

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 510**

51 Int. Cl.:

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2008 PCT/IL2008/000521**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2008 WO08126092**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2008 E 08738223 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2150282**

54 Título: **Composiciones y procedimientos de formación de andamios**

30 Prioridad:

16.04.2007 US 907765 P

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

14.06.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SELIKTAR, DROR y
GONEN-WADMANY, MAYA**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 672 510 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos de formación de andamios

5 **Campo y antecedentes de la invención**

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a un andamio que comprende una proteína reticulada por un polímero sintético, y más particularmente, pero no exclusivamente, a procedimientos de generación y uso de los mismos en ingeniería de tejidos.

10

La ingeniería de tejidos, es decir, la generación de nuevos tejidos vivos *in vitro*, se usa ampliamente para reemplazar tejidos enfermos, traumatizados u otros tejidos no saludables. El enfoque clásico de ingeniería de tejidos utiliza células vivas y un andamio básico para el cultivo celular. Por lo tanto, la estructura del andamio intenta imitar la estructura natural del tejido que está reemplazando y proporcionar un soporte funcional temporal para las células.

15

Los andamios de ingeniería de tejidos se fabrican a partir de materiales biológicos o materiales sintéticos, tales como polímeros. Materiales sintéticos como polietilenglicol (PEG), hidroxiapatita/policaprolactona (HA/PLC), ácido poliglicólico (PGA), ácido poli-L-láctico (PLLA), polimetilmetacrilato (PMMA), polihidroxialcanoato (PHA), poli-4-hidroxitirato (P4HB), fumarato de polipropileno (PPF), polietilenglicoldimetacrilato (PEG-DMA), beta-fosfato tricálcico (beta-TCP) y politetrafluoroetileno (PTFE) proporcionan un control preciso sobre las propiedades mecánicas del material [Drury y Mooney (2003)]

20

Los procedimientos de fabricación de andamios comunes se basan en espumas de polímeros sintéticos. Sin embargo, la migración celular en la profundidad de los andamios sintéticos está limitada por la falta de suministro de oxígeno y nutrientes. Para superar tales limitaciones, se han desarrollado nuevos enfoques que utilizan fabricaciones sólidas de forma libre y arquitectura vascular interna [Sachlos y Czernuszka (2003)]. Del mismo modo, los procedimientos de liofilización también se emplean para crear arquitecturas tridimensionales únicas con distinta porosidad y permeabilidad.

25

30

Los andamios hechos de PEG son altamente biocompatibles [Merrill y Salzman (1983)] y exhiben características físicas versátiles basadas en su porcentaje en peso, longitud de cadena molecular y densidad de reticulación [Temenoff *et al.* (2002)]. Además, los hidrogeles de PEG son capaces de una transición controlada de líquido a sólido (gelificación) en presencia de una suspensión celular [Elbert y Hubbell (2001)]. Además, la reacción de gelificación de PEG (es decir, PEGilación) se puede llevar a cabo en condiciones no tóxicas en presencia de un fotoiniciador [Elisseeff *et al.* (2000); Nguyen y West (2002)] o mezclando una solución reactiva de dos partes de PEG funcionalizado y constituyentes de reticulación [Lutolf y Hubbell (2003)].

35

Se está desarrollando una gama de productos de ingeniería de tejidos basados en andamios de colágeno, algunos de los cuales han llegado al mercado. Por ejemplo, se han usado geles de colágeno sembrados con fibroblastos como la capa "dérmica" de la piel artificial vendida con el nombre comercial APLIGRAFT (Sandoz AG, Basilea, Suiza), y se han usado esponjas de colágeno como portador osteoconductor de proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2) para la fusión de la columna y el tratamiento de fracturas de huesos largos.

40

Los biomateriales basados en colágeno se han formado en fibras, películas, láminas, esponjas y dispersiones de fibrillas. Muchas de estas formas podrían usarse potencialmente como andamios de ingeniería de tejidos en la reparación o el aumento del tejido corporal.

45

Los geles de colágeno están hechos a partir de una red de fibrillas que exhiben una resistencia física pobre y una porosidad de tejido superfisiológica. La conformación específica de fibrillas combinada con la estructura de poros abiertos de la red interpenetrante deja fácilmente accesible la estructura fundamental de proteínas y es susceptible de difundir libremente las proteasas del tejido huésped o sistema de cultivo celular circundante. Esto a menudo resulta en un deterioro incontrolado y prematuro del andamio en presencia de proteasas secretadas por células [Hubbell (2003); Friess (1998); Nicolas y Gagnieu (1997)]. Las discrepancias en la estructura y la susceptibilidad proteolítica de los hidrogeles proteicos reconstituidos en comparación con los tejidos naturales aún dejan mucho que desear a partir de los sistemas de andamios biológicos en muchas aplicaciones prácticas de ingeniería de tejidos.

50

55

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

60

65

Los geles de colágeno y fibrina también se pueden procesar por liofilización para aumentar la resistencia a la tracción y el módulo de la red de proteínas [Schoof *et al.* (2001); Buttafoco *et al.* (2006); Pieters *et al.* (2002)]. Fortier y colaboradores describieron un proceso de una sola etapa para generar un andamio que comprende albúmina y polietilenglicol, que tiene una enzima inmovilizada [Jean-Francois y Fortier (1996); Jean-Francois *et al.* (1997); Gayet y Fortier (1995); D'Urso *et al.* (1995)].

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

El documento WO 2005/061018 divulga un andamio que comprende una proteína de origen natural tal como fibrinógeno reticulado por PEG, uniendo moléculas de PEG modificadas a residuos de cisteína de la proteína.

Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición de materia que comprende una molécula precursora de proteína de polímero que comprende una proteína tiolada y al menos dos polímeros sintéticos unidos covalentemente a grupos tiol de la proteína tiolada, teniendo cada uno de los al menos dos polímeros sintéticos un grupo funcional, el grupo funcional seleccionado es capaz de formar retícula con un grupo funcional de al menos otro polímero sintético, formando dicho al menos otro polímero sintético una parte de al menos otra molécula precursora de proteína de polímero que comprende una proteína tiolada y al menos dos polímeros sintéticos unidos covalentemente a dichos grupos tiol de dicha proteína tiolada, formando dicha reticulación un andamio.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un andamio formado por reticulación de una composición de materia descrita anteriormente.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un andamio que comprende una pluralidad de proteínas tioladas y una pluralidad de polímeros sintéticos unidos covalentemente a grupos tiol de la proteína tiolada, estando cada una de las proteínas tioladas unidas covalentemente al menos a dos de los polímeros sintéticos, en los que los polímeros sintéticos están reticulados.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un hidrogel formado a partir de un andamio descrito anteriormente.

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

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una composición de materia, andamio o hidrogel descrito anteriormente para su uso en la reparación del daño tisular.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el daño tisular está asociado con un trastorno seleccionado del grupo que consiste en cirrosis hepática, diabetes tipo 1, fibrosis quística, cáncer de hueso, reparación de quemaduras y heridas, degeneración macular relacionada con la edad, cicatrización, infarto de miocardio, reparación del miocardio, lesiones del SNC, defecto del cartílago articular, degeneración de la vejiga y degeneración intestinal.

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

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el daño tisular es cosmético.

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

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

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para generar un andamio fuera de un cuerpo, comprendiendo el procedimiento:

- (a) tiolar una proteína con un reactivo de tiolación, para obtener de este modo una proteína tiolada;
- (b) unir covalentemente una proteína tiolada al menos a dos polímeros sintéticos a través de un primer grupo funcional de al menos dos polímeros sintéticos, en el que el primer grupo funcional se une a un grupo tiol de la proteína tiolada, teniendo cada uno de los al menos dos polímeros sintéticos un segundo grupo funcional, para obtener de este modo una molécula precursora de proteína de polímero; y posteriormente

(c) reticular una pluralidad de las moléculas precursoras para generar de este modo el andamio, por medio de lo cual se excluyen los procedimientos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.

- 5 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el procedimiento descrito anteriormente comprende además combinar células vivas con las moléculas precursoras de proteína de polímero antes de la etapa (c), para obtener de este modo un andamio que comprende células vivas incrustadas en el mismo.
- 10 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el procedimiento descrito anteriormente comprende además eliminar la forma no conjugada del polímero sintético antes de la etapa (c).
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el procedimiento descrito anteriormente comprende además eliminar la forma no conjugada del polímero sintético antes de la etapa (b).
- 15 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el primero y segundo grupos funcionales son idénticos.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el primero y segundo grupos funcionales se seleccionan del grupo que consiste en acrilato y vinilsulfona.
- 20 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, los polímeros sintéticos comprenden PEG que tiene de 2 a 8 grupos acrilato.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la proteína tiolada comprende residuos de lisina tiolada.
- 25 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la proteína se selecciona del grupo que consiste en una proteína de señalización celular, una proteína de matriz extracelular, una proteína de adhesión celular, un factor de crecimiento y una proteasa.
- 30 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la proteína comprende menos de 5 residuos de cisteína por cada 100 residuos de aminoácidos.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la proteína es colágeno.
- 35 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la proteína está desnaturalizada.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el andamio comprende al menos 0,4% de proteína en peso seco.
- 40 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el andamio o hidrogel descrito anteriormente en la presente comprende además células vivas incorporadas en el mismo.
- 45 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el polímero sintético se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), policaprolactona (PLC), ácido poliglicólico (PGA), ácido poli-L-láctico (PLLA), polimetilmetacrilato (PMMA), polihidroxiacanoato (PHA), poli-4-hidroxibutirato (P4HB), fumarato de polipropileno (PPF) y politetrafluoroetileno (PTFE) y copolímeros de los mismos.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el polímero sintético es PEG.
- 50 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el PEG tiene un peso molecular en el intervalo de 4 kDa a 20 kDa.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el grupo funcional seleccionado es capaz de formar retícula con un grupo funcional de al menos otro polímero sintético mediante polimerización en cadena.
- 55 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el andamio es biodegradable.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, una concentración de la composición de materia está en un intervalo de 1 mg/ml a 200 mg/ml.
- 60 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la reticulación se realiza mediante iluminación ultravioleta.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la reticulación comprende además añadir un fotoiniciador.
- 65 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la reticulación comprende además reticular una pluralidad de las moléculas precursoras con una pluralidad de polímeros sintéticos, teniendo cada uno de los polímeros

sintéticos al menos dos grupos funcionales, los grupos funcionales seleccionados son capaces de formar retícula con un grupo funcional de las moléculas precursoras.

