

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 460**

51 Int. Cl.:

C08J 3/075 (2006.01)

A61K 38/08 (2009.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2019 PCT/EP2019/055075**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2019 WO19166594**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2019 E 19707390 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2024 EP 3759153**

54 Título: **Hidrogel para estimular la neurotización, la osteogénesis y la angiogénesis**

30 Prioridad:

28.02.2018 FR 1851770

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.11.2024

73 Titular/es:

**UNIVERSITE DE BORDEAUX (25.0%)
35, Place Pey Berland
33000 Bordeaux, FR;
INSTITUT POLYTECHNIQUE DE BORDEAUX
(25.0%);
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHÉMÉDICALE (25.0%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (25.0%)**

72 Inventor/es:

**AMEDEE, JOËLLE;
LECOMMANDOUX, SÉBASTIEN;
OLIVEIRA, HUGO;
PAIVA DOS SANTOS, BRUNO;
GARBAY, BERTRAND y
GARANGER, ELISABETH**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 986 460 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

Hidrogel para estimular la neurotización, la osteogénesis y la angiogénesis

5 La presente invención se refiere a un hidrogel útil para promover la neurotización, la osteogénesis y la angiogénesis.

Antecedentes de la técnica

10 En el campo de la medicina regenerativa y de la ingeniería tisular, el sistema nervioso periférico sigue recibiendo, hasta el día de hoy, poca atención en un contexto de regeneración del tejido óseo. Ahora bien, datos biológicos, estudios experimentales y clínicos demuestran interacciones entre los principales eventos de la reconstrucción ósea, a saber, su neovascularización, su inervación y la neoformación ósea.

15 Datos biológicos recientes obtenidos por el equipo de inventores (Silva et al, Cell Death and Disease, 13 de diciembre de 2017;8(12):3209) han demostrado, usando modelos de cocultivos bidimensionales de neuronas sensoriales y de células mesenquimales, el impacto de la comunicación entre estos dos tipos de células en la osteogénesis. Sin embargo, en la actualidad no existen materiales ni matrices tridimensionales que permitan poner en práctica estas observaciones, tanto experimental como terapéuticamente, con vistas a desarrollar un nuevo material innovador dedicado a la regeneración ósea.

20 En este contexto, los inventores desarrollaron un nuevo hidrogel, capaz de reclutar neuronas, en concreto sensoriales, y de albergar otros tipos celulares y, más particularmente, células osteoformadoras y endoteliales.

Resumen de la invención

25 Un primer aspecto de la invención se refiere a un hidrogel que comprende:

- i) un polipéptido de tipo elastina que comprende al menos un residuo alquenilado; y
- ii) un péptido capaz de reclutar células neuronales y/o endoteliales, en concreto un péptido IKVAV.

30 Según un modo particular de realización, el hidrogel según la invención comprende:

- i) un polipéptido de tipo elastina que comprende al menos un residuo alquenilado, en concreto una metionina alquenilada;
- ii) un péptido capaz de reclutar células neuronales y/o endoteliales, en concreto un péptido IKVAV; y
- iii) un polímero de reticulación, en concreto un polímero de reticulación con extremos tioles.

35 Según un modo particular de realización, el polipéptido de tipo elastina es un polipéptido que comprende al menos una ocurrencia de la secuencia VPGMG. De manera no limitativa, el péptido de tipo elastina puede ser en concreto el polipéptido MGTELAASEFTHMW[VPGMG]₂₀ (ELP20), el polipéptido MW[VPGVGVPGMG(VPGVG)₂]₅ (ELPM20) o el polipéptido MW[VPGVGVPGMG(VPGVG)₂]₁₀ (ELPM40).

40 Según un modo particular de realización, el péptido es un péptido IKVAV, en concreto un péptido IKVAV de fórmula Cys-{Beta-Ala}-Ile-Lys-Val-Ala-Val-{Beta-Ala}-Cys.

