeles según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células y/o líneas celulares primarias de cualquier tejido. Por ejemplo, pueden encapsularse dentro de hidrogeles según la presente invención cardiomiocitos, miocitos, hepatocitos, queratinocitos, melanocitos, neuronas, astrocitos, células madre embrionarias, células madre adultas, células madre hematopoyéticas, células hematopoyéticas (por ejemplo, monocitos, neutrófilos, macrófagos, etc.), ameloblastos, fibroblastos, condrocitos, osteoblastos, osteoclastos, neuronas, espermatozoides, óvulos, células hepáticas, células epiteliales de pulmón, células epiteliales de intestino, hígado, células epiteliales de la piel, etc., y/o híbridos de las mismas.
- 10
- 15
- 20 Las células de mamíferos a modo de ejemplo que pueden encapsularse dentro de hidrogeles según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón canino de Madin-Darby (MDCK), células de riñón de hámster recién nacido (BHK), células NS0, células MCF-7, células MDA-MB-438, células U87, células A172, células HL60, células A549, células SP10, células DOX, células DG44, células HEK 293, SHSY5Y, células de Jurkat, células BCP-1, células COS, células Vero, células GH3, células 9L, células 3T3, células MC3T3, células C3H-10T1/2, células NIH-3T3 y células C6/36.
- 25

En algunas realizaciones, se desea que las células se distribuyan uniformemente por la totalidad de un hidrogel. La distribución uniforme puede ayudar a proporcionar hidrogeles similares a tejidos más uniformes que proporcionan un entorno más uniforme para las células encapsuladas. En algunas realizaciones, las células están ubicadas en la superficie de un hidrogel. En algunas realizaciones, las células están ubicadas en el interior de un hidrogel. En algunas realizaciones, se estratifican las células dentro de un hidrogel. En algunas realizaciones, el hidrogel contiene diferentes tipos de células.

30

En algunas realizaciones, se alteran las condiciones en las que se encapsulan células dentro de hidrogeles con el fin de maximizar la viabilidad celular. En algunas realizaciones, por ejemplo, la viabilidad celular aumenta con menores concentraciones de polímero. En algunas realizaciones, las células ubicadas en la periferia de un hidrogel tienden a tener una viabilidad disminuida con relación a células que están totalmente encapsuladas dentro del hidrogel. En algunas realizaciones, puede ser necesario tener que regular y/o alterar las condiciones (por ejemplo, pH, fuerza iónica, disponibilidad de nutrientes, temperatura, disponibilidad de oxígeno, osmolaridad, etc.) del entorno circundante para maximizar la viabilidad celular.

35

En algunas realizaciones, puede medirse la viabilidad celular monitorizando uno de muchos indicadores de viabilidad celular. En algunas realizaciones, los indicadores de viabilidad celular incluyen, pero no se limitan a, actividad esterasa intracelular, integridad de la membrana plasmática, actividad metabólica, expresión génica y expresión de proteínas. Por mencionar solo un ejemplo, cuando se exponen células a un sustrato de esterasa fluorogénico (por ejemplo, calceína AM), las células vivas producen fluorescencia de color verde como resultado de actividad esterasa intracelular que hidroliza el sustrato de esterasa para dar un producto fluorescente de color verde. Por mencionar otro ejemplo, cuando se exponen células a una tinción de ácido nucleico fluorescente ácido (por ejemplo, homodímero-1 de etidio), las células muertas producen fluorescencia de color rojo porque sus membranas plasmáticas están comprometidas y, por tanto, son permeables a la tinción de ácido nucleico de alta afinidad.

40

45

En general, la cantidad de células en una composición es una cantidad que permita la formación de hidrogeles según la presente invención. En algunas realizaciones, la cantidad de células que es adecuada para la formación de hidrogeles según la presente invención oscila entre aproximadamente el 0,1% p/p y aproximadamente el 80% p/p, entre aproximadamente el 1,0% p/p y aproximadamente el 50% p/p, entre aproximadamente el 1,0% p/p y aproximadamente el 40% p/p, entre aproximadamente el 1,0% p/p y aproximadamente el 30% p/p, entre aproximadamente el 1,0% p/p y aproximadamente el 20% p/p, entre aproximadamente el 1,0% p/p y aproximadamente el 10% p/p, entre aproximadamente el 5,0% p/p y aproximadamente el 20% p/p, o entre aproximadamente el 5,0% p/p y aproximadamente el 10% p/p. En algunas realizaciones, la cantidad de células en una composición que es adecuada para la formación de hidrogeles según la presente invención es de aproximadamente el 5% p/p. En algunas realizaciones, la concentración de células en una disolución precursora que

50

55

es adecuada para la formación de hidrogeles según la invención oscila entre aproximadamente 10 y aproximadamente  $1 \times 10^8$  células/ml, entre aproximadamente 100 y aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $1 \times 10^3$  y aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ml, o entre aproximadamente  $1 \times 10^4$  y aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/ml. En algunas realizaciones, un único hidrogel comprende una población de células y/o tipos de célula idénticos. En algunas realizaciones, un único hidrogel comprende una población de células y/o tipos de célula que no son idénticos. En algunas realizaciones, un único hidrogel puede comprender al menos dos tipos de células diferentes. En algunas realizaciones, un único hidrogel puede comprender 3, 4, 5, 10 o más tipos de células. Por mencionar solo un ejemplo, en algunas realizaciones, un único hidrogel puede comprender solo células madre embrionarias. En algunas realizaciones, un único hidrogel puede comprender tanto células madre embrionarias como células madre hematopoyéticas.

## C2. Medios

Puede usarse cualquiera de una variedad de medios de cultivo celular, incluyendo medios complejos y/o medios de cultivo libres de suero, que pueden soportar el crecimiento del uno o más tipos de célula o líneas celulares para hacer crecer y/o mantener las células. Normalmente, un medio de cultivo celular contiene un tampón, sales, fuente de energía, aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, etc.), vitaminas, y/u oligoelementos. Los medios de cultivo celular pueden contener opcionalmente una variedad de otros componentes, incluyendo pero sin limitarse a, fuentes de carbono (por ejemplo, azúcares naturales, azúcares no naturales, etc.), cofactores, lípidos, azúcares, nucleósidos, componentes de origen animal, hidrolizados, hormonas, factores de crecimiento, surfactantes, indicadores, minerales, activadores de enzimas específicas, activadores inhibidores de enzimas específicas, enzimas, productos orgánicos, y/o metabolitos de molécula pequeña. Los medios de cultivo celular adecuados para su uso según la presente invención están disponibles comercialmente de una variedad de fuentes, por ejemplo, ATCC (Manassas, Va.). En determinadas realizaciones, se usan uno o más de los siguientes medios para hacer crecer células: medio RPMI-1640, medio de Eagle modificado por Dulbecco, medio esencial mínimo Eagle, medio F-12K, medio de Eagle modificado por Iscove.

Los expertos en la técnica reconocerán que las células enumeradas en el presente documento representan una lista a modo de ejemplo, no exhaustiva, de células que pueden encapsularse dentro de una disolución precursora (y, por tanto, eventualmente en un hidrogel) según la presente invención.

## D. Tratamiento del cartílago articular

Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de un hidrogel de la presente invención a un paciente y/u organismo antes de, simultáneamente a y/o después del diagnóstico de una enfermedad, un trastorno y/o estado. En algunos casos, administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de un hidrogel de la presente invención a un paciente y/u organismo antes de, simultáneamente a y/o después de la aparición de los síntomas de una enfermedad, un trastorno y/o estado.

Por consiguiente, se describe en el presente documento un método de reparación de tejido biológico, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un hidrogel de la presente invención.

También se describe en el presente documento el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la presente invención o un hidrogel de la presente invención para reparar tejido biológico.

También se describe en el presente documento una composición de la presente invención o un hidrogel de la presente invención para su uso en la reparación de tejido biológico, en cualquiera de los casos descritos en la memoria descriptiva.

También se describe en el presente documento el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un hidrogel de la presente invención o una composición de la presente invención para la fabricación de un medicamento para reparar tejido biológico.

También se describe en el presente documento una composición de la presente invención o un hidrogel de la presente invención cuando usado en un método de reparación de tejido biológico.

También se describe en el presente documento una composición que tiene un principio activo para su uso en la reparación de tejido biológico, en el que el principio activo es un hidrogel de la presente invención.

También se describe en el presente documento el uso de una composición de la presente invención o un hidrogel de la presente invención en la reparación de tejido biológico, tal como se describió anteriormente.

En un caso, el tejido biológico es cartílago. El cartílago puede ser cartílago articular.

- El término “cantidad terapéuticamente eficaz”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad del hidrogel de la presente invención que es suficiente para tratar, aliviar, mejorar, mitigar, retardar la aparición de, inhibir la progresión de, reducir la gravedad de, y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de la enfermedad, el trastorno y/o estado. En particular, una “cantidad terapéuticamente eficaz” es una cantidad suficiente para reparar tejido biológico, tal como cartílago (y, en particular, cartílago articular). El término “reparación” se refiere a la sustitución o restauración de tejido biológico dañado, por ejemplo de tal manera que se restaure la funcionalidad original del tejido dañado. Un experto en la técnica entenderá que la restauración puede ser completa, de tal manera que se ha restaurado el 100% de la funcionalidad original, o puede ser parcial, de tal manera que solo ha restaurado una parte de la funcionalidad original.
- Los hidrogeles de la presente invención pueden administrarse usando cualquier cantidad y cualquier vía de administración eficaces para el tratamiento. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la infección, el hidrogel particular, su modo de administración, su modo de actividad, y similares.
- Normalmente se formulan las composiciones y los hidrogeles de la presente invención en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de los hidrogeles y/o conjuntos de hidrogel de la presente invención lo decidirá el médico encargado dentro del alcance del criterio médico sólido.
- El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier sujeto u organismo particular dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno que esté tratándose y la gravedad del trastorno; la actividad del principio activo específico empleado; el polímero y/o las células específicos empleados; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el momento de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del principio activo específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o de manera coincidente con el principio activo específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.
- Los hidrogeles de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía. En algunos casos, los hidrogeles de la presente invención pueden administrarse por una variedad de vías, incluyendo administración directa a un sitio afectado. Por ejemplo, los hidrogeles pueden administrarse localmente cerca de un sitio que necesita regeneración del tejido. La administración local puede lograrse mediante inyección del hidrogel enfriado directamente en un sitio que necesita nuevo crecimiento y/o reparación de tejido.
- En determinados casos, los hidrogeles de la presente invención pueden administrarse de tal manera que se liberen células y/o agentes terapéuticos encapsulados que van a administrarse a concentraciones que oscilan entre aproximadamente 0,001 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg, entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg, entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 40 mg/kg, entre aproximadamente 0,5 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg, entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg o entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 25 mg/kg, de peso corporal del sujeto al día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado. La dosificación deseada puede administrarse, por ejemplo, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, cada dos días, cada tres días, cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas o cada cuatro semanas. En determinadas realizaciones, la dosificación deseada puede administrarse usando administraciones múltiples (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce administraciones o más).
- En algunos casos, la presente divulgación engloba “cócteles terapéuticos” que comprenden los hidrogeles de la presente invención. En algunos casos, los hidrogeles comprenden un único tipo de célula y, opcionalmente, un agente terapéutico. En algunos casos, los hidrogeles comprenden múltiples tipos de célula diferentes y, opcionalmente, un agente terapéutico.
- Se apreciará que los hidrogeles cargados con células según la presente invención pueden emplearse en terapias de combinación. La combinación particular de terapias (tratamientos o procedimientos) a emplear en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los tratamientos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico deseado que debe lograrse. Se apreciará que las terapias empleadas pueden lograr un efecto deseado para el mismo fin (por ejemplo, un hidrogel que comprende un determinado tipo de célula que va a usarse para fomentar el crecimiento de tejido puede administrarse de manera concurrente con otro agente terapéutico usado para estimular el crecimiento del mismo tejido), o pueden lograr efectos diferentes (por ejemplo, control de cualquier efecto adverso, tal como inflamación, infección, etc.).
- E. Kits
- También se describen en el presente documento una variedad de kits que comprenden uno o más de los hidrogeles

5 y/o las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, se describe un kit que comprende un hidrogel y/o una composición e instrucciones de uso. Un kit puede comprender múltiples hidrogeles y/o composiciones diferentes. Un kit puede comprender opcionalmente polímeros, células, P MEC, compuestos biológicamente activos, y similares. Un kit puede comprender cualquiera de varios componentes o reactivos adicionales en cualquier combinación. Todas las diversas combinaciones no se exponen explícitamente pero cada combinación está incluida en el alcance de la divulgación. Se describen unos cuantos kits a modo de ejemplo en los siguientes párrafos.

En determinados casos, un kit puede incluir, por ejemplo, (i) una disolución que comprende un polímero, una disolución que comprende P MEC; y (ii) instrucciones para la formación de un hidrogel a partir de la disolución.

10 En otro caso, un kit puede incluir, por ejemplo, (i) una composición que comprende un polímero y P MEC; y (ii) instrucciones para la formación de un hidrogel a partir de la composición.