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

10 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y/o científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece la invención. Los procedimientos y/o materiales a modo de ejemplo se describen a continuación. En caso de conflicto, la especificación de la patente, incluidas las definiciones, será la que prevalezca. Además, los ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser necesariamente limitantes.

Breve descripción de los dibujos

15 Algunas realizaciones de la invención se describen en la presente, a modo de ejemplo solamente, con referencia a las imágenes adjuntas. Con referencia específica ahora a las imágenes en detalle, se destaca que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y para los fines de una discusión ilustrativa de las realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada junto con las imágenes hace evidente para los expertos en la técnica cómo pueden llevarse a la práctica las realizaciones de la invención.

20 En las imágenes:

25 La Figura 1 muestra imágenes que presentan los resultados de la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de colágeno tiolado PEGilado y no PEGilado, albúmina (comparativa, que no forma parte de la invención) y fibrinógeno (comparativo, que no forma parte de la invención); el carril "a" muestra proteína PEGilada y el carril "b" muestra proteína no PEGilada.

30 La Figura 2 presenta un gráfico que muestra el módulo de almacenamiento (G') de albúmina PEGilada (PEG-Alb) (comparativa, que no forma parte de la invención), fibrinógeno PEGilado (PEG-Fib) (comparativo, que no forma parte de la invención) y colágeno tiolado PEGilado (PEG-Col) en función del tiempo, antes y durante la iluminación ultravioleta (UV).

35 La Figura 3 presenta un gráfico que muestra la degradación de hidrogeles de albúmina PEGilada (PEG-Alb) (comparativa, que no forma parte de la invención), de fibrinógeno PEGilado (PEG-Fib) (comparativo, que no forma parte de la invención) y de colágeno tiolado PEGilado (PEG-Col) en función del tiempo en una solución de colagenasa.

40 Las Figuras 4A-F presentan micrografías de contraste de fase de células de músculo liso en hidrogeles de albúmina PEGilada (comparativa, que no forma parte de la invención) (Figuras 4A y 4B), de colágeno tiolado PEGilado (Figuras 4C y 4D) y de fibrinógeno PEGilado (comparativo, que no forma parte de la invención) (Figuras 4E y 4F), 2 horas (Figuras 4A, 4C y 4E) y 24 horas (Figuras 4B, 4D y 4F) después de sembrar células en hidrogeles; la diseminación parcial 2 horas después de la siembra (Figuras 4C y 4E) y la dispersión completa 24 horas después de la siembra (Figuras 4D y 4F) se observa en hidrogeles tiolados de colágeno y fibrinógeno (comparativos, que no forman parte de la invención) mientras que no se observa diseminación en hidrogel de albúmina (comparativo, que no forma parte de la invención); las barras de escala son iguales a 500 µm.

50 Las Figuras 5A-I presentan micrografías de contraste de fase de células de músculo liso encapsuladas dentro de hidrogeles de albúmina PEGilada (comparativa, que no forma parte de la invención) (Figuras 5A-C), de colágeno tiolado PEGilado (Figuras 5D-F) y de fibrinógeno PEGilado (comparativo, que no forma parte de la invención) (Figuras 5G-I), que muestran células redondeadas inmediatamente después de sembrar células dentro de hidrogeles (Figuras 5A, 5D y 5G); las células con algunas extensiones se observan 4 horas después de la siembra (Figuras 5E y 5H), y las células completamente extendidas y altamente fusiformes se observan 24 horas después de la siembra (Figuras 5G y 5I) en hidrogeles tiolados de colágeno y fibrinógeno mientras que las células en hidrogel de albúmina (comparativo, que no forma parte de la invención) permanecen redondeadas; las barras de escala son iguales a 500 µm.

60 Las Figuras 6A-C presentan micrografías de contraste de fase (Figuras 6A y 6B) y un gráfico (Figura 6C) que muestra la invasión de células de músculo liso de tejido denso (oscuro) en colágeno tiolado PEGilado (PEG-Col), fibrinógeno PEGilado (comparativo, que no forma parte de la invención) (PEG-Fib) y albúmina PEGilada (comparativa, que no forma parte de la invención) (hidrogeles de PEG-Alb) (transparente); la Figura 6A muestra un aumento gradual en la distancia cubierta por células de músculo liso invasoras en el transcurso de 5 días (barras de escala iguales a 500 µm); La Figura 6B muestra imágenes de gran aumento de áreas invadidas en hidrogeles tiolados de colágeno y fibrinógeno (barras de escala iguales a 100 µm); La Figura 6C presenta un gráfico de las distancias cubiertas por células de músculo liso invasoras en hidrogeles tiolados de colágeno y fibrinógeno en función del tiempo.

65

Descripción de realizaciones específicas de la invención

5 La presente invención se refiere a un andamio que comprende una proteína reticulada por un polímero sintético, y más particularmente, pero no exclusivamente, a procedimientos de generación y uso del mismo tal como en la ingeniería de tejidos.

10 Los principios y el funcionamiento del procedimiento para generar un andamio de acuerdo con la presente invención se pueden entender mejor con referencia a los dibujos y a sus descripciones acompañantes.

15 Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles ejemplificados por los Ejemplos.

20 Mientras se reduce la presente invención a la práctica, los presentes inventores pudieron, a través de una laboriosa experimentación, sintetizar andamios híbridos biosintéticos compuestos de una estructura fundamental tiolada de colágeno o albúmina (comparativa, que no forma parte de la invención) con cadenas laterales funcionales de polietilenglicol (PEG). Estos andamios son andamios excelentes y biodegradables y se pueden utilizar en diversas aplicaciones clínicas y de investigación.

25 Como se muestra más adelante en la sección de Ejemplos, los presentes inventores generaron moléculas precursoras de PEG-colágeno y PEG-albúmina (comparativas, que no forman parte de la invención) que se usaron adicionalmente para formar andamios de hidrogel. Las moléculas precursoras pueden convertirse rápidamente en un hidrogel (Figura 2) y son biodegradables (Figura 3). Los andamios de PEG-colágeno exhiben un fuerte soporte para la extensión y propagación celular (Figuras 4C-D, 5D-F y 6A-C), mientras que los andamios de PEG-albúmina (comparativos, que no forman parte de la invención) exhiben resistencia a la extensión y propagación celular (Figuras 4A-B, 5A-C y 6A). La variedad de propiedades exhibidas permite seleccionar hidrogeles apropiados para fines particulares, así como combinar diferentes tipos de moléculas precursoras para obtener hidrogeles con propiedades intermedias.

30 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de las realizaciones de la presente invención, se proporciona una molécula precursora de proteína de polímero capaz de formar retícula con al menos otra molécula precursora de proteína de polímero para formar un andamio.

35 De acuerdo con la presente invención, la molécula precursora de proteína de polímero comprende una proteína tiolada y al menos dos polímeros sintéticos unidos covalentemente a grupos tiol de la proteína tiolada, teniendo cada uno de los al menos dos polímeros sintéticos en un grupo funcional, el funcional grupo seleccionado es capaz de formar retícula con un grupo funcional de al menos otro polímero sintético unido covalentemente a una proteína tiolada de al menos otra molécula precursora de proteína de polímero para formar un andamio.

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

45 Diversos expertos en la técnica conocerán diversos procedimientos de tiolación de una proteína. En una realización ejemplar, los residuos de lisina de la proteína se tiolan mediante unión covalente a un resto (por ejemplo, HS-CH₂-C(=O)-) que comprende un grupo tiol. Los grupos amina de residuos de lisina son particularmente adecuados para reaccionar con un resto que comprende un grupo tiol, por ejemplo, mediante reacción nucleofílica con un reactivo de tiolación. Como ejemplo, la tiolación de colágeno con acetiltioacetato de succinimidilo (SATA) se demuestra en los Ejemplos a continuación (en la sección titulada "Tiolación de colágeno y PEGilación").

50 Como se usa en la presente memoria, el término "tiol" se refiere a un grupo -SH.

55 Como se usa en la presente memoria, un resto que se dice que está unido a un grupo tiol describe un -S-M, en el que M es el resto unido a un grupo tiol.

60 Como se usa en la presente memoria, el término "proteína" abarca cualquier polipéptido natural que comprende al menos 10 residuos peptídicos, así como fragmentos biológicamente activos de los mismos (por ejemplo, fragmentos que inducen adhesión celular y/o señalización celular). Los fragmentos biológicamente activos se pueden generar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica (por ejemplo, escisión por una enzima y/o un reactivo químico).

65 La tiolación de una proteína es particularmente adecuada para producir la composición de materia mencionada anteriormente cuando la proteína tiene un bajo contenido de cisteína, ya que una proteína no proteica con un bajo contenido de cisteína típicamente tiene pocos grupos tiol. La introducción de grupos tiol adicionales

mediante la tiolación de la proteína crea sitios adicionales disponibles para unir polímeros sintéticos. Las proteínas que tienen poca o ninguna cisteína (por ejemplo, el colágeno) hasta ahora no han sido adecuadas para su inclusión en moléculas precursoras de proteína de polímero que comprenden polímeros sintéticos unidos a residuos de cisteína de la proteína. Dado que muchas proteínas tienen un bajo contenido de cisteína, la tiolación de una proteína supera un grave inconveniente para las moléculas precursoras de proteína de polímero.

Opcionalmente, la proteína a tiolar comprende menos de 5 residuos de cisteína por cada 100 residuos de aminoácidos. Opcionalmente, la proteína comprende menos de 3 residuos de cisteína por cada 100 residuos de aminoácidos, opcionalmente menos de 2 residuos de cisteína por cada 100 residuos de aminoácidos, y opcionalmente menos de 1 residuo de cisteína por cada 100 residuos de aminoácidos.

De acuerdo con una realización opcional de la presente invención, la proteína a tiolar se selecciona del grupo que consiste en una proteína de señalización celular, una proteína de matriz extracelular, una proteína de adhesión celular, un factor de crecimiento y una proteasa.

De acuerdo con una realización opcional de la presente invención, la proteína tiolada es colágeno tiolado.

De acuerdo con una realización opcional de la presente invención, la proteína tiolada está desnaturalizada.

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

Las proteínas pueden desnaturalizarse por diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las proteínas pueden desnaturalizarse mediante calentamiento o exposición a agentes desnaturalizantes tales como urea o cloruro de guanidinio. Como se ejemplifica a continuación, la proteína puede desnaturalizarse en una solución que comprende 8 M de urea.