45 En otra variante, el polímero de reticulación, en concreto un polímero de reticulación con extremos tioles, es un polímero multiramificado. Más particularmente, el polímero de reticulación puede ser un poli(etilenglicol) con 4 brazos, en concreto un poli(etilenglicol) con 4 brazos con extremos tioles, en concreto un poli(etilenglicol) PEG con 4 brazos con una masa molecular promedio comprendida entre 10 y 30 kDa, más particularmente un PEG con 4 brazos con extremos tioles con una masa molecular promedio comprendida entre 10 y 30 kDa. El poli(etilenglicol) con 4 brazos, en concreto el poli(etilenglicol) con 4 brazos con extremos tioles, puede tener en concreto una masa molecular promedio de 20 kDa. En el contexto de la presente invención, la masa molecular promedio es una masa molecular en masa.

50 En un modo particular de realización, el polímero de reticulación con extremos tioles, el polipéptido de tipo elastina que comprende un residuo de metionina alquenilado, y el péptido IKVAV están presentes en el hidrogel en una relación tiol/alqueno equimolar.

55 En otro modo particular de realización, la concentración del hidrogel está comprendida entre 5 y 15 % en densidad (p/v), en particular entre 7 y 8 % (p/v).

60 En otro modo de realización, el módulo de almacenamiento G' del hidrogel está comprendido entre 1 y 5, preferentemente entre 1 y 1,5 kPa.

65 El hidrogel según la invención puede comprender además al menos un agente biológicamente activo, en concreto al menos un factor de crecimiento.

Otro aspecto de la invención se refiere al hidrogel descrito en la presente solicitud, para su uso como medicamento.

5 Según otro aspecto, la invención se refiere al hidrogel descrito en la presente solicitud, para su uso en un método de regeneración ósea.

Por otro lado, la invención también se refiere a un método de cultivo celular *in vitro*, que comprende el cultivo de células en un hidrogel como se define en la presente solicitud.

10 Descripción de las figuras

Figura 1. A) representación esquemática de los componentes del hidrogel y del método de producción; B) fotografía que muestra un hidrogel ELPM40 + PEG. Barra = 1 mm.

15 **Figura 2.** caracterización reológica de hidrogeles ELPM40 + PEG a diferentes concentraciones finales a 37 °C. Los módulos elásticos (G') para cada concentración se indican en la figura.

20 **Figura 3.** microscopía electrónica de barrido de (A) ELPM40 + PEG, (B) ELPM40 + 25 % IKVAV, (C) ELPM40 + 25 % VKAIV, (D) ELPM40 + 50 % IKVAV, (E) ELPM40 + 50 % VKAIV que muestra la estructura porosa de estos hidrogeles. F) Cuantificación del tamaño de los poros: las composiciones 25 % de péptido de adhesión peptídica tienen poros más pequeños que las otras composiciones.

25 **Figura 4.** análisis *in vitro* de la degradación de los hidrogeles mediante determinación de aminas libres en solución después de una incubación con proteinasa K (0,5 U/ml) durante 7 h.

Figura 5. actividad metabólica de las células endoteliales (EC), células estromales mesenquimales de la médula ósea (BMSC) y neuronas sensoriales (SN). Todas las composiciones de hidrogeles permitieron la unión y el cultivo de los tres tipos celulares.

30 **Figura 6.** Morfología de las células endoteliales 7 días después de su cultivo en (A) ELPM40 + PEG, (B) ELPM40 + 25 % IKVAV, (C) ELPM40 + 25 % VKAIV, (D) ELPM40 + 50 % IKVAV y (E) ELPM40 + 50 % VKAIV. En todas las composiciones, las células pudieron entrar y migrar al interior de los hidrogeles y formar diferentes estructuras.

35 **Figura 7.** células BMSC asociadas con (A) ELPM40 + PEG, (B) ELPM40 + 25 % IKVAV, (C) ELPM40 + 25 % VKAIV, (D) ELPM40 + 50 % IKVAV y (E) ELPM40 + 50 % VKAIV. Las células presentan una morfología esferoide con todas las composiciones de hidrogeles. (F) Detalle de células sumergidas en un hidrogel ELPM40 + 50 % IKVAV que muestra dos núcleos conectados (indicados por la flecha blanca), lo que sugiere que las células pueden proliferar en el interior del gel.