Los kits pueden incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

15 Los kits incluyen normalmente instrucciones de uso de los hidrogeles de la presente invención. Las instrucciones pueden comprender, por ejemplo, protocolos y/o describir condiciones para la producción de hidrogeles, administración de hidrogeles a un sujeto que lo necesita, producción de conjuntos de hidrogel, etc. Los kits incluirán generalmente uno o más recipientes o envases de modo que algunos o todos los reactivos y componentes individuales pueden alojarse por separado. Los kits también pueden incluir medios para encerrar envases individuales en confinamiento relativamente próximo para la venta comercial, por ejemplo, una caja de plástico, en la que pueden adjuntarse instrucciones, materiales de acondicionamiento tales como espuma de poliestireno, etc.

20 El kit o "artículo de fabricación" puede comprender un envase y una etiqueta o un prospecto en o asociado con el envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, envases de tipo blíster, etc. Los envases pueden estar formados a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene el hidrogel o la composición que es eficaz para tratar el estado y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta o el prospecto indican que el hidrogel o la composición se usan para tratar el estado elegido. En una realización, la etiqueta o el prospecto incluyen instrucciones de uso e indican que la composición terapéutica puede usarse para reparar o regenerar tejido.

30 La presente invención se describirá ahora en mayor detalle con referencia a los ejemplos y dibujos adjuntos. Sin embargo, debe entenderse que la siguiente descripción es meramente ilustrativa y no debe tomarse en modo alguno como restricción de la generalidad de la invención descrita anteriormente.

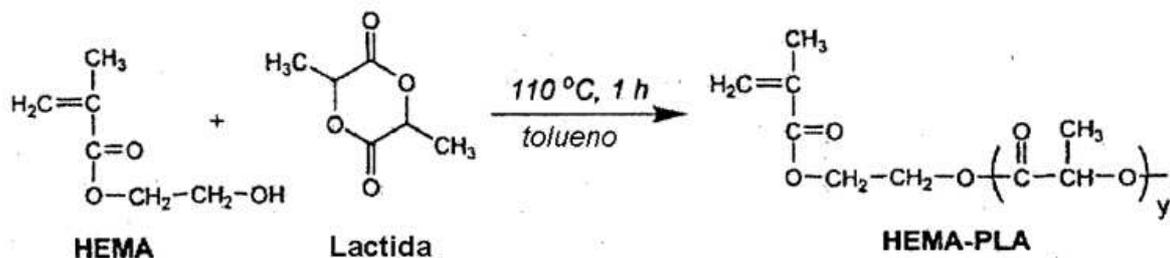
## Ejemplos

### Materiales

35 Se adquirieron los productos químicos de Sigma-Aldrich a menos que se indique de otro modo. Se usaron 2-etilhexanoato estannoso ( $\text{Sn}(\text{OCt})_2$ ), *N*-isopropilacrilamida (NIPAAm), metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), 4,4'-azobis(ácido 4-cianoalérico) (ACVA) y *N*-acriloxisuccinimida (NAS) tal como se recibieron. Se purificó el metacrilato de monometil éter de oligo(etilenglicol) (OEGMA,  $M_n = 475$ ) haciendo pasar su disolución en diclorometano (con una razón volumétrica 1:1) a través de una columna de alúmina neutra para retirar el inhibidor antes de su uso. Se secó el monómero de D,L-lactida (LA) a vacío a 40°C durante 24 h antes de su uso. El azobisisobutironitrilo (AIBN) lo obsequió amablemente la Escuela de Química de la Universidad de Sídney.

40 Síntesis de macromonómero de HEMA-poli(lactida) (HEMA-PLA)

Se sintetizó el macromonómero de HEMA-PLA mediante polimerización por apertura de anillo de LA con el grupo hidroxilo de HEMA como iniciador y  $\text{Sn}(\text{OCt})_2$  como catalizador (Esquema 1).<sup>6</sup>



Esquema 1. Síntesis de macromonómero de HEMA-PLA

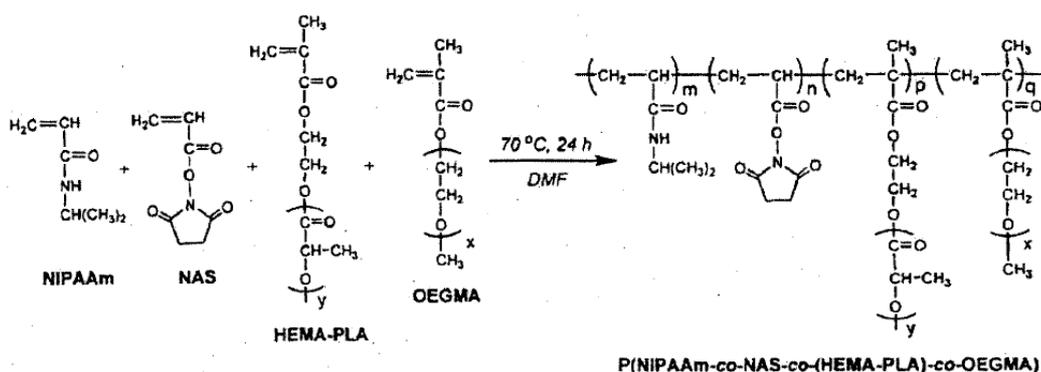
Se mezclaron LA y HEMA en un matraz de tres bocas a 110°C bajo una atmósfera de nitrógeno durante 15 min. Posteriormente, se añadió una mezcla del 1% molar de Sn(Oct)<sub>2</sub> (con respecto a la alimentación de HEMA) en 1 ml de tolueno anhidro, a la disolución de LA/HEMA. Se agitó la mezcla resultante a 300 rpm y 110°C durante 1 h bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de la reacción, se disolvió la mezcla en tetrahidrofurano y se precipitó en agua destilada fría a 1°C. Se separó el precipitado formado, mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 min. Se repitió el ciclo de centrifugación tres veces para retirar toda la cantidad de monómeros sin reaccionar y subproductos (principalmente sales). Entonces se disolvió el precipitado en acetato de etilo. Se retiraron las partículas sólidas en suspensión de la disolución con centrifugación a 6000 rpm durante 5 min y se secó el sobrenadante con MgSO<sub>4</sub> durante 12 h. Se filtró el sobrenadante secado para retirar las partículas de MgSO<sub>4</sub>. Entonces se secó la disolución polimérica a 60°C a presión reducida y se eliminó además el residuo de disolvente a vacío, a 40°C durante 24 h. Se guardó el aceite viscoso resultante en un congelador para su uso posterior.

Se varió la razón de alimentación de HEMA:LA entre 1:1,5 y 1:2,5 para obtener macrómero de PLA/HEMA con diferentes longitudes de lactato. Se sintetizaron dos macromonómeros de PLA/HEMA con longitudes de lactato de 3 y 6 usando una razón molar de 1:1,5 y 1:2,5 de monómeros de HEMA con respecto a LA, respectivamente.

Se confirmó la síntesis de macrómero de PLA/HEMA, usando espectros de <sup>1</sup>H-RMN con evidencias de picos de protón tanto de HEMA como de LA. Se calculó la razón molar de LA con respecto a macrómero de PLA/HEMA en HEMA a partir de los espectros de <sup>1</sup>H-RMN usando los picos a 5,2 ppm para metino en lactato, y las integraciones totales de los picos a 5,7 ppm y 6,0 ppm para HEMA.

#### Síntesis de poli(NIPAAm-co-NAS-co-(HEMA-PLA)-co-OEGMA) (PNPHO)

Se sintetizó PNPFO usando el método o bien (1) o bien (2) tal como se describe a continuación (Esquema 2).



Esquema 2. Síntesis de PNPFO

#### 25 Método 1

Se sintetizó PNPFO mediante polimerización por radicales libres usando AIBN como iniciador. Se cargó un matraz Schlenk con una barrita de agitación magnética y un septo de caucho con NIPAAm (12 mmol), NAS (1,0 mmol), HEMA-PLA (0,57 mmol), OEGMA (0,56 mmol), AIBN (0,07 mmol) y *N,N*-dimetilformamida (DMF) anhidra. Se desoxigenó el matraz mediante tres ciclos de congelación-bombeo-descongelación, y luego se selló seguido por inmersión del matraz en un baño de aceite precalentado a 70°C para iniciar la polimerización. Después de reacción durante 24 h, se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente, se precipitó en dietil éter, se filtró y luego

se secó a vacío. Se purificó el polímero dos veces mediante redisolución/nueva precipitación con THF/etil éter y finalmente se secó a vacío durante 2 días.

#### Método 2

Se sintetizó PNPFO mediante polimerización por radicales libres, usando ACVA como iniciador. Se cambió la composición de copolímeros variando la longitud de lactato (3 y 6 en HEMA-PLA), las razones molares de HEMA-PLA (el 6, el 8 y el 11% molar) y OEGMA (el 3, el 5 y el 8% molar). Se disolvieron cantidades conocidas de NIPAAm, NAS, HEMA-PLA, OEGMA, ACVA (7,0 x 10<sup>-5</sup> mol) en 13 ml de *N,N*-dimetilformamida anhidra en un matraz de fondo redondo, de una sola boca. Entonces se desoxigenó el sistema mediante al menos tres ciclos de congelación-bombeo-descongelación, usando nitrógeno líquido como refrigerante. Los resultados también mostraron que es factible desoxigenar la disolución de monómero purgando con gas nitrógeno durante 10 min en la disolución a vacío. Esta técnica proporciona un método más eficaz para eliminar el oxígeno de la disolución a gran escala. Entonces se sella el reactor y se sumerge en un baño de aceite a 70°C durante 24 h. Luego se enfrió la disolución polimérica resultante a temperatura ambiente durante 1 h y se precipitó en 250 ml de dietil éter. Entonces se recogió el precipitado mediante filtración de la suspensión y se secó a vacío durante 6 h. Se disolvió el polvo secado en tetrahidrofurano y se precipitó en dietil éter para retirar adicionalmente residuos de macrómeros. Se secó el polvo final a vacío durante al menos 48 h.

#### Composiciones de PNPFO

Se confirmó la síntesis de copolímeros de PNPFO con espectros de <sup>1</sup>H-RMN con evidencias de picos de protón para cada monómero, tal como se muestra en la figura 2. Se detectaron picos de protón característicos para NIPAAm (a y b), NAS (e), HEMAPLA (f, h, k) y OEGMA (m y n). Se calculó la composición final de copolímero basándose en la integración de estos picos de cada monómero como para NIPAAm (a), NAS(e/2-f), HEMA-PLA (h) y OEGMA (n/2). Se midieron los pesos moleculares de los copolímeros usando cromatografía de permeación en gel. Para cada composición, se llevaron a cabo al menos tres síntesis y se analizó estadísticamente la varianza entre razones de alimentación y la composición final de copolímeros, usando análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Se encontró que las composiciones de copolímeros concordaban ( $p > 0,05$ ) con las razones de alimentación, tal como se notifica en la tabla 1. En este estudio, se indica el copolímero como PNPFO y se añade el subíndice que corresponde a las razones molares de HEMA-PLA (longitud de lactato) con respecto a OEGMA. Por ejemplo PNPFO<sub>8(6)3</sub> representa el copolímero sintetizado con el 8% molar de HEMA-PLA con una longitud de lactato de 6, y el 3% molar de OEGMA.

Tabla 1. Razón de alimentación, composición final y peso molecular de PNPFO sintetizado con diferentes composiciones.

Razón molar de monómeros <sup>1</sup>	Composición final de copolímero <sup>1</sup>	Mw
6(3)/3/7/84	8,7(3)/3,4/7,9/80	21.212
8(3)/3/7/82	10,9(3)/3,9/8,2/77	21.451
11(3)/3/7/79	11(3)/3/8/78	22.444
6(3)/5/7/82	7,8(6)/5/8,2/79	22.551
8(3)/5/7/80	9,1(6)/6,5/8,4/76	23.544
11(3)/5/7/77	9,1(6)/7/7,9/76	23.001
6(3)/8/7/79	8,2(6)/7/7/77,8	25.541
8(3)/8/7/77	8,8(6)/8,1/8,1/75	25.550
11(3)/8/7/74	11,8(6)/8/8,2/72	27.002
6(6)/3/7/84	6,8(6)/3/8,5/81,5	23.211
8(6)/3/7/82	9,1(6)/3/8/79,9	22.551
11(6)/3/7/79	12,2(6)/3,2/8,6/76	24.555
6(6)/5/7/82	6(6)/5,6/8,4/80	27.521
8(6)/5/7/80	6(6)/8,1/5,5/8,4/77	25.521
11(6)/5/7/77	11,1(6)/5,6/8/75,3	26.555
6(6)/8/7/79	9(6)/8,5/8/74,5	28.452
8(6)/8/7/77	10(6)/9/8,3/72,6	28.881
11(6)/8/7/74	11(6)/8/7/74	27.885
1. PLA-HEMA (longitud de lactato):OEGMA:NAS:NIPAAm		

En la síntesis y purificación de HEMA-PLA, OEGAMA y PNPFO, se usaron diferentes disolventes orgánicos, incluyendo acetato de etilo, dimetilformamida, tetrahidrofurano y dietil éter. Se usó cromatografía de gases para medir los residuos de estos disolventes en PNPFO. Los resultados mostraron que la concentración de todos estos disolventes orgánicos en los productos finales estaba por debajo del nivel de ppm, mostrando que el procedimiento de purificación en múltiples etapas era eficaz y las aplicaciones *in vivo* e *in vitro* de este precursor de polímero son seguras.