El término "polímero" se refiere a una molécula compuesta principalmente de una pluralidad de unidades repetitivas. La frase "polímero sintético" se refiere a cualquier polímero que está hecho de un material sintético, es decir, un material no natural y no celular.

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

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

Debe entenderse que los nombres de los polímeros mencionados anteriormente se refieren a las unidades repetitivas que constituyen la mayoría de la estructura de los polímeros sintéticos, y no están destinados a excluir la presencia de grupos funcionales adicionales en el polímero sintético. Por lo tanto, por ejemplo, un polímero sintético que consiste en polietilenglicol con dos grupos acrilato (es decir, PEG-diacrilato) está abarcado en la presente memoria por los términos "polietilenglicol" y "PEG".

Los ejemplos de grupos funcionales capaces de reticulación incluyen, sin limitación, acrilato y vinilsulfona.

Los procedimientos para preparar moléculas de PEG funcionalizadas son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la PEG-vinilsulfona puede prepararse opcionalmente en argón haciendo reaccionar una solución de diclorometano (DCM) del PEG-OH con NaH y luego con divinilsulfona (opcionalmente en relaciones molares: OH1:NaH5:divinilsulfona 50, y con 0,2 gramos de PEG por ml de DCM). El PEG-Ac puede prepararse opcionalmente en argón haciendo reaccionar una solución de DCM del PEG-OH con cloruro de aciloilo y trietilamina (opcionalmente a relaciones molares: OH1:cloruro de aciloilo 1,5:trietilamina 2, y con 0,2 gramos de PEG por ml de DCM).

De acuerdo con una realización opcional de la presente invención, el grupo funcional del polímero sintético es capaz de formar retícula con un grupo funcional de al menos otro polímero sintético mediante polimerización en cadena.

Como se usa en la presente memoria, la frase "polimerización en cadena" describe la unión entre sí de una pluralidad (opcionalmente al menos 10) de monómeros insaturados y/o cíclicos. La polimerización en cadena de

monómeros insaturados resulta en la sustitución de enlaces insaturados por enlaces que unen los monómeros. La polimerización en cadena de monómeros cíclicos saturados resulta en la apertura del anillo de los monómeros cíclicos.

5 En el contexto de las realizaciones de la presente invención, los monómeros capaces de experimentar polimerización en cadena son grupos funcionales del polímero sintético descrito anteriormente, por medio de lo cual la polimerización de grupos funcionales reticula los polímeros sintéticos que comprenden los grupos funcionales y, por consiguiente, las moléculas precursoras de proteína de polímero que comprenden los polímeros sintéticos.

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

15 Así, por ejemplo, el PEG lineal puede unirse a una proteína tiolada en un extremo y unirse en el otro extremo a un grupo acrilato (por ejemplo, $-\text{OC}(=\text{O})-\text{CH}=\text{CH}_2$). El PEG ramificado de 4 brazos se puede unir en un extremo a una proteína tiolada, y se puede unir en los otros 3 extremos a grupos de acrilato. El PEG ramificado con 8 brazos puede unirse a un extremo a una proteína tiolada y unirse a los otros 7 extremos a grupos de acrilato. Por lo tanto, las moléculas de PEG que tienen de 2 a 8 extremos son particularmente adecuadas para comprender de 1 a 7 grupos funcionales.

Como se describió anteriormente, las composiciones de materia de las realizaciones de la presente invención son capaces de formar reticula para formar un andamio.

25 Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de las realizaciones de la presente invención, se proporciona un andamio que comprende proteína unida covalentemente a polímeros sintéticos reticulados. Opcionalmente, el andamio comprende más de un tipo de proteína y/o más de un tipo de polímero sintético.

30 De acuerdo con una realización opcional de la presente invención, el andamio comprende una pluralidad de proteínas tioladas y una pluralidad de polímeros sintéticos unidos covalentemente a grupos tiol de la proteína tiolada, estando cada una de las proteínas tioladas unidas covalentemente al menos a dos de los polímeros sintéticos, en los que los polímeros sintéticos están reticulados.

35 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un andamio formado por reticulación de una composición de materia descrita anteriormente.

40 Como se usa en la presente memoria, la frase "andamio" se refiere a un armazón de soporte bidimensional o tridimensional. Al controlar la reticulación, el andamio de la presente invención puede formar una estructura bidimensional o tridimensional en cualquier tamaño, estructura o porosidad. El andamio de la presente invención se puede incrustar dentro de, o formarse alrededor de, otro andamio o gel, o se puede unir a materiales adicionales para formar un andamio híbrido o recubierto.

45 En algunas realizaciones de la presente invención, el andamio de la presente invención se puede usar para soportar el crecimiento celular, la unión, la diseminación y, de este modo, facilitar el crecimiento celular, la regeneración del tejido y/o la reparación del tejido.

En realizaciones alternativas de la presente invención, el andamio puede usarse como un adhesivo, y de este modo facilitar la reparación del tejido. Opcionalmente, el adhesivo no es compatible con el crecimiento celular.

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

55 Como se usa en la presente memoria, los términos "biodegradable" y "biodegradabilidad" se refieren a la capacidad de degradarse (es decir, descomponerse) por proteasas biológicas u otras biomoléculas. La biodegradabilidad depende de la disponibilidad de sustratos de degradación (es decir, materiales biológicos o porciones de los mismos), la presencia de materiales biodegradables (por ejemplo, microorganismos, enzimas, proteínas) y la disponibilidad de oxígeno (para organismos aeróbicos, microorganismos o porciones de los mismos), dióxido de carbono (para organismos anaeróbicos, microorganismos o porciones de los mismos) y/u otros nutrientes. Además, la biodegradabilidad de un material, tal como el andamio de la presente invención, también depende de la estructura del material y/o propiedades mecánicas, es decir, la porosidad, flexibilidad, viscosidad, densidad de reticulación, hidrofobicidad/hidrofilicidad y elasticidad que puede afectar el paso y la disponibilidad de gases y nutrientes, así como la unión y diseminación de células.

60 La biodegradabilidad del andamio se deriva, al menos en parte, de la biodegradabilidad de la proteína en el andamio, que forma la estructura principal del andamio. Como se ejemplifica más adelante en la sección de Ejemplos, la biodegradabilidad del andamio se puede determinar seleccionando una proteína que proporcione un

nivel particular de biodegradabilidad. Además, la biodegradabilidad puede determinarse seleccionando un polímero sintético biodegradable o no biodegradable. La biodegradabilidad también se ve afectada por la cantidad de moléculas sintéticas unidas a cada proteína, ya que un gran número de moléculas sintéticas unidas puede reducir la biodegradabilidad al enmascarar los sitios de escisión.

5

La biodegradabilidad de un andamio de hidrogel de las realizaciones de la presente invención se puede determinar sometiendo dichos hidrogeles a degradación enzimática usando proteasas tales como plasmina, tripsina, colagenasa, quimiotripsina y similares, como se ejemplifica más adelante en la sección de Ejemplos.

10

En general, las propiedades biológicas y mecánicas del andamio se determinarán en parte por la relación de proteína a polímero sintético en el andamio. Por ejemplo, los andamios con un alto contenido de proteína exhibirán las propiedades biológicas, tales como la señalización celular, de las proteínas contenidas en los mismos, al tiempo que conservan las propiedades mecánicas ventajosas características del polímero sintético contenido los mismos. Opcionalmente, el andamio comprende al menos 0,4% de proteína tiolada en peso seco, opcionalmente al menos 1,5%, opcionalmente al menos 4%, opcionalmente al menos 10% y opcionalmente al menos 20%. Los andamios ejemplares comprenden PEG y proteína (por ejemplo, colágeno tiolado) a una relación molar que varía de 25:1 de PEG por proteína a 300:1 de PEG por proteína.

15

20

En muchos casos, es deseable que las células vivas crezcan en el espacio ocupado por un andamio utilizado en ingeniería de tejidos. Esto se facilita al tener células vivas sembradas en el andamio. Una ventaja de las realizaciones de la presente invención es que el andamio se puede formar a partir de una fase líquida (por ejemplo, una solución de una molécula precursora de proteína de polímero), usando condiciones suaves para iniciar la reticulación. Consecuentemente, las células vivas pueden dispersarse entre las moléculas precursoras, dando como resultado un andamio que tiene células vivas incluidas en el mismo, ya que la reticulación se puede realizar con condiciones suaves que no dañan las células.

25

Por lo tanto, de acuerdo con una realización opcional de la presente invención, el andamio comprende células vivas incrustadas en el mismo. El andamio con células vivas incrustado en el mismo comprende proteína tiolada.

30

Las células ejemplares adecuadas para su inclusión en las realizaciones de la presente invención son capaces de formar un tejido, incluyendo, sin limitación, células madre tales como células madre embrionarias, células madre de la médula ósea, células sanguíneas del cordón umbilical, células madre mesenquimales, células madre de tejido adulto; o células diferenciadas tales como células neuronales, células retinianas, células epidérmicas, hepatocitos, células pancreáticas (islotes), células óseas, células cartilaginosas, células elásticas, células fibrosas, miocitos, células de miocardio, células endoteliales, células de músculo liso y células hematopoyéticas.

35

Como se usa en la presente memoria, el término "siembra" se refiere a encapsular, atrapar, distribuir en placas, colocar y/o depositar células en el andamio de la presente invención. Se apreciará que la concentración de células que se siembran en o dentro del andamio de la presente invención depende del tipo de células utilizadas y de la composición del andamio utilizado (es decir, la relación molar entre el polímero sintético y la proteína dentro de las moléculas precursoras y el porcentaje de molécula de reticulación utilizado).

40

Se apreciará que la siembra de las células se puede realizar después de la formación del andamio o hidrogel formado a partir del andamio (como se describe más adelante), o mediante la mezcla de las células con las moléculas precursoras antes de la reticulación que genera el andamio. La concentración de células a sembrar en el andamio y/o hidrogel depende del tipo de célula y las propiedades del andamio y/o hidrogel, y los expertos en la técnica son capaces de determinar una concentración adecuada de células en cada caso.

45

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

50

El andamio y/o el hidrogel pueden examinarse (por ejemplo, usando un microscopio invertido) después de la siembra, para evaluar el crecimiento celular, la diseminación y la formación de tejido, como se ejemplifica en la sección de Ejemplos.