40 **Figura 8.** Morfología y difusión de neuronas sensoriales cultivadas en (A) ELPM40 + PEG, (B) ELPM40 + 25 % IKVAV, (C) ELPM40 + 25 % VKAIV, (D) ELPM40 + 50 % IKVAV y (E) ELPM40 + 50 % VKAIV. Barras 100 μ m. (F) Longitud promedio de neuritas medida para todas las composiciones de hidrogeles.

45 **Figura 9.** Expresión génica en células BMSC cultivadas en un medio osteogénico durante 7 días, en asociación con diferentes hidrogeles. La expresión se representa con respecto a la composición ELPM40 + PEG, utilizada como control.

50 **Figura 10.** La expresión del gen *Tek* después de 7 días de cultivo de células endoteliales en composiciones de ELPM40 + PEG, ELPM40 + 25 % IKVAV, ELPM40 + 25 % VKAIV, ELPM40 + 50 % IKVAV y ELPM40 + 50 % VKAIV.

55 **Figura 11.** Evaluación subcutánea de una composición ELPM40 + 50 % IKVAV y ELPM40 + 50 % VKAIV después de 11 y 26 días. (A) se analizaron cortes histológicos para determinar i) el potencial inflamatorio (HE), ii) la capacidad de inducir una angiogénesis (inmunohistoquímica de CD31) y iii) la innervación (inmunohistoquímica de tubulina β III (β 3T)). Barras = 50 μ m para HE y CD31. Se muestran ampliaciones de las tinciones de CD31 y β 3T, barras = 20 μ m. (B) cuantificación de los vasos formados en la región que rodea la zona de implantación de una composición ELPM40 + 50 % y ELPM40 + 50 % VKAIV IKVAV.

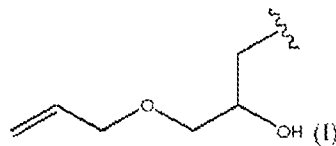
60 Descripción detallada de la invención

65 La presente invención tiene como objetivo un hidrogel biocompatible capaz de promover la neurotización, la osteogénesis y la angiogénesis. Este hidrogel se caracteriza por que comprende un polipéptido de tipo elastina que comprende al menos un residuo de metionina alquenilado; y un péptido capaz de reclutar células neuronales y/o endoteliales, en concreto un péptido IKVAV. Más particularmente, el hidrogel según la presente invención se caracteriza por que comprende i) un polipéptido de tipo elastina que comprende al menos un residuo de metionina alquenilado, y ii) un péptido capaz de reclutar células neuronales y/o endoteliales, en concreto un péptido IKVAV y iii)

un polímero de reticulación, en concreto un polímero de reticulación con extremos tioles.