## Solubilidad de PNPFO en PBS

Se modificaron las razones monoméricas de PNPFO para adquirir una gama de composiciones que se disolvieron en medios acuosos, tales como PBS para el desarrollo de formulaciones inyectables. Los copolímeros basados en NIPAAm son solubles en disoluciones acuosas por debajo de su LCST debido a la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos polares del copolímero y las moléculas de agua. En este estudio, se estudiaron los efectos de la longitud de lactato, el contenido de HEMA-PLA y OEGMA sobre la solubilidad de PNPFO midiendo la concentración de saturación de diferentes composiciones de PNPFO en PBS.

Los resultados en la figura 3 demuestran que la longitud de lactato creciente dentro del intervalo de 3 a 6 en la estructura principal de HEMA-PLA no tuvo un efecto significativo sobre la solubilidad de PNPFO en PBS ( $p > 0,05$ ). Por tanto, las propiedades hidrófobas de una cadena lateral en la estructura principal de PNPFO tuvo un impacto mínimo sobre la solubilidad global de PNPFO en medios acuosos, dentro del intervalo examinado. Por tanto, cambiando la longitud de lactato, pueden ajustarse otras características de PNPFO, tales como el comportamiento de gelificación y las propiedades mecánicas, sin afectar a la solubilidad de PNPFO en medios acuosos.

Puede ajustarse la solubilidad de PNPFO en PBS cambiando el contenido tanto hidrófobo como hidrófilo. El segmento de PLA es la mayor estructura principal hidrófoba, mientras que ambos monómeros de NAS y HEMA presentan propiedades hidrófilas relativamente limitadas. Por tanto, se incluyó OEGMA en la síntesis de PNPFO para fomentar las propiedades hidrófilas del copolímero. El aumento de HEMA-PLA (es decir, el contenido hidrófobo) en copolímeros desde el 6 hasta el 8 y el 11% molar disminuyó la solubilidad de PNPFO en PBS en el 30% y el 50%, respectivamente. Por ejemplo, la concentración de saturación de PNPFO<sub>6(6)3</sub> disminuyó significativamente ( $p < 0,001$ ) desde  $250 \pm 17$  mg/ml hasta  $190 \pm 10$  mg/ml y  $164 \pm 6$  mg/ml en PNPFO<sub>8(6)3</sub> y PNPFO<sub>11(6)3</sub>, respectivamente. Esta reducción de la solubilidad también se debió a la disminución de la concentración del segmento relativamente hidrófilo NIPAAm en el copolímero ( $p < 0,05$ ). Por tanto, la disminución del contenido de NIPAAm en PNPFO afectó sustancialmente a la hidratación del copolímero.

La solubilidad de PNPFO en agua aumentó drásticamente, cuando se usó más del 3% molar (por ejemplo, el 1,5% molar) de OEGMA como segmento hidrófilo. Los resultados mostraron que los copolímeros con un contenido de OEGMA menor del 3% molar no eran solubles en medios acuosos. Los resultados en la figura 3 muestran que la solubilidad de copolímeros de PNPFO con el 6% molar de PLA/HEMA aumentó significativamente 2 y 3 veces cuando se elevó la concentración de OEGMA desde el 3% molar hasta el 5 y el 8% molar, respectivamente. Sin embargo, en copolímeros que contenían una menor razón molar del segmento hidrófobo HEMA-PLA (es decir, el 8% molar y el 11% molar), la concentración de OEGMA tuvo un pequeño efecto sobre la solubilidad de PNPFO. Este comportamiento se atribuyó a la formación de copolímeros con cadenas más largas y mayor MW, lo que impidió la hidratación y solubilidad del copolímero en disolución acuosa. Como ilustración, el peso molecular de PNPFO<sub>11(3)8</sub> fue significativamente ( $p < 0,01$ ) mayor que el de PNPFO<sub>11(3)5</sub> (27 K en comparación con 26 K), lo que comprometió el efecto de su mayor contenido hidrófilo y, por tanto, la concentración de saturación para ambos compuestos fue de aproximadamente 300 mg/ml.

Se evaluó el efecto de concentración de copolímeros de PNPFO solubles en agua sobre la facilidad de inyección de sus disoluciones a través de una aguja 18G. Se encontró que una disolución de PNPFO 150 mg/ml en PBS podía inyectarse a través de una aguja 18G y se usó esta concentración de copolímero para análisis adicional. Pueden usarse mayores concentraciones de polímeros para otras aplicaciones biomédicas tales como fabricación de andamiajes para crecimiento de tejido *in vitro*.

## Conjugación de PNPFO con proteínas derivadas de manera natural y formación de hidrogeles

La presencia del grupo éster de succinimida en la estructura molecular de PNPFO proporcionó sitios activos faciales para la conjugación con proteínas derivadas de manera natural tales como elastina, colágeno y tropoelastina recombinante. Se usaron diferentes técnicas de conjugación (tal como se muestra en la figura 1) para preparar hidrogeles de proteína-copolímero.

Elastina

En el método (a), se disolvió copolímero de PNPFO en PBS durante 24 h. Se añadió disolución de proteína a disolución de PNPFO y se incubó a 4°C durante 24 h más. En el método (b), se llevaron a cabo la disolución de PNPFO y conjugación de proteína al mismo tiempo. En el método (c), se disolvió PNPFO y se conjugó con proteína derivada de manera natural en un agitador. En el método (d), se formó polvo de conjugado de PNPFO-proteína mediante secado por congelación de disolución de PNPFO-proteína. Se disolvió el polvo de conjugado en PBS en un agitador para formar la disolución polimérica final. Se convirtieron las disoluciones de proteína-PNPFO formadas con diferentes técnicas en hidrogeles mediante el aumento de la temperatura hasta 37°C.

Se examinó la factibilidad de conjugación o reticulación de esta clase de copolímeros con proteína derivada de

manera natural. Para los fines de este estudio, se usaron PNPFO<sub>6(6)8</sub> y elastina (como proteína modelo). Se muestra el esquema del procedimiento, usado para la conjugación de PNPFO con elastina, en la figura 4(a). En cada ejecución, se usaron una elastina 100 mg/ml y 150 mg/ml de PNPFO para formar conjugado de elastina-copolímero. En este estudio, se usaron diferentes técnicas (tal como se muestra esquemáticamente en la figura 1) para disminuir el tiempo de preparación de la disolución de proteína-copolímero para facilitar la aplicación clínica de este sistema. Se confirmó la conjugación química de elastina y PNPFO con diferentes técnicas midiendo la tasa de retención de elastina dentro de la estructura del hidrogel conjugado. Estudios previos mostraron que después de 24 h de incubación, se retenía menos del 40% en peso de proteínas en la estructura de los hidrogeles.<sup>7</sup> En este estudio, se correlacionó la razón de conjugación de elastina y PNPFO con la razón de retención de elastina en la estructura de biopolímero después de 24 h de lavado meticuloso del hidrogel conjugado en PBS en condiciones fisiológicas. Se usó el ensayo de proteínas de Bradford para determinar la concentración de proteína solubilizada en los medios de lavado.<sup>8</sup>

Se resumen en la tabla 2 el tiempo de preparación y la razón de retención de elastina en hidrogeles conjugados, preparados con diferentes técnicas.

15 Tabla 2. El efecto del método de preparación sobre la retención de elastina

Técnica de preparación <sup>1</sup>	Tiempo de preparación	Retención de elastina (% en peso)
Método a	48 horas	51 ± 4
Método b	24 horas	78 ± 3
Método c	10 horas	77 ± 3
Método d	6 horas	

1. Remítase a la figura 1 para una visión general esquemática de las técnicas de preparación.

Tal como se mencionó anteriormente, en el método (a) se disolvió PNPFO en PBS en el plazo de 24 h. Posteriormente, se añadió la disolución de elastina a la disolución de PNPFO y se incubó a 4°C durante 24 h más. Los resultados del ensayo de proteínas de Bradford mostraron que el 51 ± 4% en peso de elastina participó en la reacción de conjugación química. Mediante la disolución y conjugación simultáneas de copolímero de PNPFO y elastina (método (b)) se disminuyó el tiempo de preparación de 48 h a 24 h y aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) la razón de retención de elastina hasta el 78 ± 3% en peso. Se disminuyó adicionalmente el tiempo de preparación hasta 10 h en el método (c) llevando a cabo la fase de disolución y conjugación a 4°C con agitador sin afectar a la razón de retención de elastina ( $p > 0,05$ ). En el método (d), se conjugaron proteína (tal como elastina) y copolímero. Entonces se secó por congelación la disolución de conjugado, formándose polvo de elastina-PNPFO. Se disolvió este polvo en PBS en 6 h y puede administrarse como producto final. Se disminuyó el tiempo de preparación desde 48 h hasta 6 h, lo que se ha considerado que es un tiempo de preparación clínicamente aceptable. Se usó el método (d) para la preparación de diferentes hidrogeles de proteína-PNPFO.

La estructura del copolímero de PNPFO térmicamente sensible consiste en enlaces de amida hidrófilos y grupos isopropilo hidrófobos. El aumento de la temperatura de las disoluciones (en ambas disoluciones de PNPFO y elastina-PNPFO) desde 4°C hasta 37°C (por encima de la LCST) instigó la deshidratación de los grupos isopropilo hidrófobos durante la transición de espiral a globo (dirigida por el contenido de PNIPAAm), seguido por la precipitación de los compuestos. Existe un fuerte enlace de hidrógeno entre agua y ambas proteínas y copolímero, que dio como resultado la formación de un hidrogel conjugado por encima de la LSCT, tal como se muestra en la figura 4(b).

Se usó ATR-FTIR para confirmar la formación de enlaces covalentes entre elastina y PNPFO. Los resultados en la figura 4(c) muestran que los picos clave para PNPFO incluyen tensiones N-H y C=O de NIPAAm a 1540 cm<sup>-1</sup> y 1645 cm<sup>-1</sup> y tres picos característicos de grupo éster de succinimida a 1740 cm<sup>-1</sup>, 1763 cm<sup>-1</sup> y 1795 cm<sup>-1</sup>. La ausencia de estos picos para NAS en espectros de ATR-FTIR de conjugado de elastina-copolímero subrayó que la elastina se unía covalentemente al grupo éster de succinimida en PNPFO.

La presencia de elastina dentro de la estructura del conjugado hidrogel también se confirmó mediante los picos de elastina de ATR-FTIR característicos. En general para todas las proteínas tales como elastina, los enlaces amida se presentan dentro de 1600 cm<sup>-1</sup> a 1700 cm<sup>-1</sup>. Esta región procede de la vibración de tensión C=O y confirma la estructura secundaria de la estructura principal de proteína. Los picos entre 1600 cm<sup>-1</sup> y 1640 cm<sup>-1</sup> corresponden a las bandas de lámina beta e interacción intermolecular. El hidrogel de elastina-PNPFO mostró un pico a 1640 cm<sup>-1</sup>, confirmando la presencia de interacción intermolecular y formación de estructura de proteína estable. Además, los picos entre 1640 cm<sup>-1</sup> y 1660 cm<sup>-1</sup> demuestran la contribución de espirales al azar y hélices alfa en la elastina. El conjugado de copolímero-elastina también mostró un pico a 1640 cm<sup>-1</sup> debido a la presencia de  $\alpha$ -hélices en la elastina. Los picos restantes en la región de amida I desde 1660 cm<sup>-1</sup> hasta 1690 cm<sup>-1</sup> predominaron mediante vibraciones de estructuras de giro beta, con algunos pequeños picos de otras estructuras, indicados como puntos de giro. En la región de amida II (de 1500 a 1600 cm<sup>-1</sup>), los espectros de ATR-FTIR de elastina-PNPFO mostraron un desplazamiento significativo que correspondía a la tensión N-H de NIPAAm y elastina desde 1535 cm<sup>-1</sup> hasta

1545  $\text{cm}^{-1}$  de número de ondas. Este desplazamiento en los espectros de FTIR confirma la interacción molecular entre PNPFO y elastina en el producto de conjugado de elastina-copolímero.

Además, tal como se muestra en la figura 5, el polímero mostró un pico característico a 1812  $\text{cm}^{-1}$  asociado con el grupo succinimida. Después de la conjugación de elastina, este pico desapareció por completo, indicando la participación de elastina en la reacción de condensación con el grupo succinimida. Tras la comparación de espectros antes y después de la incorporación de elastina, se observó una atenuación significativa de la absorción del grupo éster (1735  $\text{cm}^{-1}$ ) y un aumento espectacular de la absorción del grupo amida (1630 y 1545  $\text{cm}^{-1}$ ), que resultó de la conversión del enlace éster en una unión amida en el transcurso de la reticulación. Esto dio como resultado la variación de intensidad relativa correspondiente observada de estos picos característicos.

En ausencia de proteína, se precipitó PNPFO en disolución de PNPFO a 37°C y el enmarañamiento al azar de las cadenas de polímero formó un hidrogel frágil con escasa integridad física. Se disolvió totalmente el hidrogel de PNPFO en PBS después de 4 días en PBS (que se usó para imitar el entorno fisiológico) tal como se muestra en la figura 4(c). La conjugación de PNPFO con proteína (por ejemplo, elastina) condujo a la formación de enlaces covalentes que mantuvieron la integridad del hidrogel durante un periodo de tiempo más largo. Esta conjugación química proporciona por tanto suficiente estabilidad a los hidrogeles para diferentes aplicaciones biomédicas.