55

Como se ejemplifica más adelante en la sección de Ejemplos, los andamios de las realizaciones de la presente invención pueden formar hidrogeles, por ejemplo, combinando el andamio con un líquido acuoso.

60

Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de las realizaciones de la presente invención, se proporciona un hidrogel formado a partir de un andamio descrito anteriormente.

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

65

Las propiedades de un hidrogel se determinarán en parte por la concentración de una composición de materia en el hidrogel. En resumen, concentraciones más altas de composición de materia dan como resultado hidrogeles

con un mayor grado de reticulación, mayor resistencia mecánica y menor porosidad, mientras que concentraciones más bajas de composición de materia dan como resultado hidrogeles con menos reticulación, menor resistencia mecánica y alta porosidad.

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

10 Como se describe en la presente memoria, y se ejemplifica más adelante en la sección de Ejemplos, las moléculas precursoras de proteína de polímero descritas anteriormente permiten generar un andamio de una manera simple y conveniente. Además, es conveniente ajustar las propiedades biológicas y mecánicas del andamio modificando la relación de proteína a polímero, la concentración de moléculas precursoras, etc., como se describe en la presente memoria.

15 Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para generar un andamio, fuera de un cuerpo, por el que se excluyen los procedimientos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia. De acuerdo con la presente invención, el procedimiento es generar un andamio fuera de un cuerpo que comprende una proteína tiolada, comprendiendo el procedimiento tiolar una proteína con un reactivo tiolador, para obtener de este modo una proteína tiolada; unir covalentemente
20 una proteína tiolada al menos a dos polímeros sintéticos a través de un primer grupo funcional de al menos dos polímeros sintéticos, en el que el primer grupo funcional se une a un grupo tiol de la proteína tiolada, teniendo cada uno de los al menos dos polímeros sintéticos un segundo grupo funcional, para obtener de este modo una molécula precursora de proteína de polímero; y reticular posteriormente una pluralidad de las moléculas precursoras para generar de este modo el andamio, por lo que se excluyen los procedimientos para el
25 tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia. Primeros grupos funcionales a modo de ejemplo (es decir, grupos capaces de unir a la proteína tiolada) incluyen, sin limitación, acrilato, aldehído, tosilo, tresilo, diclorotriazina, epóxido, succinato de succinimidilo, éster de succinimidilo, carbonato de p-nitrofenilo, carbonato de benzotriazolilo, 2,3,5-triclorofenil carbonato, carbonato de succinimidilo, piridildisulfuro, maleimida, vinilsulfona y yodoacetamida.

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

35 El primer grupo funcional debe ser capaz de unirse a la proteína, mientras que el segundo grupo funcional debe ser capaz de formar retícula con otros segundos grupos funcionales. Por lo tanto, cualquier grupo funcional capaz tanto de unirse a una proteína tiolada, como de formar retícula con grupos similares, puede usarse como el primer grupo funcional y el segundo grupo funcional. Los ejemplos de grupos incluyen, sin limitación, acrilato y vinilsulfona. Así, por ejemplo, el doble enlace de acrilato y vinilsulfona se puede unir a la proteína tiolada (por ejemplo, a un grupo tiol de la proteína) mediante una reacción de adición tipo Michael, y se puede reticular con el
40 doble enlace de otros grupos funcionales por polimerización en cadena.

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

45 Los procedimientos descritos anteriormente se pueden llevar a cabo opcionalmente de modo que se maximice el porcentaje de polímeros sintéticos unidos a la proteína (es decir, proteína tiolada) en un único sitio, y el porcentaje de polímeros sintéticos unidos a la proteína en más de un sitio está minimizado. Esto se puede lograr, por ejemplo, haciendo reaccionar la proteína con un exceso de polímero sintético, como se ejemplifica a continuación. Por lo tanto, por ejemplo, una molécula de PEG que tiene de 2 a 8 grupos de acrilato se uniría a la proteína a través de un solo acrilato, dejando de 1 a 7 grupos de acrilato disponibles para la reticulación.

50 Debido a la facilidad de reticulación de las moléculas precursoras de las realizaciones de la presente invención para formar un andamio, la reticulación de las moléculas precursoras puede realizarse ya sea dentro (es decir, *in vivo*) o fuera de un cuerpo. La reticulación *in vivo*, por ejemplo, puede usarse para generar un andamio que tiene la forma exacta de la cavidad en el cuerpo que se va a rellenar con el andamio.

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

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

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

Cuando se realiza la reticulación *in vivo*, es preferible evitar las dosis de luz ultravioleta que son perjudiciales. La dosis máxima que no es dañina dependerá, por ejemplo, de la longitud de onda de la luz ultravioleta utilizada y de la parte del cuerpo expuesta a la luz ultravioleta. Un experto en la técnica será capaz de determinar fácilmente si una dosis es dañina o no.

Opcionalmente, se añade un fotoiniciador para facilitar la reticulación. La adición de un fotoiniciador normalmente permitirá usar dosis menores de luz ultravioleta para la reticulación.

Como se usa en la presente memoria, el término "fotoiniciador" describe un compuesto que inicia una reacción química (por ejemplo, reacción de reticulación, polimerización en cadena) cuando se expone a la iluminación ultravioleta. Muchos fotoiniciadores adecuados serán conocidos por un experto en la técnica. Ejemplos de fotoiniciadores incluyen, sin limitación, óxido de bis(2,4,6-trimetilbenzoin) fenilfosfina (BAPO), 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPA), canforquinona (CQ), 1-fenil-1,2-propanodiona (PPD), el complejo organometálico $Cp^*Pt(CH_3)_3$ ($Cp^* = \eta^5-C_5H_4CH_3$), 2-hidroxi-1-[4-(hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona (por ejemplo, Irgacure™ 2959), metacrilato de dimetilaminoetilo (DMAEMA), 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona, benzofenona (BP) y flavinas.

De acuerdo con una realización opcional de la presente invención, las moléculas de polímero sintético no conjugado (es decir, moléculas de polímero sintético que no se unieron a la proteína) se eliminan de las moléculas precursoras antes de la reticulación de las moléculas precursoras.

De acuerdo con una realización opcional de la presente invención, la reticulación de moléculas precursoras comprende además la reticulación de las moléculas precursoras con una pluralidad de polímeros sintéticos, teniendo cada uno de los polímeros sintéticos al menos dos grupos funcionales, los grupos funcionales seleccionados son capaces de formar retícula con un grupo funcional de las moléculas precursoras. Opcionalmente, la pluralidad de polímeros sintéticos está en un intervalo de 1 mg/ml a 150 mg/ml, opcionalmente en un intervalo de 2 mg/ml a 50 mg/ml, y opcionalmente en un intervalo de 5 mg/ml a 15 mg/ml. Polímeros sintéticos y grupos funcionales adecuados para la reticulación son los descritos anteriormente.

La adición de polímero sintético aumentará la resistencia mecánica del andamio generado. Si el polímero sintético no es biodegradable, se reducirá la biodegradabilidad del andamio. Por lo tanto, las propiedades del andamio se pueden modificar como se desee mediante la adición de una cantidad apropiada de polímero sintético a reticular con las moléculas precursoras.

Opcionalmente, el polímero sintético no conjugado (es decir, polímero sintético que no es un componente de una molécula precursora) es menor que 20%, opcionalmente menos de 15%, opcionalmente menos de 10%, y opcionalmente menos de 5%, del peso total de todo el material (por ejemplo, moléculas precursoras y polímero sintético no conjugado) se entrecruza para formar un andamio.

Se debe observar que se puede eliminar el polímero sintético no conjugado antes de la reticulación de las moléculas precursoras, y luego añadir el mismo polímero sintético no conjugado que se entrecruza con las moléculas precursoras. Por ejemplo, puede ser deseable eliminar el polímero sintético no conjugado cuya concentración sea incierta, y luego añadir polímero sintético no conjugado a una concentración conocida.

Las realizaciones de la presente invención pueden incluir adicionalmente componentes que no son reactivos con el andamio y/o el hidrogel. Ejemplos de tales componentes no reactivos incluyen, sin limitación, fármacos tales como desinfectantes, agentes quimioterapéuticos, agentes antimicrobianos, agentes antivirales, hemostáticos, antiflogísticos, anestésicos, analgésicos, suplementos nutricionales, biopolímeros tales como péptidos, proteínas derivadas de plasma, enzimas o mezclas de los mismos.

Tales componentes pueden incluirse en el hidrogel, por ejemplo, disolviendo o suspendiendo los componentes no reactivos en el líquido acuoso comprendido por el hidrogel. Los procedimientos de carga de hidrogeles con productos farmacéuticos son bien conocidos en la técnica.

Además, la biofuncionalidad del andamio y/o hidrogel descrito anteriormente puede aumentarse adicionalmente al unir o impregnar una proteína tal como una proteína de señalización celular, o un factor de crecimiento (por ejemplo, un factor de crecimiento nervioso) al hidrogel.

La unión de tales proteínas al andamio de hidrogel de la presente invención se emplea opcionalmente por reticulación de una molécula precursora que comprende la proteína deseada con las otras moléculas precursoras del andamio. Opcionalmente, la molécula precursora adicional es cualquier molécula precursora descrita anteriormente.

Alternativamente, el hidrogel se puede impregnar con una proteína deseada deshidratando el andamio y luego sumergiendo el hidrogel en una solución que contiene la proteína deseada y agitando suavemente durante unas

pocas horas hasta que la proteína deseada penetre en el andamio durante el proceso de hidratación. Asimismo, el hidrogel se puede impregnar con una proteína deseada mediante incubación en una solución que comprende la proteína deseada hasta que la proteína se difunde en la red polimérica del andamio por difusión pasiva lenta. Esta última está influenciada por el grado de reticulación, la porosidad del andamio y las propiedades estructurales descritas en la presente memoria.

Además de ser económico de producir, el andamio de la presente invención es altamente reproducible, flexible (puede tensarse o estirarse fácilmente), exhibe propiedades estructurales controlables, y es susceptible de biodegradación controlable; características que lo hacen muy adecuado para la ingeniería *in vivo* o *ex vivo* de tejidos tales como hueso, nervio, cartílago, músculo cardíaco, tejido de la piel, vasos sanguíneos y otros tejidos (blandos y duros) en el cuerpo. Por ejemplo, un andamio y/o hidrogel de acuerdo con las realizaciones de la presente invención se puede colocar fácilmente en huecos dentro de un tejido o un órgano, después de lo cual puede llenar el vacío e iniciar el proceso de regeneración a medida que el andamio se degrada.

Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de las realizaciones de la presente invención, se proporciona una composición de materia y/o un andamio y/o hidrogel descrito anteriormente para su uso en la reparación del daño tisular.

Los ejemplos de trastornos o afecciones en los que la reparación del daño tisular es beneficiosa incluyen, pero no se limitan a, cirrosis hepática tal como en pacientes con hepatitis C (hígado), diabetes tipo 1 (páncreas), fibrosis quística (pulmón, hígado, páncreas), cáncer de huesos (hueso), quemaduras y reparación de heridas (piel), degeneración macular relacionada con la edad (retina), infarto de miocardio, reparación del miocardio, lesiones del SNC (mielina), defectos del cartílago articular (condrocitos), degeneración de la vejiga, degeneración intestinal y similares. Además, la reparación del daño tisular que es cosmético es frecuentemente beneficioso.

Como se usa en la presente memoria, el término "cosmético" se refiere a tejido aparente (por ejemplo, visible), que incluye, pero no se limita a, tejido cutáneo. El daño tisular cosmético es típicamente perjudicial desde el punto de vista estético y puede ser perjudicial por razones adicionales (por ejemplo, factores psicológicos).

La frase "*in vivo*" se refiere a un organismo vivo tal como una planta o un animal, preferiblemente en mamíferos, preferiblemente, en sujetos humanos.

Como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" se refiere a un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano (masculino o femenino) de cualquier edad.

El andamio de la presente invención se puede implantar en el sujeto usando una herramienta quirúrgica tal como un bisturí, una cuchara, una espátula u otro dispositivo quirúrgico.

Se apreciará que en la formación *in vivo* de un tejido también se puede lograr administrando las moléculas precursoras al sujeto y reticulando adicionalmente las moléculas precursoras *in vivo*. Se puede llevar a cabo la reticulación tal como se describió anteriormente usando agentes y/o condiciones no tóxicas y no peligrosas.

El andamio y/o hidrogel de la presente invención también se puede usar para formación *ex vivo* de un tejido.

Como se usa en la presente memoria, la frase "*ex vivo*" se refiere a células vivas que se derivan de un organismo y están creciendo (o cultivándose) fuera del organismo vivo, preferiblemente, fuera del cuerpo de un vertebrado, un mamífero o un ser humano. Por ejemplo, las células que se derivan de un ser humano tal como células musculares humanas o células endoteliales aórticas humanas y se cultivan fuera del cuerpo se denominan células que se cultivan *ex vivo*.

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

Siguiendo la formación de tejido *ex vivo*, el andamio sembrado es para implante en el sujeto. Los expertos en la materia son capaces de determinar cuándo y cómo implantar el andamio para inducir la regeneración del tejido y tratar la enfermedad.

Por ejemplo, para el cartílago articular, el andamio se siembra opcionalmente con condrocitos, y después de 14-21 días en cultivo, el andamio se puede implantar en la superficie articular de la articulación a partir de entonces.

Alternativamente, el andamio puede inyectarse como una solución precursora, con o sin células, y polimerizarse directamente en el sitio del daño del cartílago. El hidrogel polimerizado llena el espacio del defecto e inicia la regeneración del nuevo tejido del cartílago.

Como se usa en la presente memoria, la frase "tejido" se refiere a parte de un organismo que consiste en un agregado de células que tienen una estructura y función similares. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tejido cerebral, retina, tejido cutáneo, tejido hepático, tejido pancreático, hueso, nervio, cartílago, tejido conectivo, tejido sanguíneo, tejido muscular, tejido cerebral del tejido cardíaco, tejido vascular, tejido renal, tejido pulmonar, tejido gonadal, tejido hematopoyético y tejido graso. Preferiblemente, la frase "tejido" como se usa en la presente memoria también abarca la frase "órgano" que se refiere a una unidad estructural y funcional completamente diferenciada en un animal que está especializada para alguna función particular. Los ejemplos no limitantes de órganos incluyen cabeza, cerebro, ojo, pierna, mano, corazón, hígado, riñón, pulmón, páncreas, ovario, testículos y estómago.

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

Como se ejemplifica en la sección de Ejemplos de la presente memoria, las moléculas precursoras que comprenden albúmina como proteína (comparativa, que no forma parte de la invención) dan como resultado hidrogeles que son relativamente resistentes a la invasión celular. Dichos hidrogeles pueden usarse, por ejemplo, como un adhesivo. Por el contrario, como se ejemplifica adicionalmente en la presente memoria, las moléculas precursoras que comprenden una proteína de matriz extracelular (por ejemplo, colágeno tiolado) dan como resultado un hidrogel que se degrada fácilmente y se invade por las células. Dichos hidrogeles pueden usarse, por ejemplo, cuando es deseable que el hidrogel sea reemplazado por tejido natural.

Los medicamentos de acuerdo con las realizaciones de la presente invención pueden presentarse opcionalmente en un paquete o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU.), que puede contener una o más formas de dosificación unitarias (por ejemplo, 100 mg) como para uso personalizado. que contienen el ingrediente activo (por ejemplo, moléculas precursoras que aún no están reticuladas) y medios desechables, opcionalmente estériles, para el suministro (por ejemplo, jeringa) y para la iluminación (por ejemplo, cubiertas del iluminador). El paquete puede, por ejemplo, comprender una lámina metálica o de plástico, tal como un paquete blíster. El paquete o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones de administración. El paquete o dispositivo dispensador también puede ir acompañado de un aviso en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, cuyo aviso refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones para administración humana o veterinaria. Tal aviso, por ejemplo, puede incluir etiquetado aprobado por la FDA para medicamentos con receta o de un prospecto de producto aprobado. Las composiciones que comprenden una preparación de la invención formulada en un vehículo farmacéuticamente aceptable también se pueden preparar, colocar en un recipiente apropiado y etiquetar para el tratamiento de una afección indicada, como se detalla más arriba.

Como se usa en la presente memoria, el término "tratar" incluye anular, inhibir sustancialmente, ralentizar o revertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

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

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

Como se usa en la presente memoria, las formas singulares "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, que incluyen mezclas de los mismos.

A lo largo de la presente solicitud, varias realizaciones de esta invención pueden presentarse en un formato de intervalos. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalos es simplemente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del ámbito de la invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los posibles subintervalos, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un intervalo como del 1 al 6 tiene subintervalos divulgados específicamente, como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como de los números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Siempre que en la presente memoria se indique un intervalo numérico, se pretende que incluya cualquier número citado (fraccionario o entero) dentro del intervalo indicado. Las frases "que varía/varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "que varía/varía desde" un primer número indicado "hasta" un segundo número indicado se usan indistintamente y pretenden incluir el primer y segundo números indicados y todos los números fraccionarios y enteros entre ellos.

Como se usa en la presente memoria, el término "procedimiento" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea determinada que incluyen, pero no se limitan a, maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos o desarrollados fácilmente a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por parte de profesionales de las artes química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

Varias realizaciones y aspectos de la presente invención, tal como fueron delineados anteriormente y como se reivindican más adelante en la sección de reivindicaciones, encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención de una manera no limitativa.

Síntesis de PEG-diacrilato:

Se preparó PEG-diacrilato (PEG-DA) a partir de 10 kDa de PEG-OH lineal (Fluka, Aldrich) como se describe en otra parte. Brevemente, la acrilación de PEG-OH se llevó a cabo bajo argón haciendo reaccionar una solución de diclorometano de PEG-OH con cloruro de acrililo (Merck) y trietilamina (Fluka) a una relación molar de 1,5:1 de cloruro de acrililo a grupos -OH. El producto final se precipitó en éter dietílico enfriado en hielo y se secó al vacío durante 48 horas. Se utilizó espectroscopía de ¹H-NMR para verificar la conversión del grupo terminal y la pureza del producto final.

Tiolación de colágeno y PEGilación:

Se aisló colágeno (tipo I) a partir del tendón de la cola de rata según los protocolos publicados. La tiolación de colágeno se realizó usando succinimidil-acetil-tioacetato (SATA) (Pierce) como se describe por Chen *et al.* ("El uso de derivados bifuncionales de polietilenglicol para el acoplamiento de proteínas y la reticulación de matrices de colágeno", JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE: MATERIALS IN MEDICINE 13 (2002), 1029-1035). Brevemente, se disolvió colágeno en 150 mM de solución salina tamponada con fosfato (PBS) con 8 M de urea a una concentración de 5 mg/ml. El SATA se hizo reaccionar con el colágeno durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación a una concentración de 0,075 mg por mg de colágeno. Los grupos -SH acetilados resultantes unidos a residuos de lisina se desprotegeron a continuación haciendo reaccionar el colágeno con 0,5 M de clorhidrato de hidroxilamina (Sigma-Aldrich) durante 2 horas a una concentración de 0,125 ml por mg de colágeno. El producto se dializó durante la noche contra PBS con 8 M de urea.

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

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

La albúmina se PEGiló sin tiolación, para preparar hidrogeles a partir de albúmina PEGilada. El fibrinógeno se PEGiló y se usó para preparar hidrogeles por el bien de la comparación con albúmina y colágeno tiolado.

El fibrinógeno bovino (Sigma-Aldrich) y la albúmina de suero bovino (MP Biomedicals) se disolvieron cada uno en 150 mM de PBS con 8 M de urea para dar soluciones de 7 mg/ml. Se añadió TCEP-HCl a las soluciones de proteínas a una relación molar de 1,5:1 de TCEP a fibrinógeno de cisteínas y a una relación de 2:1 con respecto a las cisteínas de albúmina. Después de la disolución, se añadió una solución de 280 mg/ml de PEG-DA (PEG-diacrilato lineal, 10 kDa) en 150 mM de PBS con 8 M de urea y se hizo reaccionar durante 3 horas a temperatura ambiente. La relación molar de PEG a cisteínas de fibrinógeno fue de 4:1. La relación molar de PEG a cisteínas de albúmina fue 2:1. Después de la incubación, las proteínas PEGiladas se diluyeron con un volumen igual de 150 mM de PBS que contenía 8 M de urea y se precipitaron mediante la adición de 5 volúmenes de acetona. Los precipitados se redisolviaron en PBS que contenía 8 M de urea usando un homogeneizador, a ~2 mg/ml de concentración de proteína para albúmina, y a ~7 mg/ml para fibrinógeno, y se dializaron contra 150 mM de PBS a 4 °C durante 2 días con dos cambios de PBS. Las soluciones de proteína PEGiladas se liofilizaron después durante al menos 2 días y se redisolviaron en 150 mM de PBS para alcanzar una concentración de proteína de ~8 mg/ml.