El hidrogel según la invención puede formarse en concreto usando un polímero de reticulación con extremos tioles. En el contexto de la presente invención, por "polímero de reticulación con extremos tioles" se entiende un polímero que presenta al menos una función tiol libre SH antes de la formación del hidrogel, es decir, antes del contacto con el péptido de tipo elastina. Según un modo particular de realización, cuando la relación tiol/alqueno es equimolar o cuando la relación tiol/alqueno es superior a 1 (más tioles que alqueno), el polímero con extremo tioles en el hidrogel ya no presenta una función tiol SH libre después de la reacción con ELP. Según otro modo de realización, cuando la relación tiol/alqueno es inferior a 1 (tiol en falta o alqueno en exceso), el polímero con extremo tioles, en el hidrogel, puede presentar funciones tiol SH libres después de la reacción con ELP. Dicho polímero se elige entre los polímeros que permiten la formación de un hidrogel biocompatible, en el sentido de que no es tóxico para las células. También permite ventajosamente la difusión de oxígeno y nutrientes, así como dióxido de carbono y desechos metabólicos para alimentar a las células y permitirles sobrevivir. Los polímeros de la solución de hidrogel pueden ser de origen natural, como las proteínas de la matriz extracelular, o sintético como el poli(etilenglicol) (PEG), la poli(oxazolona) (POx) o la poli(sarcosina) (PSar). Según un modo de realización, el polímero de reticulación es más particularmente un polímero multiramificado, en concreto un polímero lineal o un polímero multiramificado que tiene al menos tres brazos, más particularmente al menos cuatro brazos, pudiendo dicho polímero lineal multiramificado comprender un grupo tiol en cada uno de sus extremos. De este modo, el polímero de reticulación puede ser más particularmente un polímero multiramificado, en concreto un polímero lineal o un polímero multiramificado que tiene al menos tres brazos, más particularmente al menos cuatro brazos, comprendiendo dicho polímero lineal multiramificado un grupo tiol en cada uno de sus extremos. Según un modo particular de realización, el polímero multiramificado es un polímero con cuatro brazos, que puede comprender en concreto un grupo tiol en el extremo de cada uno de sus brazos. Se pueden citar en concreto los polímeros de tipo poli(etilenglicol) (o PEG) lineales o con tres o cuatro brazos, o más de cuatro brazos, más particularmente cuatro brazos. Según un modo de realización, se emplean polímeros de tipo poli(etilenglicol) (o PEG) lineales o con tres o cuatro brazos, o más de cuatro brazos, más particularmente cuatro brazos, cada extremo de los PEG lineales comprendiendo un grupo tiol, o cada brazo de los PEG multiramificado comprendiendo en sus extremos un grupo tiol. En un modo de realización, el hidrogel comprende un PEG con cuatro brazos que comprenden cada uno en su extremo un grupo tiol, siendo la masa molecular promedio de dicho PEG comprendida entre 1 y 100 kDa, más particularmente entre 10 y 30 kDa, teniendo el PEG aún más particularmente una masa molecular promedio de 20 kDa.

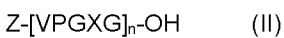
El segundo componente del hidrogel según la invención es un polipéptido de tipo elastina (o ELP por Elastin-Like Polypeptide en inglés) que comprende al menos un residuo de metionina alquenilado. Este tipo de polipéptidos, su procedimiento de fabricación mediante ingeniería genética, y su purificación son conocidos por el experto en la materia, que puede consultar en concreto la solicitud internacional WO2017021334 y los artículos de Petitdemange *et al.* (Biomacromolecules. 13 de febrero de 2017;18(2):544-550) y de Petitdemange *et al.* (Bioconjug Chem. 17 de mayo de 2017; 28(5):1403-1412). En el marco de la presente invención, la expresión "residuo de metionina alquenilado" significa que la cadena lateral del residuo de metionina está unida covalentemente a un grupo que comprende un grupo alqueno, es decir, que comprende al menos un doble enlace entre dos átomos de carbono. De manera preferente, la expresión "grupo alqueno" se refiere a la presencia de un grupo -CH=CH₂ en el grupo unido al residuo de metionina. Según un modo particular de realización, el grupo de metionina está unido al grupo de fórmula (I):



Según un modo de realización, la síntesis de un ELP alquenilado por medio del grupo de fórmula (I) se puede llevar a cabo mediante tioalquilación quimioselectiva en las cadenas laterales de metionina utilizando un éter alílico y glicídico según el procedimiento descrito en Petitdemange *et al.* (Bioconjug Chem. 17 de mayo de 2017; 28(5):1403-1412).

Según un modo de realización, el ELP alquenilado empleado en el contexto de la presente invención comprende al menos una ocurrencia de la secuencia de aminoácidos VPGMG en donde el residuo de metionina está alquenilado.

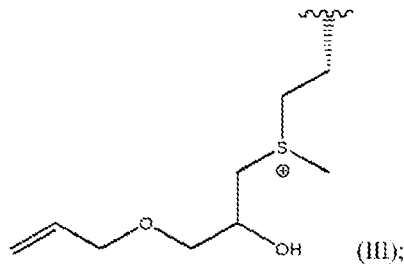
En un modo de realización, el ELP alquenilado tiene una estructura de fórmula (II)



en donde:

Z es un péptido que comprende entre 1 y 20 aminoácidos;

X representa un residuo de glicina, un residuo de valina o un residuo de metionina alquenilado, en concreto un residuo de metionina alquenilado de fórmula (III):



5 n es un número entero comprendido entre 1 y 200, más particularmente entre 10 y 200, de manera aún más particular entre 15 y 50, en concreto entre 20 y 40; y en donde la proporción entre la relación molar valina/metionina alquenilada en la posición X está comprendida entre 0:1 y 10:1, más particularmente entre 1:1 y 5:1, siendo dicha relación más particularmente 3:1.