Los resultados de observación visual, la interacción intermolecular adquirida del análisis por ATR-FTIR y la tasa de retención de proteína en hidrogeles conjugados demostraron que el copolímero sintetizado tiene la capacidad para unirse covalentemente a una proteína tal como elastina. Se estudiaron las características fisicoquímicas de conjugados de elastina-PNPFO formados con diferentes composiciones de copolímero para seleccionar la composición adecuada para inyección y aplicación biomédica. Estos análisis incluyeron propiedades de gelificación, eficiencia de conjugación y comportamiento de degradación.

#### Colágeno

Puesto que el agente de unión de succinimida muestra alta reactividad y accesibilidad optimizada hacia compuestos que contienen grupos amino, es razonable postular que el polímero puede aplicarse a otros tipos de polímeros naturales con grupos amino para la fabricación de hidrogeles inyectables. Para confirmar esta suposición, se examinó la factibilidad de una reacción entre el polímero y colágeno.

Se neutralizó una disolución de colágeno (OVICOLL®CLEAR, al 1%, pH 2,5~3,5) con pequeñas alícuotas de disolución de NaOH 1 M. Se mezclaron meticulosamente 250  $\mu\text{l}$  de la disolución de colágeno neutralizada resultante con 500  $\mu\text{l}$  de disolución de polímero/PBS 250 mg/1 ml. Entonces se transfirió la mezcla a una nevera. Después de conservación a 4°C durante 24 h, se permitió entonces que gelificase la mezcla a 37°C seguido por lavado con agua destilada para retirar cualquier impureza.

Los resultados (figura 6) muestran la formación satisfactoria del hidrogel.

#### Comportamiento de gelificación

En este estudio, se estudiaron los efectos de la razón molar de LA, el contenido de OEGMA y HEMA-PLA sobre el comportamiento de gelificación de conjugados de copolímero de elastina. Se midieron la temperatura de gelificación y el tiempo de gelificación para la conjugación de elastina con diferentes tipos de PNPFO sintetizados en el presente documento.

#### Temperatura de gelificación

Se evaluó el comportamiento reológico de conjugado de elastina con diferentes tipos de copolímero de PNPFO dentro del intervalo de temperatura de 10°C a 37°C a la velocidad de 0,3°C/min. Se usaron estos datos para determinar la temperatura de gelificación de las disoluciones de elastina-PNPFO, formadas con diferentes composiciones de copolímero. Se muestra el comportamiento reológico de tres composiciones de copolímeros como ejemplo en la figura 7(a). Por debajo de la LCST, estas tres disoluciones de elastina-PNPFO se mantuvieron en fase líquida. El aumento de la temperatura por encima de la LCST desencadenó la fase de deshidratación, seguido por la formación del hidrogel. Basándose en el comportamiento reológico de los conjugados, se registró la temperatura de gelificación en el punto de cruce del módulo de almacenamiento dinámico ( $G'$ ) y módulo de pérdida ( $G''$ ), tal como se muestra en la figura 7(a). Después de este punto, la respuesta elástica de los hidrogeles predominó frente a la respuesta viscosa y la estructura del hidrogel continuó evolucionando, a medida que aumentó  $G'$ . En este periodo,  $G''$  permaneció constante a aproximadamente 1 Pa. Los resultados en la figura 7(b) mostraron que la mayor parte de las disoluciones de elastina-copolímero examinadas permitieron la formación de un hidrogel por debajo de 37°C (temperatura corporal). Sin embargo, la LCST para la disolución de conjugado de elastina-PNPFO<sub>6(3)8</sub> fue de aproximadamente 40°C es decir por encima de la temperatura corporal. Por tanto, esta composición de copolímero puede no ser un candidato favorable para aplicaciones biomédicas. La alta LCST en PNPFO<sub>6(3)8</sub> se debió a un alta

razón de contenido hidrófilo con respecto a contenido hidrófobo en este copolímero. Además, en PNPFO<sub>11(3)3</sub> y PNPFO<sub>11(6)3</sub> la falta de sitios hidrófilos inhibió la rehidratación del biopolímero después de la fase de condensación. Este efecto condujo a la precipitación de conjugado en forma de polvo con débil integridad estructural. Se presenta el efecto de la razón molar de lactato, OEGMA y HEMA-PLA sobre la temperatura de gelificación de diferentes conjugados en las figuras 7(b) y (c).

Estos datos muestran que la razón molar de lactato en macrómero de HEMA-PLA no tuvo un efecto significativo sobre la temperatura de gelificación ( $p > 0,05$ ). También se observó una tendencia similar para el efecto de este parámetro sobre la solubilidad presentado en la figura 3. Este resultado sugiere que las propiedades hidrófobas de las cadenas laterales en la estructura principal de HEMA-PLA del copolímero no tuvo un efecto significativo sobre las propiedades hidrófilas del copolímero dentro del intervalo examinado.

La presencia de OEGMA desempeñó un papel importante en el comportamiento de gelificación de disoluciones de conjugado. Se elevó la temperatura de gelificación del conjugado de elastina-PNPFO desde  $17 \pm 2^\circ\text{C}$  hasta  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  cuando se aumentó el contenido de OEGMA desde el 3% molar (PNPFO<sub>8(6)3</sub>) hasta el 5 (PNPFO<sub>8(6)5</sub>) y el 8% molar (PNPFO<sub>8(6)8</sub>), respectivamente ( $p < 0,01$ ).

También se estudió el efecto de la concentración de HEMA-PLA como segmento hidrófobo sobre la temperatura de gelificación del copolímero de PNPFO. El aumento del contenido de HEMA-PLA desde el 6% molar hasta el 8% molar y el 11% molar disminuyó significativamente ( $p < 0,001$ ) la temperatura de gelificación de copolímero conjugado en aproximadamente el 20% y el 30%, respectivamente. Estos datos demuestran que la temperatura de gelificación de conjugado de proteína-PNPFO puede ajustarse dentro del intervalo de  $11^\circ\text{C}$  a  $40^\circ\text{C}$  manipulando los contenidos hidrófobo e hidrófilo.

#### Tiempo de gelificación

Se examinó el comportamiento reológico de disoluciones de conjugado a  $37^\circ\text{C}$  a lo largo del tiempo para determinar el tiempo de gelificación de disoluciones de elastina-PNPFO con diferentes composiciones de copolímero. El comportamiento reológico de tres composiciones de copolímeros se muestra como ejemplo en la figura 7(d). El tiempo de gelificación es importante para aplicaciones *in vivo* de formulaciones inyectables. Una gelificación rápida puede conducir a gelificación prematura y bloqueo de la aguja o aumentar la viscosidad de disoluciones inyectables. Estos dos problemas dan como resultado una administración inconveniente de la formulación. Se considera óptimo un tiempo de gelificación de aproximadamente 9 minutos para la operación clínica. Se alteró el tiempo de gelificación de la disolución de proteína-PNPFO cambiando la longitud de lactato, el contenido de HEMA-PLA y OEGMA, tal como se muestra en las figuras 7(e) y (f).

El aumento de la longitud de lactato desde 3 hasta 6 disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) el tiempo de gelificación del sistema conjugado en aproximadamente el 10%. Elevando el contenido de HEMA-PLA desde el 6% molar hasta el 8% molar y el 11% molar, se redujo el tiempo de gelificación en el 20% y el 40%, respectivamente. Estas reducciones del tiempo de gelificación se atribuyeron a la elevación de la fracción hidrófoba y el peso molecular del copolímero de PNPFO. Lo primero aceleró la velocidad de condensación de la disolución de elastina-PNPFO, mientras que lo último afectó al enmarañamiento de la cadena polimérica durante la fase de gelificación, y por tanto el tiempo de gelificación.

El aumento del contenido de OEGMA desde el 3% molar hasta el 5% molar y el 8% molar dio como resultado una elevación significativa ( $p < 0,001$ ) del tiempo de gelificación de 2-3 veces, respectivamente. El aumento del contenido de OEGMA fue un obstáculo para las interacciones hidrófobas durante la condensación y, por tanto, la formación del hidrogel. Por ejemplo, el comportamiento reológico de PNPFO<sub>8(6)3</sub>, PNPFO<sub>8(6)5</sub> y PNPFO<sub>8(6)8</sub>, mostrado en la figura 7(d), reveló que el copolímero con mayor contenido hidrófilo mostró un tiempo de gelificación más corto. En PNPFO<sub>8(6)3</sub> el tiempo de gelificación fue de  $7,2 \pm 0,5$  min, que era menor que para PNPFO<sub>8(6)5</sub> ( $10,1 \pm 0,6$  min) y PNPFO<sub>8(6)8</sub> ( $12,2 \pm 0,2$  min). Los datos adquiridos en este caso demuestran que es viable cambiar la temperatura y el tiempo de gelificación de disoluciones de conjugado variando la composición del copolímero. Esto permite que se ajuste el comportamiento de gelificación del sistema conjugado basándose en la aplicación biomédica final del hidrogel inyectable.

#### Eficiencia de conjugación de PNPFO

Se diseñó el copolímero de PNPFO para la conjugación con biopolímeros basados en proteína con posible aplicación en la administración de biofactores encapsulados en el sitio requerido y regeneración del tejido *in vivo*. Puede ser viable usar este concepto para conjugar una proteína terapéutica con copolímero de PNPFO para administraciones inyectables y liberación controlada. Para ingeniería de tejidos *in vivo*, la incorporación de proteína derivada de manera natural dentro de la estructura de copolímero potencia la actividad biológica del copolímero sintético. Se evaluó la capacidad de conjugación de diferentes composiciones de copolímeros evaluando la razón de retención de elastina dentro de la estructura del copolímero. Para este análisis, se usó la técnica de Bradford. Se

evaluaron los efectos de longitud de lactato, contenido de HEMA-PLA y OEGMA sobre la capacidad de conjugación de los copolímeros.

5 Se encontró que se fomentaba la conjugación de elastina con copolímeros cuando se usaron razones casi equimolares de segmentos hidrófilos con respecto a hidrófobos. Para copolímeros con índice de lactato de 6, la conjugación de elastina se aproximó al  $91 \pm 1\%$  en peso para copolímero que tenía (8% molar) OEGMA/(8% molar) HEMA-PLA (es decir, razón equimolar). En copolímeros sintetizados con índice de lactato de 3 (propiedades hidrófobas relativamente menores de la estructura principal de HEMA-PLA), se logró la mayor conjugación de elastina del  $81 \pm 2\%$  en peso para un contenido de HEMA-PLA y OEGMA del 11% molar y el 8% molar, respectivamente.

10 Los resultados del ensayo de proteínas de Bradford demuestran que la conjugación de elastina fue de más del 65% en peso y hasta del 90%. La capacidad de conjugación del copolímero de PNPFO es superior a la de copolímeros sintetizados previamente para la conjugación con proteínas. La alta estabilidad de elastina conjugada en la estructura de PNPFO puede atribuirse a la formación de enlaces covalentes entre elastina y el copolímero, según se confirma mediante los resultados de FTIR (comentado anteriormente). En aplicaciones biomédicas de hidrogeles inyectables, es importante poder incorporar una alta razón de proteína dentro de un copolímero a nivel molecular. Las composiciones de copolímero seleccionadas para la caracterización adicional son PNPFO<sub>11(3)5</sub>, PNPFO<sub>11(3)8</sub>, PNPFO<sub>8(6)5</sub> y PNPFO<sub>8(6)8</sub>, que presentan todos una eficiencia de conjugación por encima del 80% en peso.

#### Comportamiento de biorresorción de hidrogeles de proteína-PNPFO

20 En ingeniería de tejidos, es favorable usar una estructura polimérica que es biodegradable o biorresorbible en condiciones biológicas. Se diseñó PNPFO con dominio hidrófobo degradable (HEMA-PLA): su escisión gradual junto con la retención de la estructura principal hidrófila (OEGMA) de la estructura molecular del copolímero puede conducir a la disolución de hidrogel en el entorno fisiológico. Además, la tasa de biorresorción es un factor importante en la utilidad de los hidrogeles para aplicaciones biomédicas. Se evaluaron las propiedades de biorresorción de hidrogeles conjugados mediante hidrólisis del segmento de PLA y la tasa de biorresorción de diferentes hidrogeles de elastina-PNPFO en entornos fisiológicos.

#### Capacidad de biorresorción de los hidrogeles

30 Tal como se comentó anteriormente, la degradación de dominios hidrófobos (HEMA-PLA) en PNPFO y la retención de segmentos hidrófilos (OEGMA) puede dar como resultado el aumento de la LCST y la disolución de polímero conjugado en el organismo. Se llevó a cabo la hidrólisis acelerada sumergiendo la muestra en una disolución de hidróxido de sodio (1 M) durante un periodo de tres semanas a 4°C. Después de este periodo, se neutralizó la suspensión con disolución de clorhidrato 10 M. Se examinó el efecto de la hidrólisis de PLA sobre la estabilidad del conjugado de proteína-PNPFO en condiciones fisiológicas. Se seleccionaron cuatro copolímeros diferentes con las mayores eficiencias de conjugación PNPFO<sub>11(3)5</sub>, PNPFO<sub>11(3)8</sub>, PNPFO<sub>8(6)5</sub> y PNPFO<sub>8(6)8</sub> para este estudio (tal como se mencionó anteriormente). Después de la hidrólisis, desapareció el pico característico de PLA a 5,1 ppm en los espectros de <sup>1</sup>H-RMN de estos copolímeros, confirmando la escisión de PLA. Entonces se conjugaron con elastina los hidrolizados.