Análisis de SDS-PAGE de PEGilación de proteínas:

La reacción de PEGilación se confirmó mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrílida con

dodecilsulfato de sodio). Este es un procedimiento directo para evaluar cualitativamente la PEGilación de proteínas, ya que el injerto de PEG en una proteína tiene un efecto detectable sobre la movilidad de la proteína en el gel de poli(acrilamida). La proteína PEGilada y no PEGilada se cargó en geles de poli(acrilamida) al 8%. Los geles se tiñeron con azul Coomassie® y se obtuvieron imágenes digitales usando una estación de trabajo de documentación para geles.

Como se muestra en la Figura 1, la PEGilación de albúmina, colágeno tiolado y fibrinógeno no tiolado provocó un marcado aumento en el MW aparente. La albúmina PEGilada, el colágeno y el fibrinógeno son visibles como un frotis continuo en la porción más alta del gel. Algo del colágeno y el fibrinógeno permanecieron sin PEGilar como se indica por la banda de colágeno aproximadamente a 105 kDa y por la banda de fibrinógeno de aproximadamente 50 kDa.

Formación de hidrogel:

Los precursores de proteína PEGilados se formaron en hidrogeles mediante fotopolimerización usando Irgacure™ 2959 al 0,1% (p/v) (Ciba Specialty Chemicals) y la exposición a luz ultravioleta (365 nm, 4-5 mW/cm²) durante 5 minutos. Todos los experimentos de cultivo tisular se realizaron con 4 mg/ml de precursor de proteína PEGilada suplementado con 10 mg/ml de PEG-DA lineal (10 kDa).

La formación de hidrogel se confirmó mediante reometría de cizallamiento controlada por velocidad de deformación. Las pruebas dinámicas de barrido de tiempo en la geometría placa-placa se realizaron a 37 °C, a una frecuencia constante de 1 radianes/segundo y a una deformación sinusoidal del 5% usando un Sistema de Expansión Reométrico Avanzado (ARES, Rheometer Scientific). El software RSI Orchestrator 6.5.8 grabó los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') en función del tiempo durante hasta 10 minutos. Después de 20 segundos, la solución se polimerizó mediante fotoiniciación utilizando una fuente de luz ultravioleta (4-5 mW/cm²). El módulo de cizallamiento reportado se tomó como una parte real del módulo de cizallamiento complejo $G^* = G' + iG''$ tras la finalización de la prueba de barrido de tiempo.

Como se muestra en la Figura 2, para precursores PEGilados de albúmina, fibrinógeno y colágeno tiolado, el valor G' aumentó inmediatamente después de que se encendiera la lámpara ultravioleta, y alcanzó una meseta después de aproximadamente dos minutos, lo que indica la finalización de la reacción de polimerización.

Caracterización de hinchamiento:

Los experimentos de hinchamiento se realizaron en tapones cilíndricos (5 mm de diámetro) polimerizados a partir de 100 µl de precursor de proteína PEGilada. Los tapones de hidrogel se incubaron en 10 ml de PBS que contenía azida sódica al 0,1% a temperatura ambiente durante 24 horas. El peso en húmedo de cada tapón se registró antes de ser liofilizado durante la noche. Se midió el peso seco y se calculó la relación de hinchamiento (Q) dividiendo el peso seco por el peso húmedo después del hinchamiento. La masa estimada de sales de PBS y azida sódica se restó del peso seco. Un parámetro de hinchamiento adicional, la relación de % de volumen, se definió como el % de aumento entre el volumen final del tapón en comparación con el volumen inicial en el momento de la fusión ($[V_{\text{final}}/V_{\text{inicial}}] \times 100$).

La relación de volumen de colágeno tiolado PEGilado era de $215 \pm 21\%$, mientras que la relación de hinchamiento era de 145 ± 27 .

La relación de volumen de albúmina PEGilada era de $238 \pm 27\%$, mientras que la relación de hinchamiento era de 87 ± 10 .

En comparación, la relación de volumen de fibrinógeno PEGilado era de $155 \pm 25\%$, mientras que la relación de hinchamiento era de 179 ± 29 .

Caracterización de biodegradación:

Los experimentos de biodegradación se realizaron en tapones cilíndricos sin células fabricadas a partir de proteína PEGilada marcada fluorescentemente como se describe por Peled *et al.* (2007). Brevemente, se reconstituyeron 0,1 mg/ml de succinimidil acridina-9-carboxilato (SAC) (Pierce) en PBS que contenía DMSO para preparar una solución de tinción de SAC. Cada tapón se incubó en la solución de tinción de SAC durante la noche, seguido de lavado extensivo en PBS y azida sódica al 0,1% durante 3 días. Cada tapón se incubó en 3 ml de solución de colagenasa tipo I de 0,01 mg/ml (Sigma-Aldrich) en PBS y azida sódica al 0,1% a 37 °C con agitación continua. Se usó un lector multimodo de exploración espectral Varioscan (Thermo Electron Corp.) para medir la intensidad de fluorescencia del sobrenadante (excitación 364 nm, emisión 460 nm) cada 5 minutos durante hasta 10 horas. Los datos brutos se normalizaron mediante la intensidad de fluorescencia final del hidrogel completamente degradado. Se usaron dos grupos de control independientes para validar los resultados experimentales: tapones de hidrogel teñidos con SAC en PBS y azida sódica sin colagenasa; y tapones de

hidrogel no teñidos en PBS, colagenasa y azida sódica.

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

Preparación del sustrato celular (2-D):

Se usaron hidrogeles hechos a partir de proteína PEGilada como sustratos para cultivos bidimensionales de células de músculo liso (SMC). Las SMC aórticas de oveja se cultivaron hasta el octavo pasaje en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco, Reino Unido) que contiene 10% de suero bovino fetal (FBS) (Biological Industries, Israel). Los hidrogeles profundos se prepararon a partir de una solución de precursor de proteína PEGilada (4 mg/ml), PEG-DA lineal de 10 kDa (10 mg/ml) y fotoiniciador (0,1% p/v). Los geles se unieron al fondo de una placa de 24 pocillos y se sembraron con una suspensión de SMC (70.000 células por pocillo) en 1 ml de medio de cultivo. La propagación celular se controló inmediatamente después de la siembra usando un microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse TS100) y se documentó la morfología celular con una cámara CCD digital.

Se usaron hidrogeles plásticos de cultivo de tejidos e hidrogeles solo de PEG como controles positivo y negativo, respectivamente, para la propagación celular (datos no mostrados).

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

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

Preparación de constructo celularizado (3-D):

Los constructos celularizados se fabricaron por fotopolimerización de la solución de precursor de proteína PEGilada en presencia de SMC dispersas. Las células sometidas a pasajes se tripsinizaron y se suspendieron en 300 µl de precursor de proteína PEGilada ($0,5 \times 10^6$ células por ml) que contenía fotoiniciador (0,1% p/v). Los constructos cilíndricos se moldearon en tubos de silicona estériles de 8 mm de diámetro y se transfirieron a una placa de Petri que contenía medio de cultivo. Las células encapsuladas se monitorizaron y documentaron diariamente usando un microscopio de contraste de fase. Algunos experimentos se monitorizaron continuamente utilizando un sistema de microscopio incrustado a intervalos de tiempo personalizado (Nikon Eclipse TE-2000). Los experimentos de lapso de tiempo registraron visualmente la remodelación activa de las células en varias ubicaciones dentro de cada hidrogel al visualizar secuencialmente cada campo cada 10 minutos durante hasta 96 horas.

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

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

Estudios de crecimiento tisular:

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

establecidos.

Como se muestra en la Figura 6A, las SMC comenzaron a invadir la matriz de colágeno PEGilada y la matriz de fibrinógeno PEGilado inmediatamente después de la fusión y continuaron invadiendo ambas matrices a lo largo de la duración del experimento. Las mediciones cuantitativas en el fibrinógeno PEGilado y las matrices de colágeno PEGilado revelan patrones de migración muy similares (Figura 6C). Por el contrario, no se produjo invasión de la matriz de albúmina PEGilada, incluso después de 5 días (Figura 6A).

Referencias

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Merrill EA, Salzman EW. Polyethylene oxide as a biomaterial. *ASAIO J* 1983; 6:60-64.

50 Nguyen KT, West JL. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2002; 23(22):4307-4314.

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

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

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

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

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

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

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

10

REIVINDICACIONES

1. Una composición de materia que comprende una molécula precursora de proteína de polímero que comprende una proteína tiolada y al menos dos polímeros sintéticos unidos covalentemente a grupos tiol de dicha proteína tiolada, teniendo cada uno de dichos al menos dos polímeros sintéticos un grupo funcional, siendo capaz dicho grupo funcional seleccionado de formar reticula con un grupo funcional de al menos otro polímero sintético, formando dicho al menos otro polímero sintético una parte de al menos otra molécula precursora de proteína de polímero que comprende una proteína tiolada y al menos dos polímeros sintéticos unidos covalentemente a dichos grupos tiol de dicha proteína tiolada, formando dicha reticulación un andamio.
2. Un andamio que comprende una pluralidad de proteínas tioladas y una pluralidad de polímeros sintéticos unidos covalentemente a grupos tiol de dichas proteínas tioladas, estando cada una de dichas proteínas tioladas unida covalentemente al menos a dos de dichos polímeros sintéticos, en el que dichos polímeros sintéticos están reticulados.
3. Un hidrogel formado a partir del andamio según la reivindicación 2.
4. Un procedimiento de generación de un andamio fuera de un cuerpo, comprendiendo el procedimiento:
- (a) tiolar una proteína con un reactivo de tiolación, para obtener de este modo una proteína tiolada;
- (b) unir covalentemente una proteína tiolada al menos a dos polímeros sintéticos a través de un primer grupo funcional de dichos al menos dos polímeros sintéticos, en el que dicho primer grupo funcional se une a un grupo tiol de dicha proteína tiolada, teniendo cada uno de dichos al menos dos polímeros sintéticos un segundo grupo funcional, para obtener de este modo una molécula precursora de proteína de polímero; y posteriormente
- (c) reticular una pluralidad de dichas moléculas precursoras para generar de este modo dicho andamio, por medio de lo cual se excluyen los procedimientos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.
5. La composición de materia o andamio según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicha proteína comprende menos de 5 residuos de cisteína por cada 100 residuos de aminoácidos.
6. La composición de materia, andamio o hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3, en la que dicha proteína es colágeno.
7. La composición de materia, andamio o hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3, en la que dicha proteína está desnaturalizada.
8. El andamio según la reivindicación 2, que comprende al menos 0,4% de proteína en peso seco.
9. El procedimiento según la reivindicación 4, que comprende además eliminar la forma no conjugada de dicho polímero sintético antes de la etapa (c).
10. La composición de materia, andamio o hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en la reparación de daño tisular.
11. La composición de materia, andamio o hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicho polímero sintético es PEG.
12. La composición de materia según la reivindicación 1, en la que dicho grupo funcional se selecciona del grupo que consiste en acrilato y vinilsulfona.
13. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que dichos primer y segundo grupos funcionales son idénticos.
14. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicha reticulación comprende además reticular una pluralidad de dichas moléculas precursoras con una pluralidad de polímeros sintéticos, teniendo cada uno de dichos polímeros sintéticos al menos dos grupos funcionales, siendo capaces dichos grupos funcionales seleccionados de formar reticula con un grupo funcional de dichas moléculas precursoras.
15. El andamio, hidrogel o procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2-3 y 14, en los que una concentración de dicha pluralidad de polímeros sintéticos está en un intervalo de 1 mg/ml a 150 mg/ml.