10 Según un modo de realización, X representa un residuo de glicina o un residuo de metionina alquenilado, en concreto un residuo de metionina alquenilado de fórmula (III).

Según otro modo de realización, preferentemente, X representa un residuo de valina o un residuo de metionina alquenilado, en concreto un residuo de metionina alquenilado de fórmula (III).

15 Según un modo de realización, n es un número entero comprendido entre 30 y 50, en particular entre 35 y 45, siendo n más particularmente igual a 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45. Más particularmente, n es igual a 40.

Según un modo particular de realización, Z es un péptido cuyo residuo de aminoácido en el extremo amino-terminal es una metionina.

20 Según un modo particular de realización, Z no comprende la secuencia de aminoácidos IKVAV. Según otro modo de realización, los aminoácidos comprendidos en Z inmediatamente aguas arriba del motivo [VPGXG]_n corresponden al dipéptido MW. Z puede estar compuesto en concreto por el dipéptido MW o comprender este dipéptido. Como ejemplo, el péptido ELP20 descrito a continuación comprende una secuencia Z en donde el dipéptido MW se encuentra en su extremo C-terminal en la secuencia MGTELAASEFTHMW.

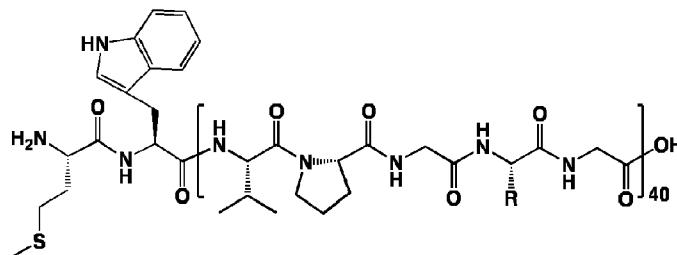
25 Según un modo de realización, el ELP utilizado es un péptido de fórmula Z-[VPGXG]_n en donde X es una metionina alquenilada.

30 Según otro modo de realización, el ELP empleado es un péptido de fórmula Z-[VPGXG]_n en donde la proporción entre la relación molar valina/metionina alquenilada en la posición X está comprendida entre 0:1 y 10:1, más particularmente entre 1:1 y 5:1, siendo dicha relación más particularmente 3:1.

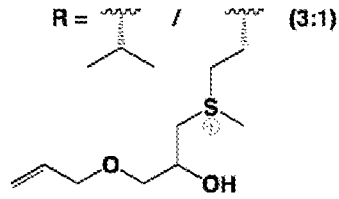
35 Según otro modo de realización, el ELP empleado es un péptido de fórmula Z-[VPGVGVPGMG(VPGVG)₂]_x, en particular MW[VPGVGVPGMG(VPGVG)₂]_x en donde x es un número entero comprendido entre 2 y 15, más particularmente entre 5 y 10.

40 Según un modo de realización, el ELP empleado se deriva de un péptido elegido entre el péptido MGTELAASEFTHMW[VPGMG]₂₀ (ELP20), el péptido MW[VPGVGVPGMG(VPGVG)₂]₅ (ELPM20) o el péptido MW[VPGVGVPGMG(VPGVG)₂]₁₀ (ELPM40) descrito en el documento WO2017021334, comprendiendo dicho péptido al menos un residuo de metionina alquenilado.