40 Se compararon las propiedades reológicas de copolímero conjugado a diferentes temperaturas antes y después de la hidrólisis. Los resultados presentados en la figura 8(a) destacan el desplazamiento significativo de la temperatura de gelificación hasta por encima de 37°C para hidrogeles formados con copolímeros hidrolizados. Por ejemplo, la temperatura de gelificación de PNPFO<sub>11(3)8</sub> después de degradación acelerada aumentó significativamente ( $p < 0,001$ ) desde  $20,1 \pm 1,0^\circ\text{C}$  hasta  $42,2 \pm 3,1^\circ\text{C}$ . Este resultado sugirió que los copolímeros convertidos se volvieron solubles a 37°C tras la escisión de residuos de polilactida en la estructura principal de HEMA-PLA del copolímero. Para muchas aplicaciones biomédicas, tales como crecimiento de tejido *in vivo*, la tasa de degradación normal en un entorno fisiológico es un factor importante.

#### 45 La tasa de biorresorción de hidrogeles de proteína-PNPFO en el entorno fisiológico

50 Se usaron cuatro composiciones de copolímeros con las mayores eficiencias de bioconjugación (PNPFO<sub>11(3)5</sub>, PNPFO<sub>11(3)8</sub>, PNPFO<sub>8(6)5</sub> y PNPFO<sub>8(6)8</sub>) junto con PNPFO<sub>8(6)3</sub> como control para estudiar la degradación y biorresorción de hidrogeles conjugados en un entorno confinado a 37°C en PBS. Se empaparon estos hidrogeles en PBS a 37°C durante 30 días y se usó una técnica gravimétrica para determinar la razón de pérdida de peso de los hidrogeles en diferentes intervalos de tiempo. Los resultados mostraron que los copolímeros con alta eficiencia de conjugación mostraron una tasa de degradación significativamente ( $p < 0,001$ ) menor en comparación con PNPFO<sub>8(6)3</sub> con una eficiencia de conjugación del 60%, tal como se muestra en la figura 9(b). La formación de enlaces covalentes entre elastina y copolímero impidió la formación de enlaces no específicos de la molécula de copolímero con ella misma y con elastina. La formación de enlaces no específicos en estructuras moleculares complejas pueden conducir a una alta tasa de degradación y pérdida de peso en los hidrogeles. Los copolímeros de

PNPHO con alta eficiencia de conjugación pueden formar enlaces covalentes con elastina, lo que inhibiría la formación de interacciones no específicas de la cadena de copolímero con ella misma y elastina.

Los resultados mostraron que los cuatro biopolímeros con alta eficiencia de conjugación mostraron una pérdida de peso relativamente baja (< 15%) en el plazo de 30 días de incubación en PBS tal como se muestra en la figura 9(c). Durante los primeros 7 días, no hubo una diferencia significativa entre la tasa de degradación de todos los copolímeros con diferente contenido hidrófilo e hidrófobo ( $p > 0,05$ ). Después de 14 días de incubación, los copolímeros con mayor contenido de OEGMA (pNPHO<sub>11(3)8</sub> y pNPHO<sub>8(6)8</sub>) y mayor eficiencia de conjugación mostraron una pérdida de peso relativamente menor ( $p < 0,05$ ) en comparación con los otros dos copolímeros con un contenido de OEGMA del 5% molar. Este resultado concordó con datos previos de que los copolímeros con una mayor razón de bioconjugación podían retener su estructura durante un periodo de tiempo más largo.

Los hidrogeles de elastina-copolímero formados con las composiciones de copolímero óptimas pudieron retener el 85% de su peso inicial después de 30 días de incubación en PBS. En cambio, Guan *et al.* notificaron una pérdida de peso de aproximadamente el 90% para hidrogeles formados mediante conjugación de colágeno y poli(NIPAAm-co-AAc-co-NAS-co-HEMA-PLA) después de 21 días.<sup>9</sup> La mayor estabilidad de los hidrogeles de la presente invención se debió a la alta capacidad de conjugación del copolímero de PNPFO. La alta estabilidad de PNPFO en el entorno fisiológico era comparable con otros copolímeros inyectables de base sintética tales como poli(NIPAAm-co-HEMA-co-metacrilato-pollactida (MAPLA)). Este copolímero mostró una retención de peso de aproximadamente el 80% después de 30 días de incubación en PBS a 37°C. Sin embargo, este copolímero sin embargo no tenía ningún grupo funcional que pudiera unirse a proteínas. La presencia de sitios activos faciales en PNPFO confiere capacidad de conjugación con proteínas a este sistema inyectable. Esta propiedad del copolímero de PNPFO puede transmitir propiedades biológicas superiores al sistema inyectable y hacer que sea más favorable para diferentes aplicaciones biomédicas tales como administración de biofactores y crecimiento de tejido *in vivo*.

El efecto de la razón de conjugación sobre la retención de la estructura de hidrogeles

Cualquier biomaterial usado para aplicaciones de ingeniería de tejidos debe unirse fuertemente al tejido del huésped para fomentar la formación de tejido acelerando la migración celular dentro de la estructura. Además, el biomaterial debe presentar una buena retención de la estructura a lo largo del tiempo para fomentar la integración de tejido regenerado con el entorno circundante. Adhesivos tisulares disponibles comercialmente, basados en fibrinas, son el tratamiento de referencia actual para aplicaciones quirúrgicas debido a sus propiedades no citotóxicas. Su aplicación, sin embargo, es limitada debido a la tasa de degradación muy alta. En particular, la presencia de células de condrogénesis aumenta drásticamente la tasa de degradación de estos tipos de adhesivos tisulares. Más recientemente, se sintetizaron adhesivos basados en sulfato de condroitina para unir covalentemente cartílago con hidrogeles. Este enfoque fomentó la estabilidad estructural de los hidrogeles. Sin embargo, requiere técnicas de implantación invasivas que implican digestión de cartílago y reticulación UV. Para abordar estos problemas, se diseñaron geles de sulfato de condroitina-PEG para unir covalentemente con aminas primarias colágeno mediante la formación de enlaces amida en un entorno fisiológico. Estos hidrogeles, sin embargo, no permitían el crecimiento de condrocitos y la remodelación de cartílago.

La capacidad de los hidrogeles para retener su integridad estructural en los sitios implantados es importante en el desarrollo de un biomaterial adecuado para la reparación de tejido. Se estudió la integridad estructural de hidrogeles de proteína-PNPFO en un entorno fisiológico. Los resultados mostraron que la conjugación química entre proteína y copolímero desempeña un papel importante al lograr la integridad estructural de los hidrogeles.

Se potenció el grado de conjugación química entre proteína y copolímero teniendo una conjugación de elastina-PNPFO en dos etapas, aumentando los sitios activos faciales en el copolímero, o usando tropoelastina recombinante (rTE) para conjugarla con PNPFO. En esta parte del estudio, se usó PNPFO<sub>8(6)5</sub>. En un procedimiento de conjugación en dos etapas, se disolvió polvo de elastina-PNPFO<sub>8(6)5</sub> en disolución de elastina en vez de PBS para aumentar la razón de conjugación entre elastina y copolímero (elastina(2x)-PNPFO<sub>8(6)5</sub>). En el segundo enfoque, para elevar el grado de conjugación, se aumentó el sitio activo de proteína en el copolímero de PNPFO desde el 7 hasta el 14% molar aumentando la razón de alimentación de NAS en la síntesis del copolímero, formándose PNPFO<sub>8(6)5-14</sub>. Alternativamente, se sustituyó elastina por rTE con mayor grupos de amina primaria (35 residuos de lisina por molécula en comparación con  $\alpha$ -elastina con menos del 1%) para formar un sistema de proteína-PNPFO<sub>8(6)5</sub> conjugado con un mayor grado de conjugación. Se empaparon los hidrogeles en PBS a 37°C y se registraron sus variaciones volumétricas en diferentes intervalos de tiempo tal como se muestra en la figura 10.

Los resultados mostraron que el grado de conjugación química entre proteína y copolímero desempeña un papel importante en la retención de la estructura de los hidrogeles. Esto se confirmó mediante menores varianzas volumétricas de hidrogeles con mayores grados de conjugación en comparación con elastina-PNPFO<sub>8(6)5</sub>. La conjugación química de elastina y copolímero aumentó significativamente en hidrogeles de elastina(2x)-PNPFO<sub>8(6)5</sub> en aproximadamente dos veces. Este efecto produce una varianza volumétrica menor del 50% en elastina(2x)-PNPFO<sub>8(6)5</sub> después de 14 días en comparación con elastina-PNPFO<sub>8(6)5</sub>. La integridad estructural del hidrogel de proteína-copolímero aumentó adicionalmente elevando la reactividad con proteína del copolímero. Elastina-

PNPHO<sub>8(6)5</sub>-14 presentó una integridad estructural significativamente mayor en condiciones fisiológicas en comparación con elastina-PNPHO<sub>8(6)5</sub>. Usando rTE (que presenta un mayor número de grupos de amina primaria) la conjugación de proteína y copolímero también aumentó y el hidrogel de rTE-PNPHO<sub>865</sub> presentó la mayor integridad estructural en un entorno fisiológico después de 14 días. Este hidrogel mostró menos del 20% de varianza volumétrica dentro de este periodo. Estos resultados muestran que el grado de conjugación química entre proteína y copolímero desempeña un papel importante en la estabilidad y propiedades físicas de un sistema conjugado.

#### Estudios biológicos

##### Células de fibroblastos de piel humana

Se cultivaron células de fibroblastos de piel humana (GM3348) en las proximidades de un hidrogel conjugado para evaluar la citocompatibilidad de hidrogeles de elastina-PNPHO. Se formó una disolución de elastina y PNPHO usando PBS esterilizado. Tras la gelificación, se lavaron los hidrogeles con PBS precalentado, tres veces para eliminar todas las proteínas y copolímero sin reaccionar. Entonces se equilibraron los hidrogeles (sin esterilización adicional) en medios (DMEM, FBS al 10% y pen.-estrep.) durante la noche a 37°C. Luego se cultivaron las células a  $2 \times 10^5$  células/pocillo en una placa de 6 pocillos en las proximidades de hidrogeles conjugados. Se estudió la proliferación celular en la superficie de pocillo con análisis por microscopía óptica para evaluar la citocompatibilidad *in vitro* de los hidrogeles. Los resultados en la figura 11 muestran que después de 72 horas, los fibroblastos estaban vivos y proliferaron cerca del hidrogel. Este resultado confirma que los hidrogeles conjugados son citocompatibles y los productos de degradación no son citotóxicos.

También se evaluó la capacidad de encapsulación celular de hidrogeles conjugados, usando fibroblastos. Se mezcló una suspensión celular altamente concentrada con una disolución de elastina-PNPHO a temperatura ambiente. Entonces se incubó esta suspensión a 37°C, seguido por la adición gradual de medios (DMEM, FBS al 10% y pen.-estrep.) a los hidrogeles. Se usó la tinción de nucleolos de Hoechst 33258 para visualizar las células de fibroblastos, encapsuladas dentro de la estructura de los hidrogeles. Los resultados en la figura 12 muestran que la población celular aumentó significativamente desde el día 1 hasta el día 3 dentro de los hidrogeles de elastina-PNPHO. Este resultado confirma la citocompatibilidad de este hidrogel conjugado.

##### Condrocitos

Estos resultados demuestran la factibilidad de combinar PNPHO, elastina y condrocitos primarios a las mismas densidades de células viables tal como se observa en cartilago de oveja (figura 13). Los condrocitos incrustados persisten de forma anaerobia en lagunas como lo hacen en el cartilago nativo. Este resultado subraya la biocompatibilidad del polímero sintetizado y el potencial de uso de este constructo para la reparación de cartilago.

#### Bibliografía

1. Vinatier, C. *et al* (2009) "Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors", Trends in Biotechnology 27(5):307-314.
2. van Donkelaar, C. C. and Schulz, R. M. (2008) "Review on patents for mechanical stimulation of articular cartilage tissue engineering", Recent Patents on Biomedical Engineering 1(1): 1-12.
3. Chung, C. and Burdick, J. A. (2008) "Engineering cartilage tissue", Advanced Drug Delivery Reviews 60: 243-262.
4. Lee, H. J., *et al* (2006) "Collagen mimetic peptide-conjugated photopolymerizable PEG hydrogel", Biomaterials 27: 5268-5276.
5. Gennaro, A. R., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>a</sup> ed. (2006), Lippincott Williams & Wilkins.
6. Dijk-Wolthuis, W. van *et al.* (1997) "A new class of polymerizable dextrans with hydrolyzable groups: hydroxyethyl methacrylated dextran with and without oligolactate spacer", Polymer 38(25):6235-6242.
7. Mercado, A. E. *et al.* (2009) "Release characteristics and osteogenic activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2 grafted to novel self-assembled poly(lactide-co-glycolide fumarate) nanoparticles", Journal of Controlled Release 140(2):148-156.
8. Bradford, M. M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", Analytical Biochemistry 72(1-2):248-254.
9. Guan, J. *et al.* (2008) "Protein-Reactive, Thermoresponsive Copolymers with High Flexibility and Biodegradability", Biomacromolecules 9: 1283-1292.