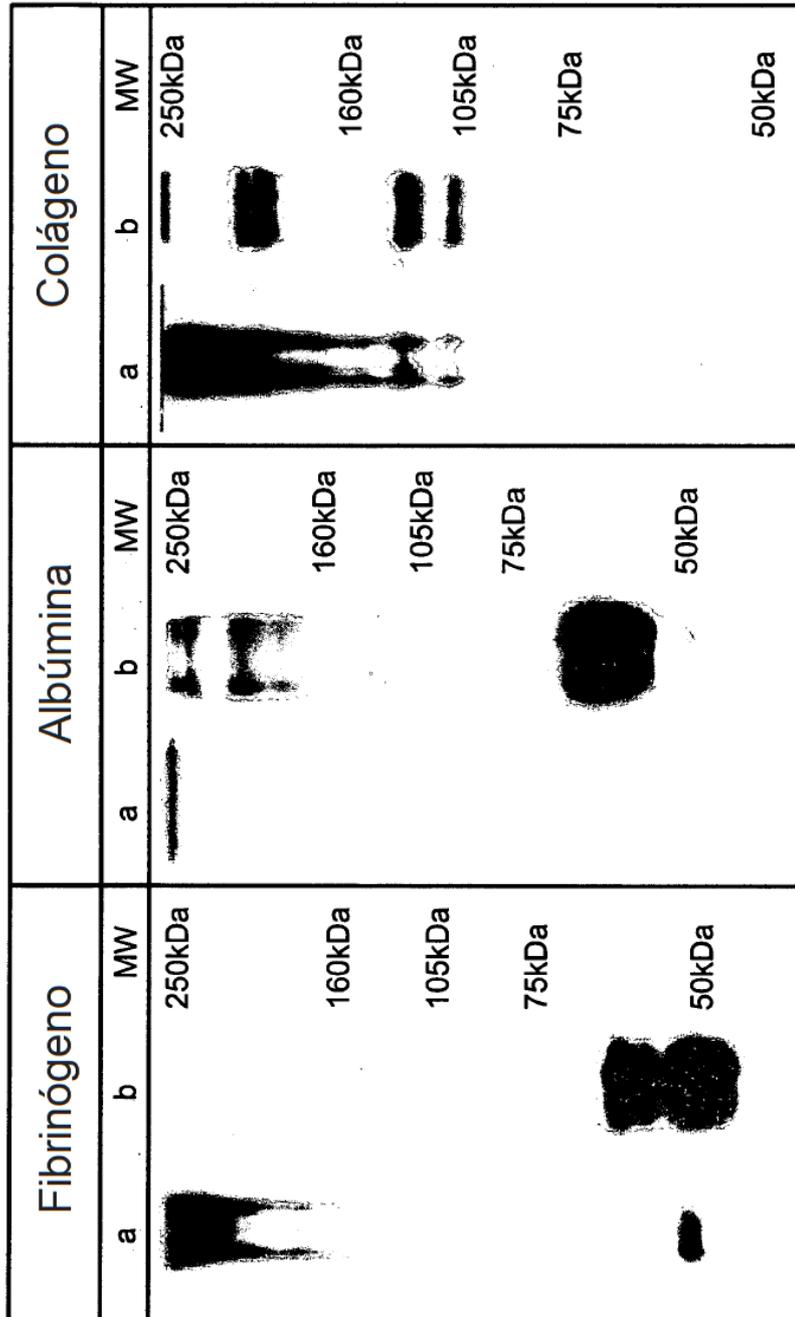


Fig. 1

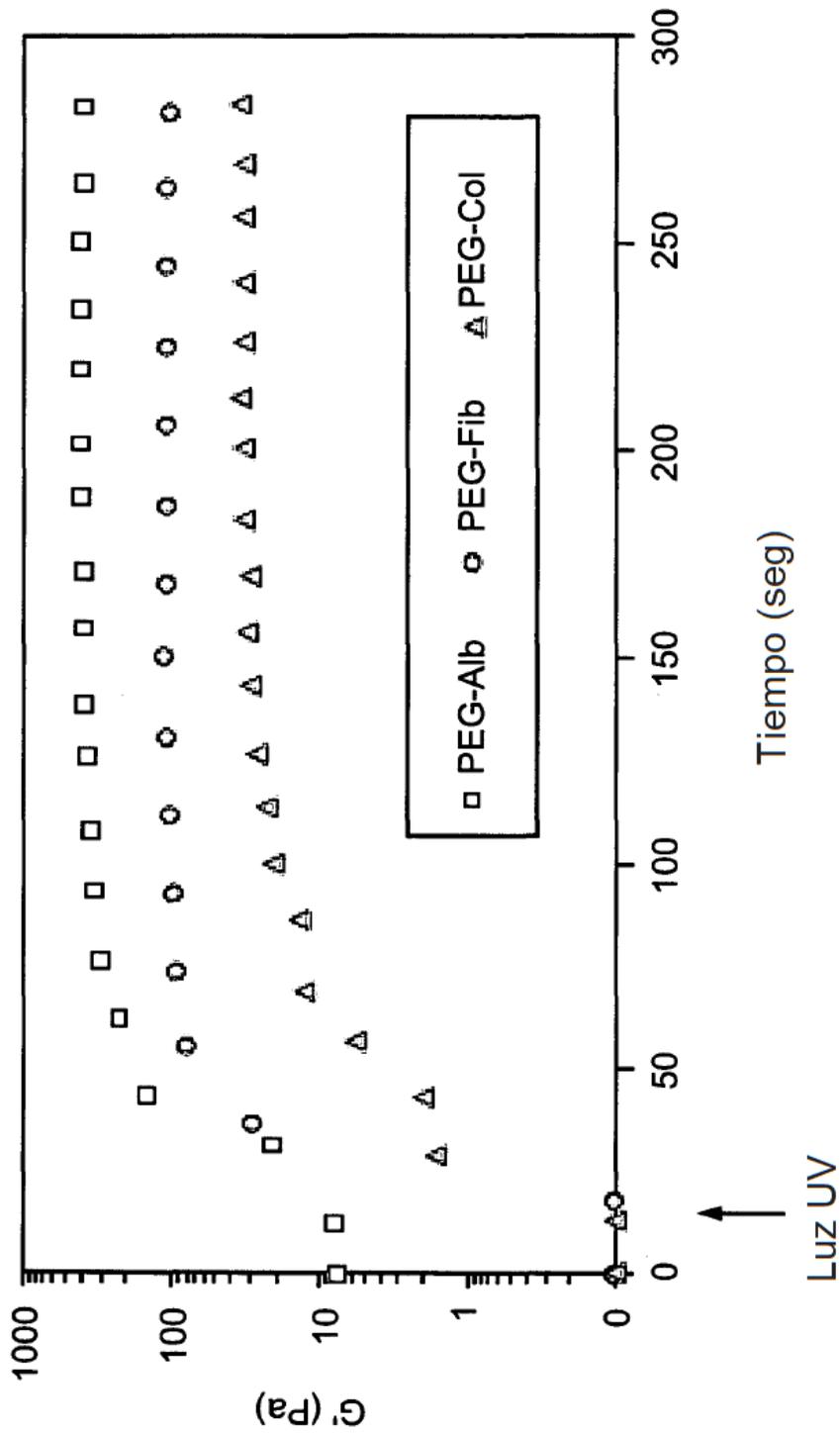


Fig. 2

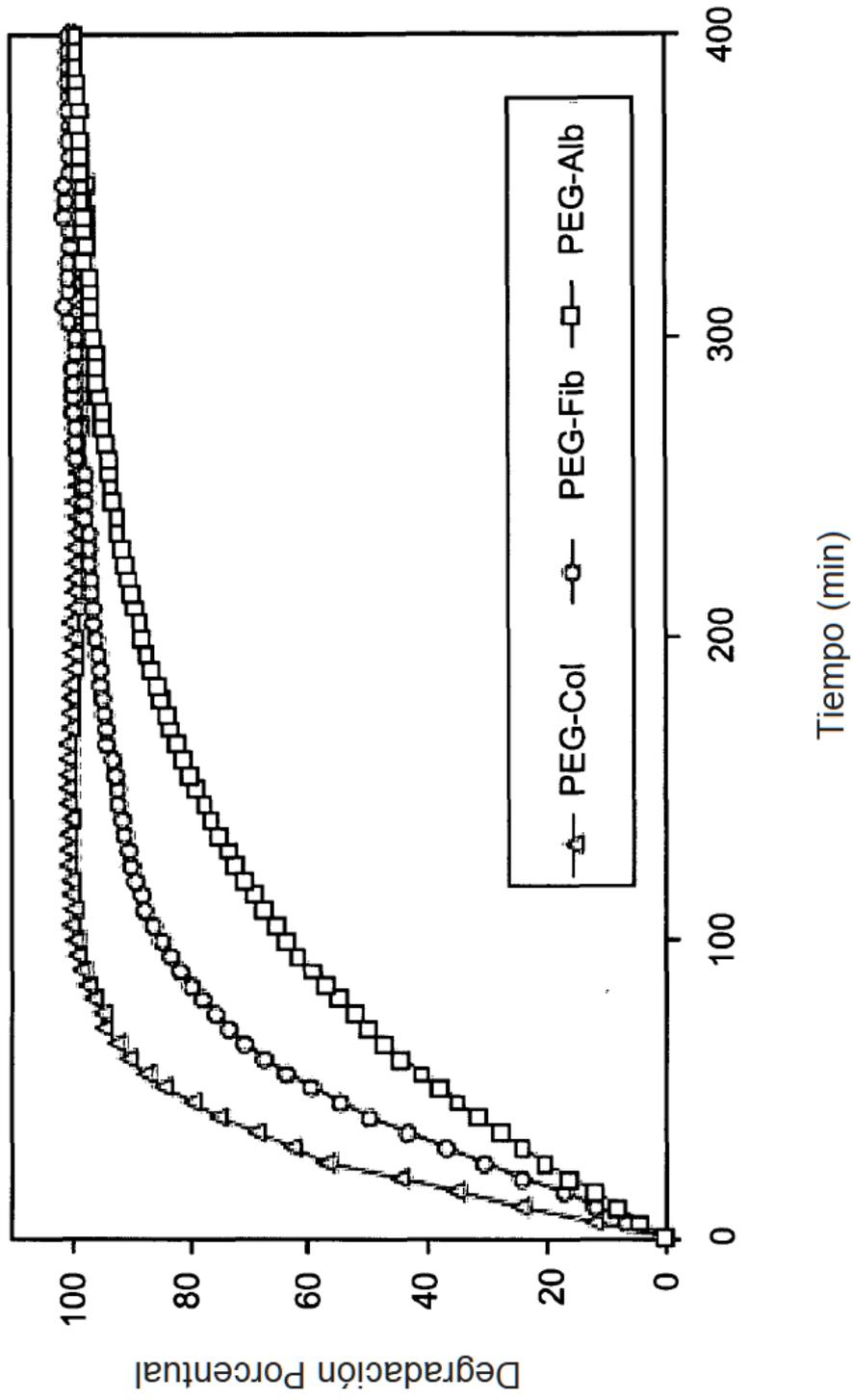


Fig. 3

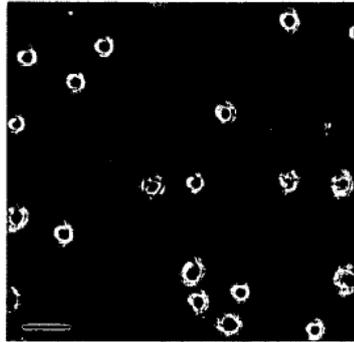


Fig. 4a

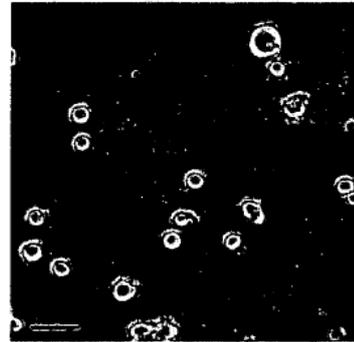


Fig. 4b

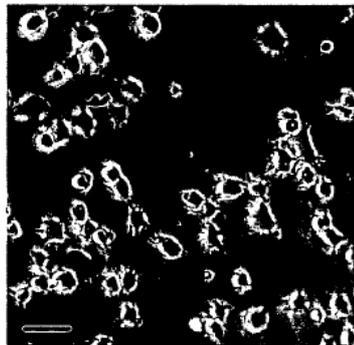


Fig. 4c



Fig. 4d

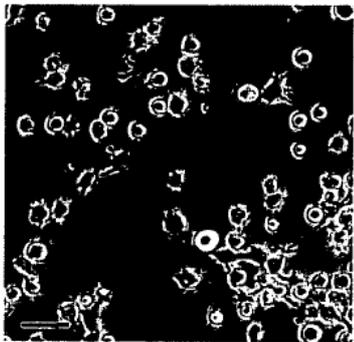


Fig. 4e



Fig. 4f

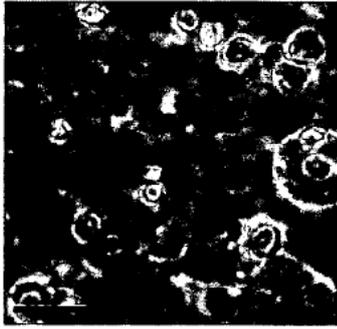


Fig. 5a