Según un modo particular de realización, el ELP tiene la siguiente estructura:

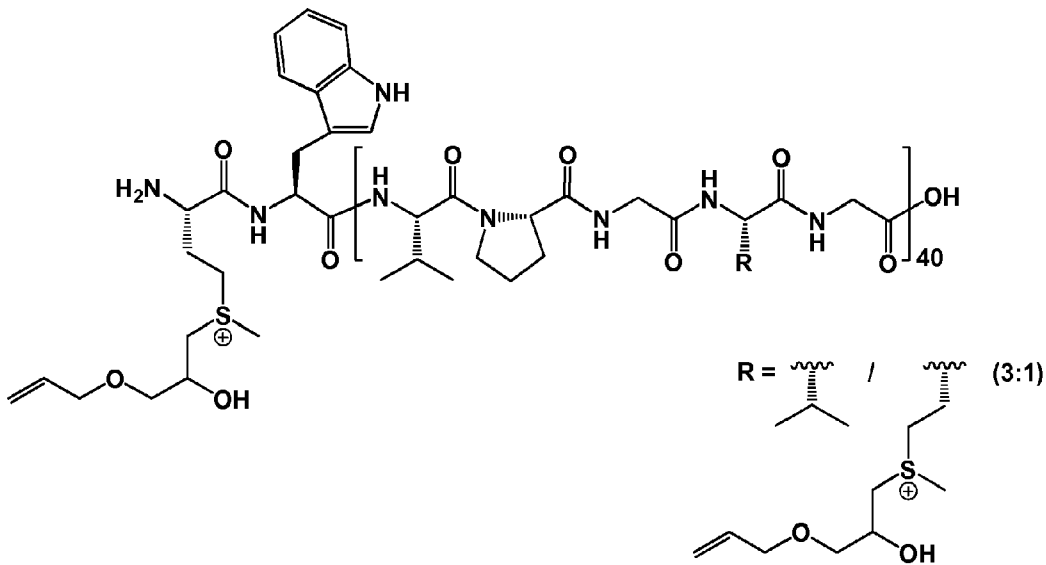


45

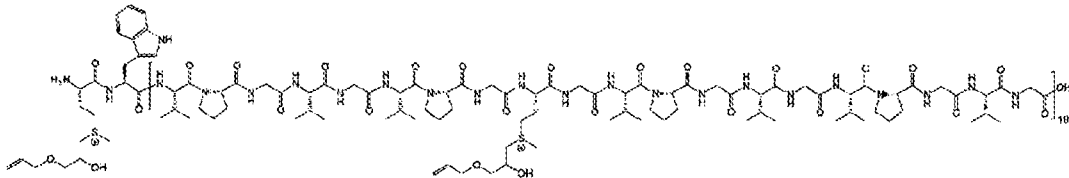


más particularmente la estructura MW[VPGVGVPGM_aG(VPGVG)₂]₁₀ (ELP-M(alqueno)-40), donde M_a representa el residuo de metionina alquenilado de fórmula (III) anterior.

5 Según una variante de realización de todos los ELP descritos anteriormente, la metionina amino-terminal de dichos ELP es una metionina alquenilada, en concreto una metionina alquenilada de fórmula (III) anterior. A modo de ilustración, el ELP puede tener, en concreto, la siguiente estructura:



10 En un modo de realización, esta estructura se puede representar alternativamente según la siguiente fórmula:



15 El componente iii) del hidrogel es un péptido capaz de reclutar células neuronales y/o endoteliales. Se pueden citar en concreto, como péptidos capaces de reclutar células endoteliales, los péptidos REDV, RGD y GRGDSP derivados de fibronectina, IKLLI, IKVAV, PDSGR y YIGSR, derivados de laminina, y el péptido DGEA derivado del colágeno de tipo I. Como péptidos capaces de reclutar células neuronales, los autores pueden citar, en concreto, los péptidos YIGSR, RNIAEIKDI e IKVAV derivados de laminina. Según un modo particular de realización, el péptido capaz de reclutar células neuronales y/o endoteliales es un péptido IKVAV, es decir, un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos IKVAV derivada de la laminina A. En un modo particular de realización, el péptido capaz de reclutar células neuronales y/o endoteliales incluido en el hidrogel de la invención es un péptido, en concreto un péptido que comprende la secuencia IKVAV, que comprende residuos de cisteína en cada uno de sus extremos. Los residuos de cisteína se pueden unir covalentemente de manera directa a la secuencia de aminoácidos IKVAV o mediante espaciadores. Según un modo particular de realización, los residuos de cisteína están unidos al péptido capaz de reclutar células neuronales y/o endoteliales, en concreto a un péptido IKVAV, a través de un espaciador, en concreto un espaciador peptídico o pseudopeptídico. El espaciador puede ser en concreto un aminoácido o una secuencia de aminoácidos (en concreto un di- o tripéptido), en concreto un aminoácido beta, más particularmente un aminoácido beta-Ala. De este modo, según un modo particular de realización, el péptido capaz de reclutar células neuronales y/o endoteliales es un péptido IKVAV de fórmula Cys-{espaciador}-Ile-Lys-Val-Ala-Val-{espaciador}-Cys, en concreto el péptido de fórmula Cys-{Beta-Ala}-Ile-Lys-Val-Ala-Val-{Beta-Ala}-Cys.