REIVINDICACIONES

1. Polímero para la formación de un hidrogel, incluyendo el polímero:

5 un primer monómero con capacidad de unión a agua en el que el primer monómero es un poliéter seleccionado de polietilenglicol (PEG), oligo(etilenglicol) (OEG), poli(óxido de etileno) (PEO), poli(óxido de etileno-co-óxido de propileno) (PPO), copolímeros de bloque o al azar de copoli(óxido de etileno) y poli(alcohol vinílico) (PVA);

un segundo monómero para conferir propiedades mecánicas a un hidrogel en el que el segundo monómero es un metacrilato o un poliéster seleccionado de metacrilato de hidroxietilo (HEMA), poli(ácido láctico), poli(caprolactona), poli(glicolida), poli(glicolida-co-lactida), poli(glicolida-co-caprolactona) y copolímeros al azar de los mismos; y

10 un tercer monómero para la unión a una proteína de la matriz extracelular, en el que el tercer monómero tiene grupos funcionales electrófilos para la unión a una proteína de la matriz extracelular seleccionados de N-hidroxisuccinimidias (NHS), N-hidroxisulfosuccinimida (SNHS), succinimida N-hidroxietoxilada (ENHS) y N-acriloxisuccinimida (NAS).

2. Polímero según la reivindicación 1, en el que el primer monómero es oligo(etilenglicol) (OEG).

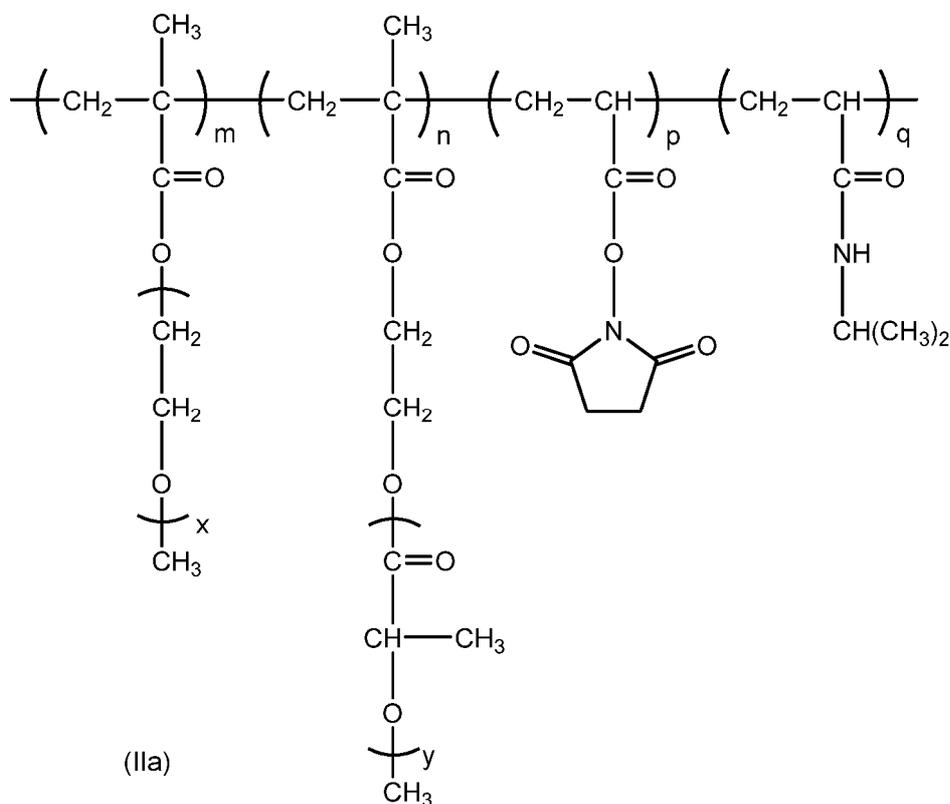
15 3. Polímero según la reivindicación 1 ó 2, en el que el segundo monómero es el copolímero al azar HEMA-poli(ácido láctico).

4. Polímero según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tercer monómero tiene el grupo funcional electrófilo N-acriloxisuccinimida (NAS).

5. Polímero según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polímero incluye además un cuarto monómero para conferir características de transición de fase a un hidrogel.

20 6. Polímero según la reivindicación 5, en el que el cuarto monómero es poli(N-isopropilacrilamida).

7. Polímero según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polímero es un polímero de fórmula (IIa):



25 en la que m es un número entero desde 1 hasta 10, n es un número entero desde 1 hasta 10, p es un número entero desde 1 hasta 10, q es un número entero desde 1 hasta 10, x es un número entero desde 1 hasta 1000 y y es un número entero desde 1 hasta 1000.

8. Composición para la formación de un hidrogel, incluyendo la composición una proteína de la matriz extracelular y un polímero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Composición según la reivindicación 8, en la que la proteína de la matriz extracelular es colágeno.
- 5 10. Hidrogel que incluye agua, una proteína de la matriz extracelular y un polímero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
11. Hidrogel según la reivindicación 10, en el que el hidrogel se forma añadiendo agua a la composición según la reivindicación 8.
12. Hidrogel según la reivindicación 10 u 11, en el que el hidrogel incluye además una o más células para ayudar en la reparación de tejido biológico.
- 10 13. Hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que la proteína de la matriz extracelular es colágeno.