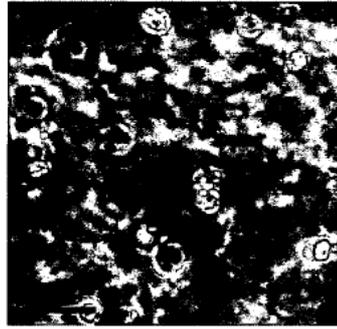


Fig. 5b

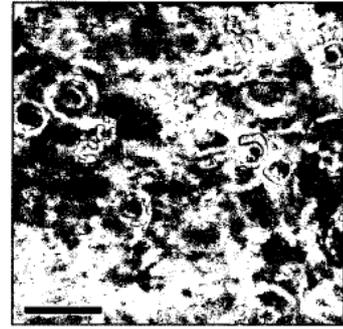


Fig. 5c

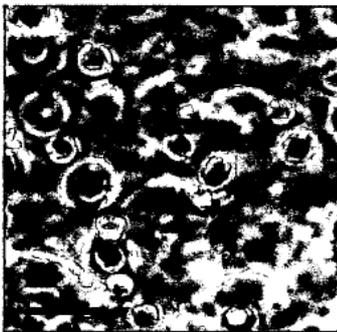


Fig. 5d

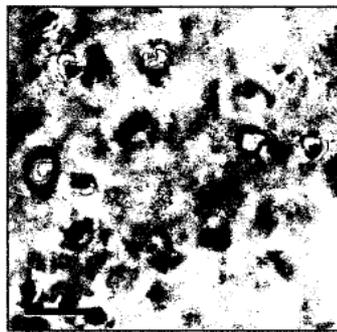


Fig. 5e



Fig. 5f

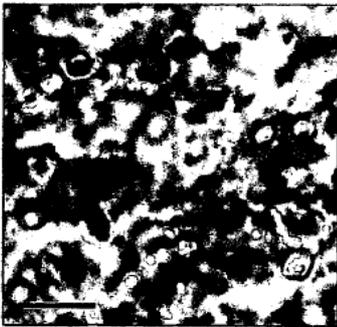


Fig. 5g



Fig. 5h



Fig. 5i

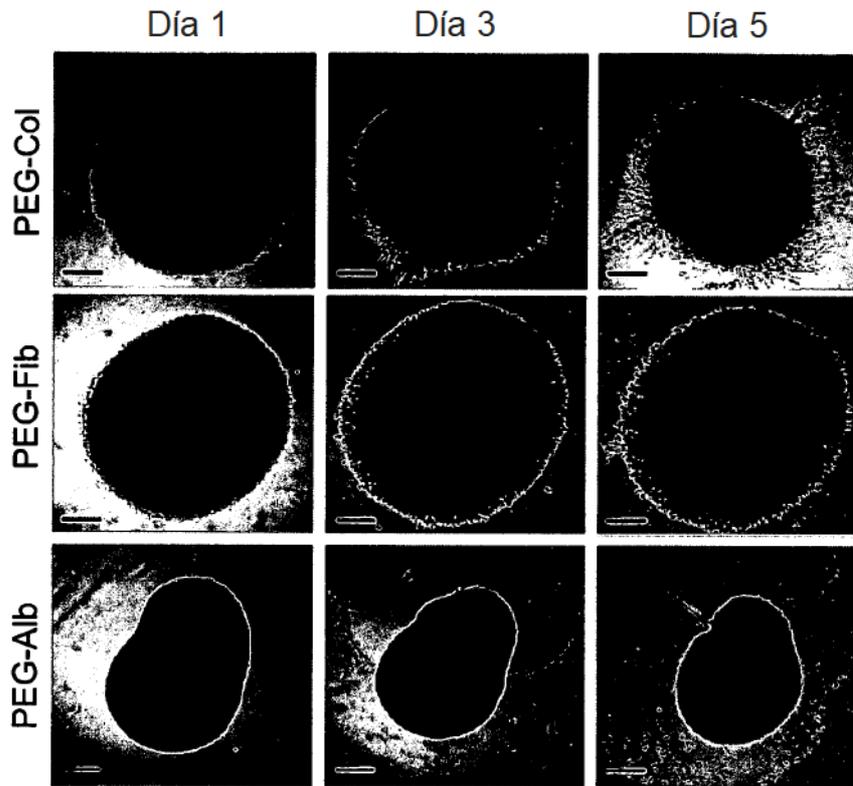


Fig. 6a

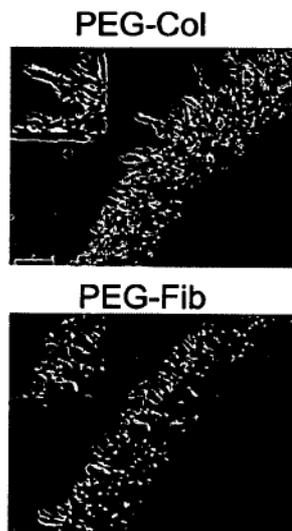


Fig. 6b

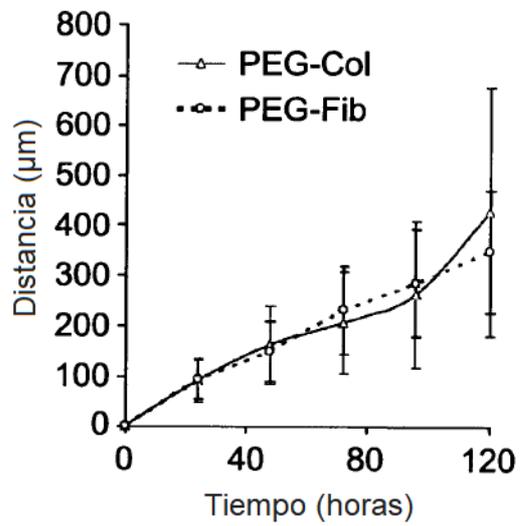


Fig. 6c