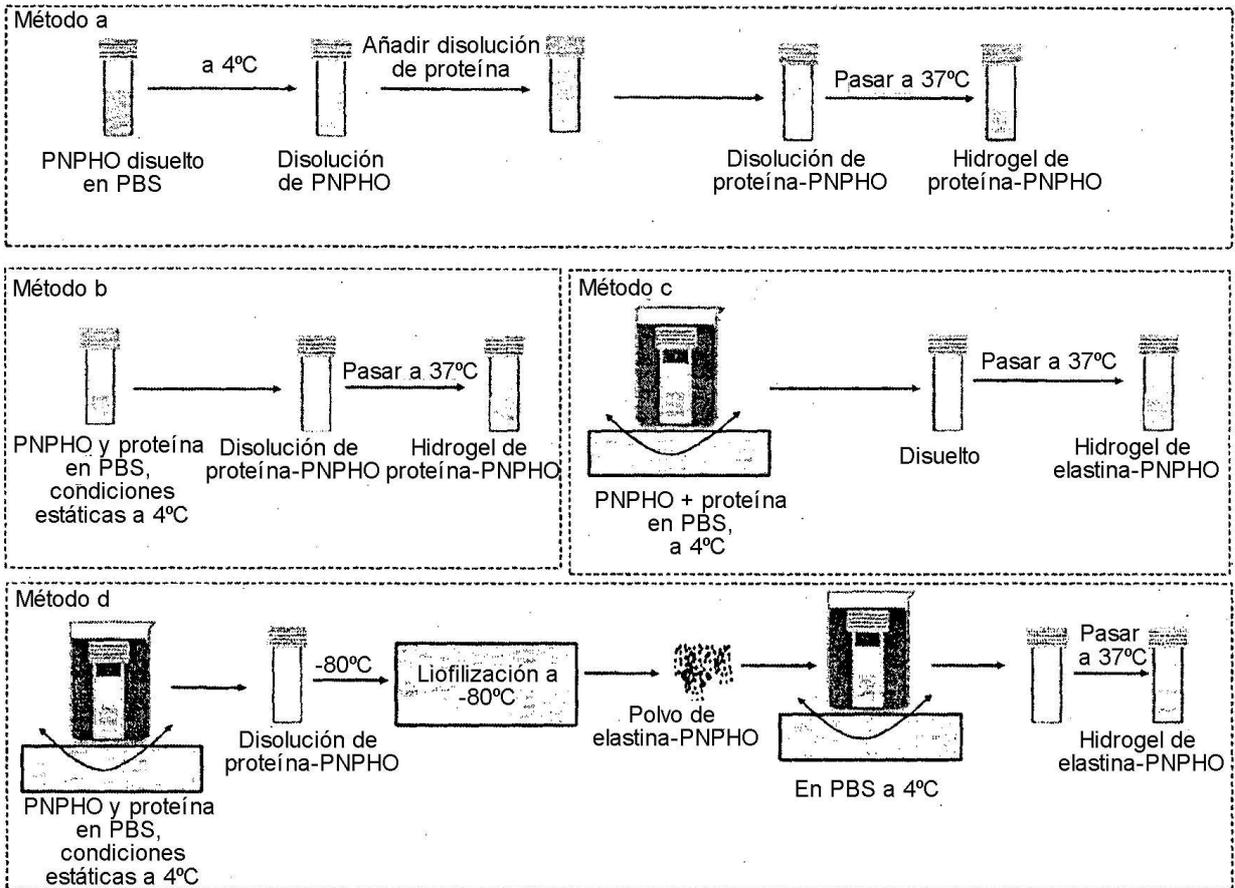


Figura 1

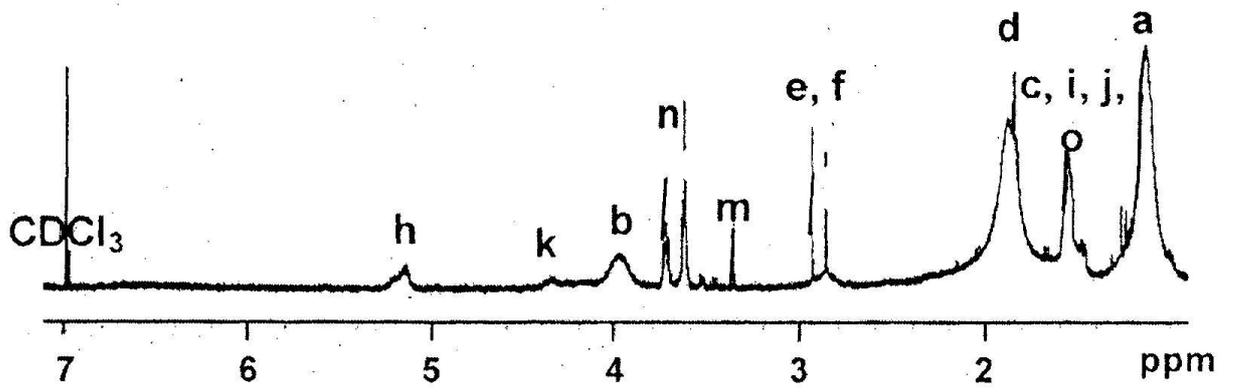


Figura 2

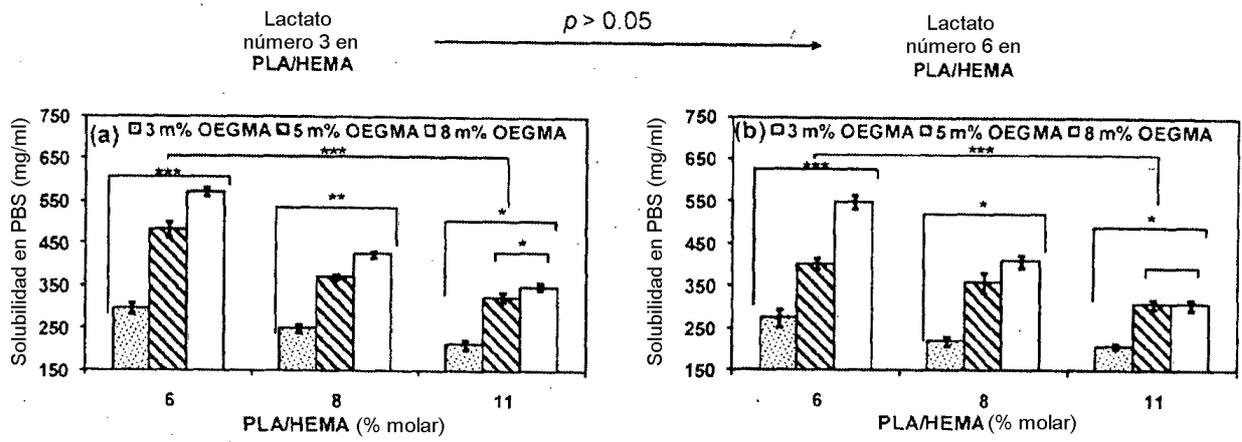


Figura 3

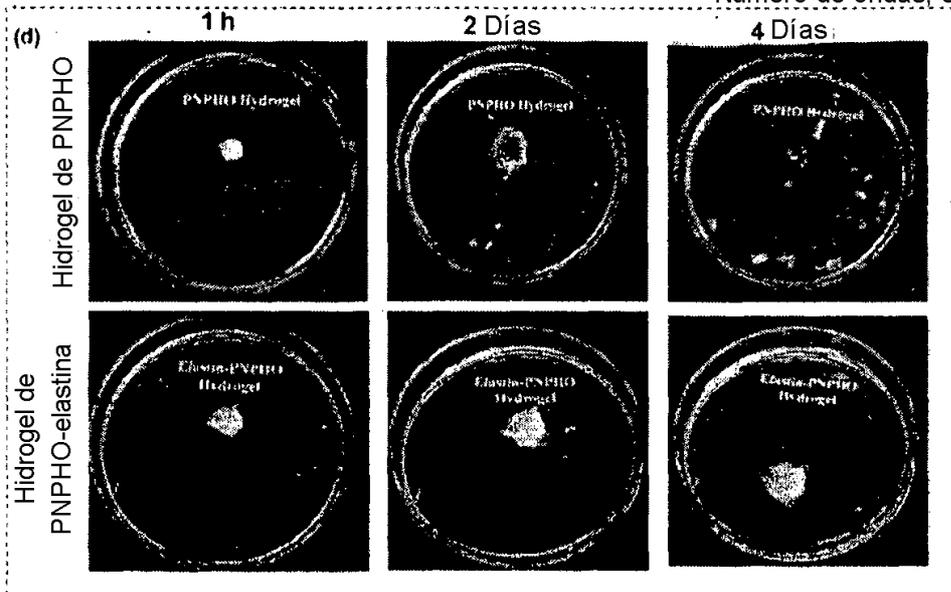
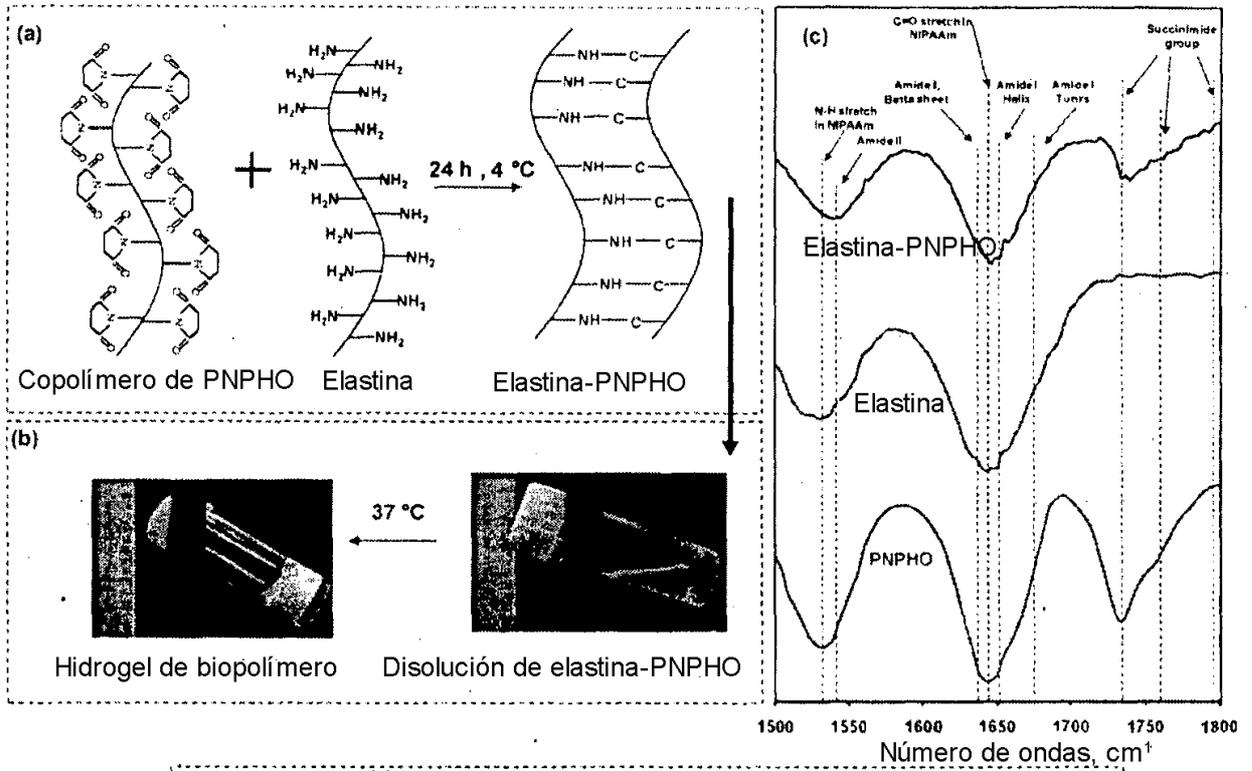


Figura 4

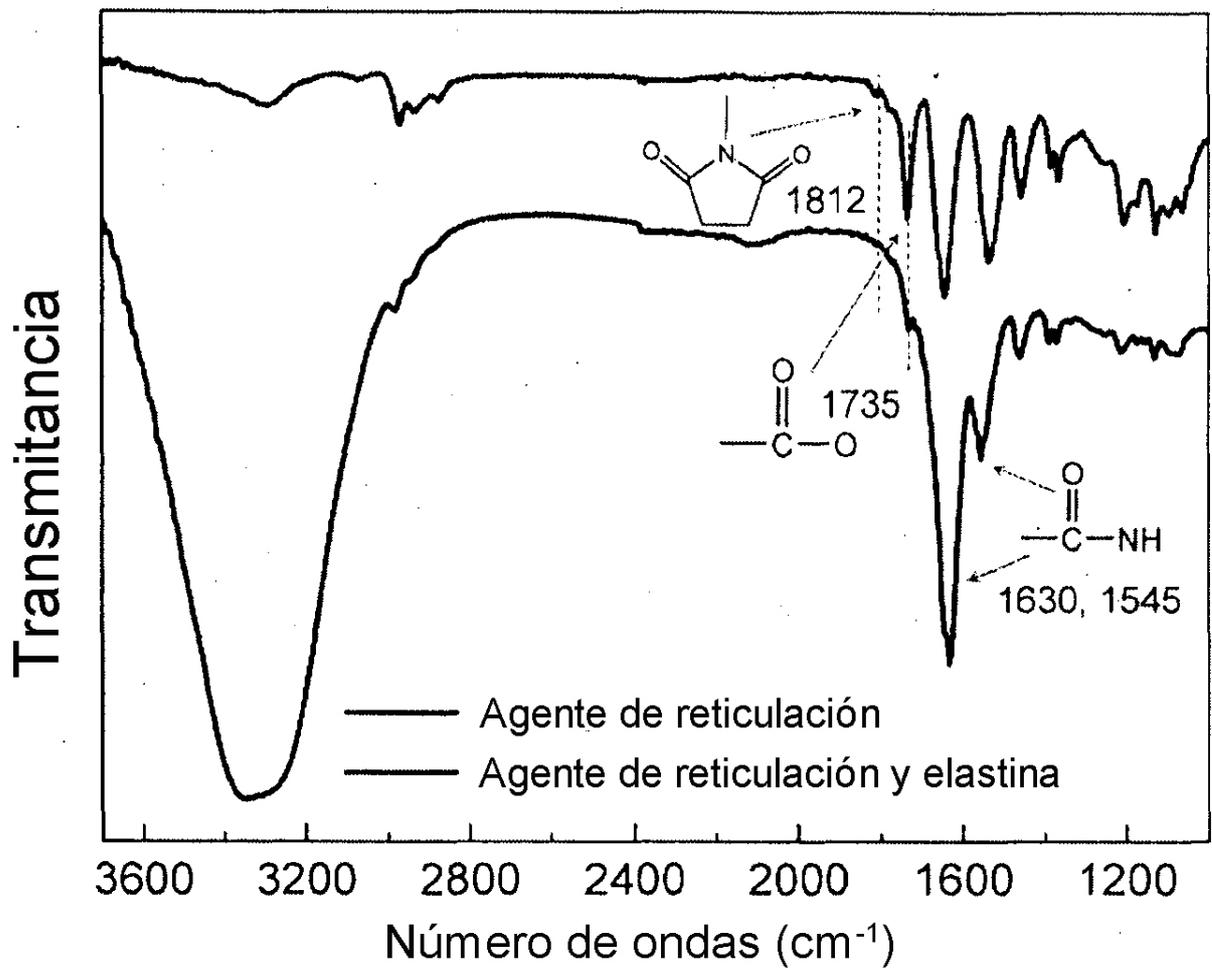
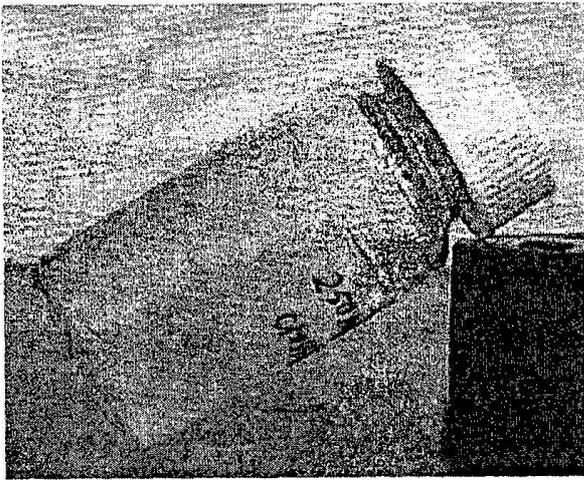
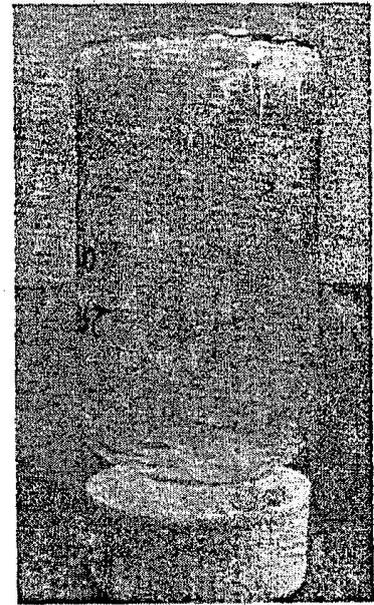


Figura 5



Disolución mixta de agente de reticulación y colágeno que puede fluir a 4°C

37°C



Gelificación

Figura 6

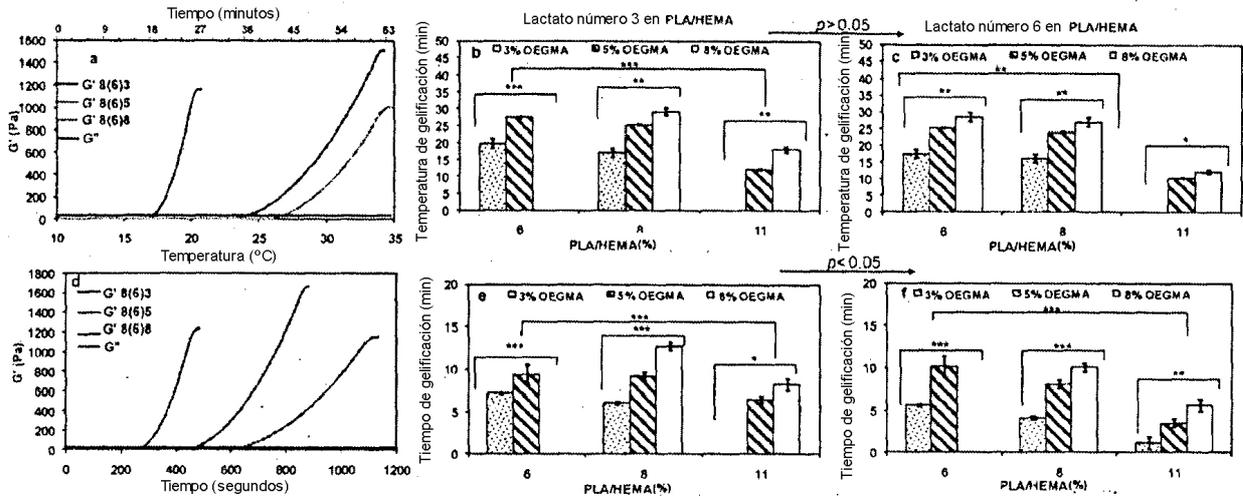


Figura 7

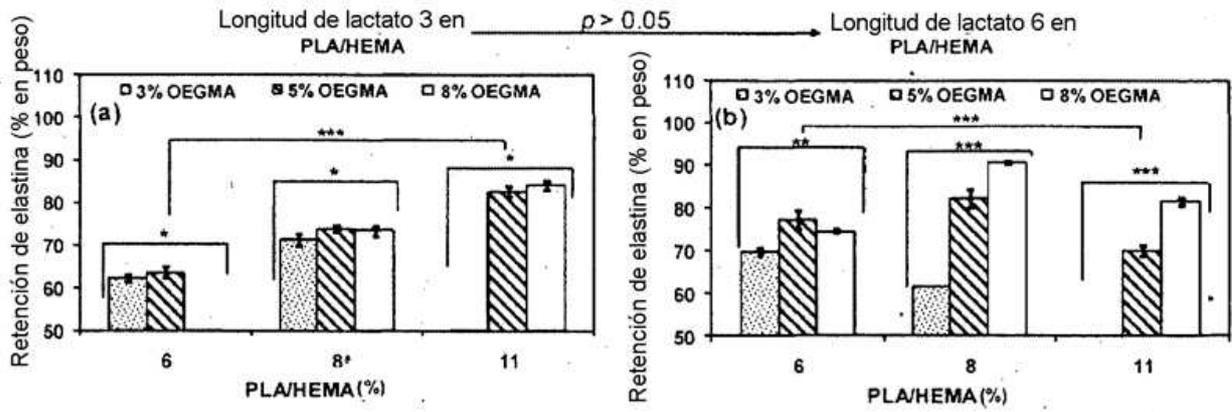


Figura 8

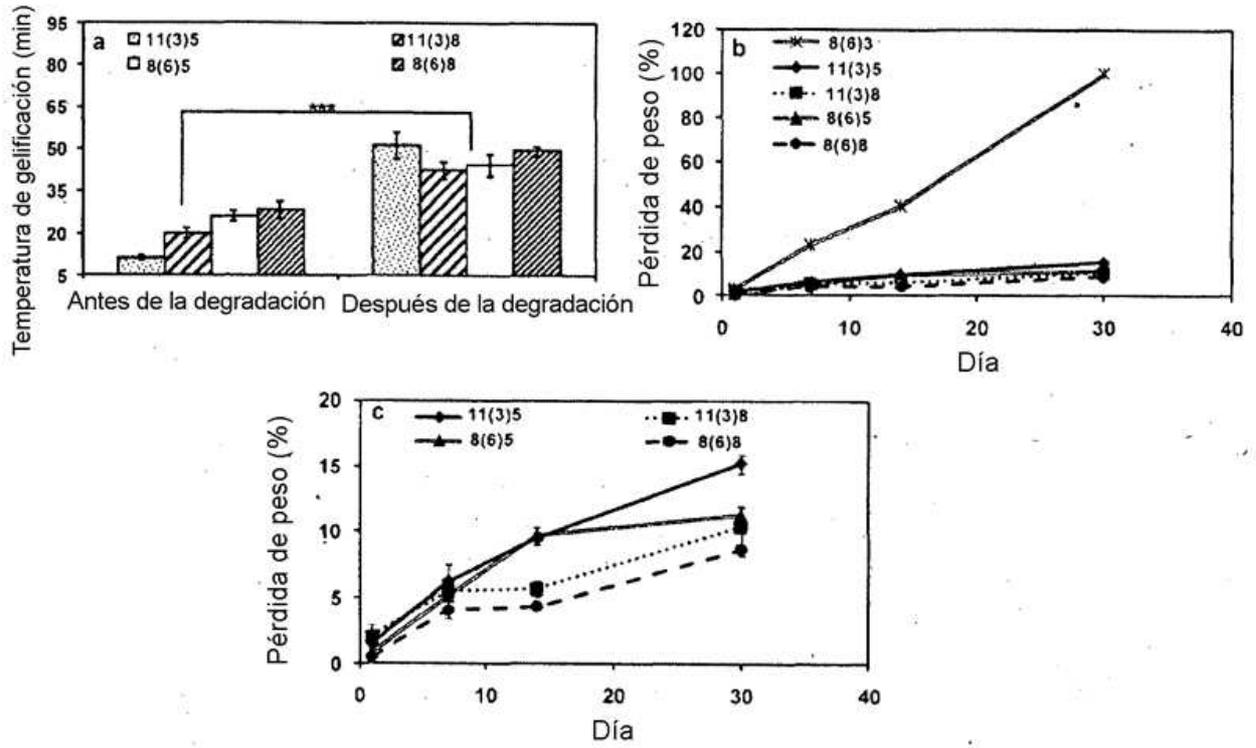


Figura 9

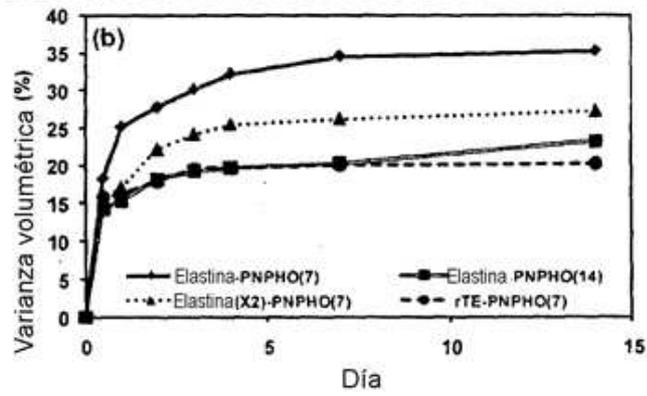
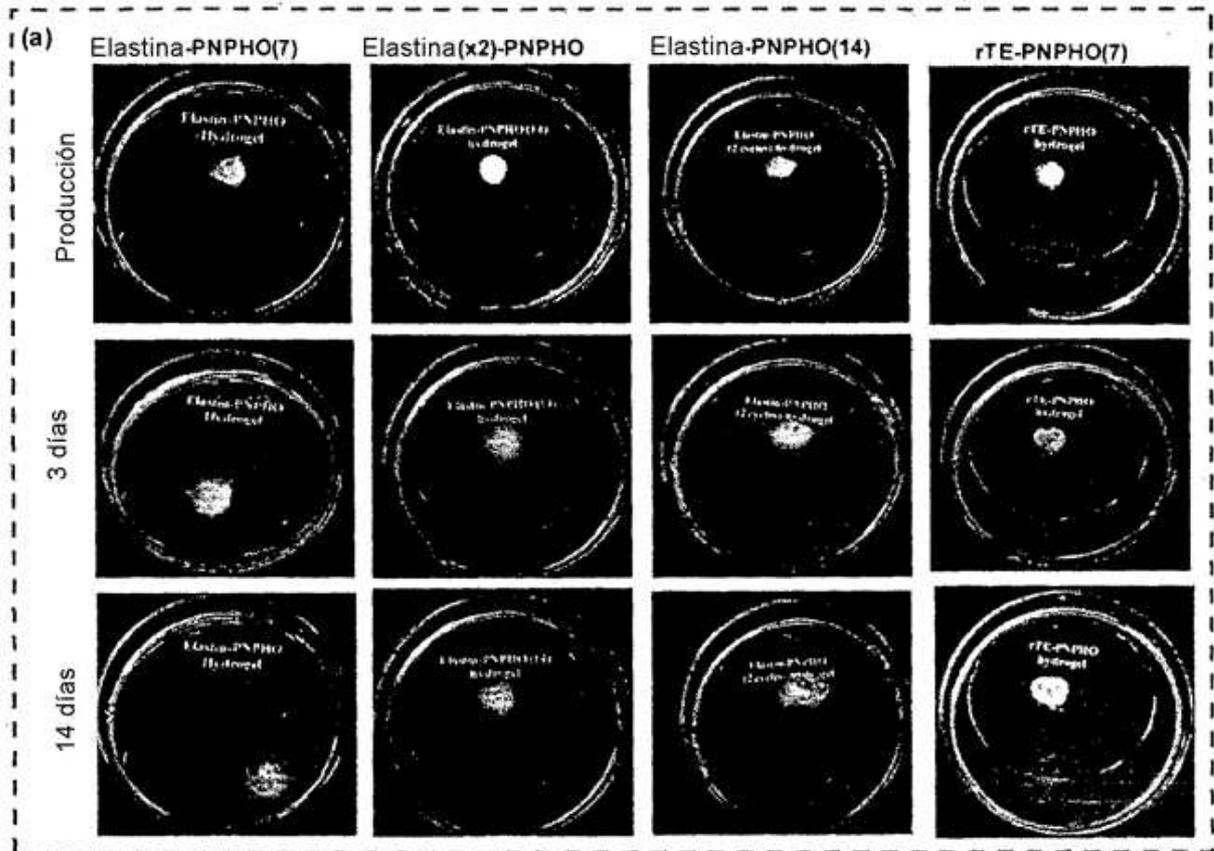


Figura 10

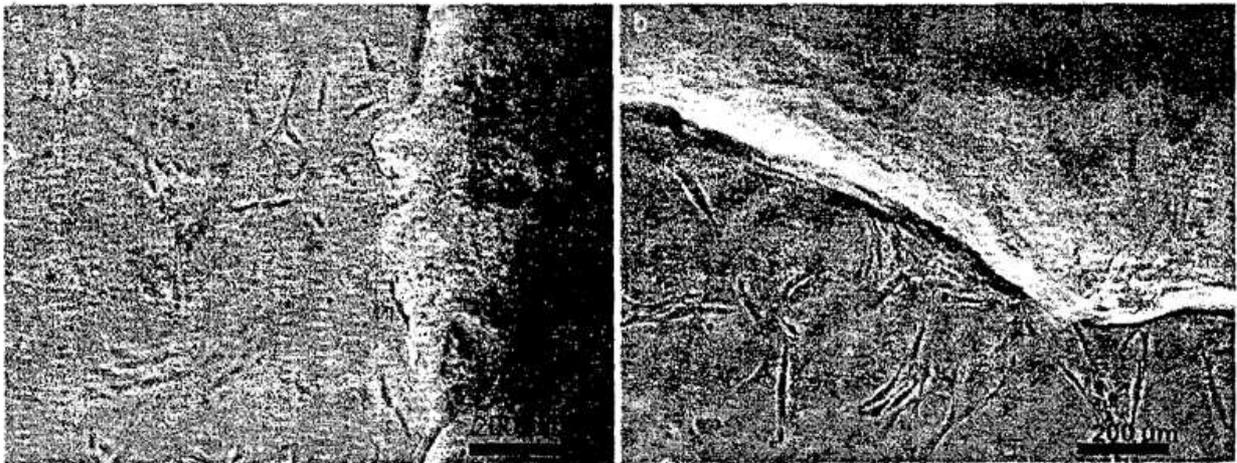


Figura 11

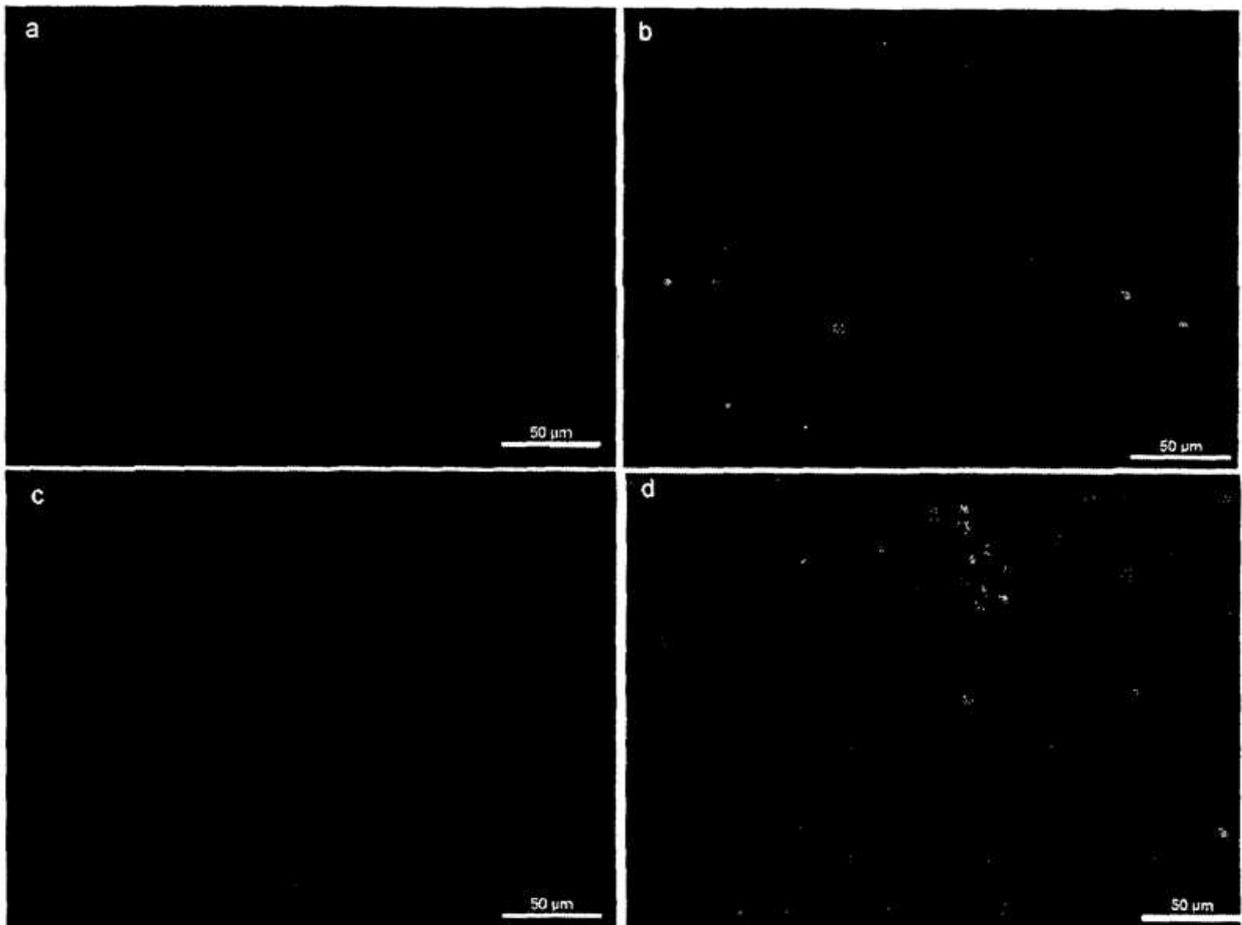


Figura 12

Figura 13 (a)

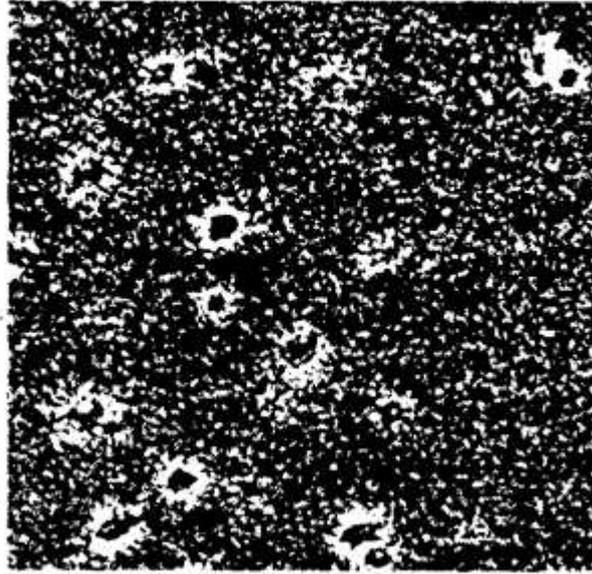


Figura 13 (b)