La cantidad de componentes de hidrogel puede variar en gran medida, siempre que el hidrogel resultante promueva

la neurotización, la osteogénesis y/o la angiogénesis. Según un modo particular de realización, los diferentes componentes están en una cantidad que respeta una relación molar tiol/alqueno comprendida entre 10:1 y 1:10, en concreto entre 5:1 y 1:5, en particular entre 2:1 y 1:2. Según un modo particular de realización, la relación tiol/alqueno es equimolar (es decir, corresponde a una relación molar 1:1). Se entiende que los grupos tioles están presentes en el polímero de reticulación y/o en el péptido capaz de reclutar células neuronales y/o endoteliales, en concreto un péptido IKVAV como se ha descrito anteriormente. De este modo, el hidrogel puede comprender cantidades variables de cada uno de sus componentes, respetando las relaciones definidas anteriormente. Por ejemplo, los grupos tioles transportados por el péptido IKVAV pueden representar entre un 10 y un 75 % en moles de todos los grupos tioles proporcionados por el péptido IKVAV y el polímero de reticulación, más particularmente entre 20 y 60 % en moles, en particular entre un 25 y un 50 % en moles de todos los grupos tioles proporcionados por el péptido IKVAV y el polímero de reticulación. Según un modo particular de realización, los grupos tioles transportados por el péptido IKVAV representan el 25 % en moles de todos los grupos tioles proporcionados por el péptido IKVAV y el polímero de reticulación. En otro modo particular de realización, los grupos tioles transportados por el péptido IKVAV representan el 50 % en moles de todos los grupos tioles proporcionados por el péptido IKVAV y el polímero de reticulación.

Las proporciones de los componentes del hidrogel se eligen también de manera que se obtenga un hidrogel que presente propiedades reológicas adaptadas al desarrollo de las células, en concreto células neuronales, óseas o endoteliales, en particular células neuronales. La invención permite así adaptar de forma muy precisa la estructura del hidrogel al tipo o tipos de células cuyo desarrollo debe favorecerse. Según un modo de realización, la rigidez del hidrogel responde al parámetro del módulo de almacenamiento G' comprendido en el siguiente intervalo: $1 \text{ kPa} < G' < 5 \text{ kPa}$, en particular $1 \text{ kPa} < G' < 1,5 \text{ kPa}$.

En otro modo particular de realización, la concentración del hidrogel está comprendida entre aproximadamente 5 y aproximadamente 15 % en densidad (p/v), en particular entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8 % (p/v), siendo esta densidad más particularmente igual a aproximadamente 7,5 % (p/v).

Por otro lado, el hidrogel según la invención presenta una microporosidad, y puede comprender poros de tamaño promedio que varían en concreto entre 5 y 20 μm , más particularmente entre 10 y 17 μm .

Según un modo particular de realización, el hidrogel de la invención puede comprender uno o varios otros elementos, otras secuencias peptídicas para determinar otras funciones, o incluso agentes bioactivos como factores de crecimiento, en concreto para estimular aún más la neurotización, la osteogénesis y/o la angiogénesis. Sin embargo, según un modo particular de realización, el hidrogel está desprovisto de factores de crecimiento o sólo contiene del 0 al 10 % en peso con respecto al peso total del hidrogel, más particularmente de 0 a 5 %, aún más particularmente de 0 a 1 %, en particular de 0 a 0,1 % en peso con respecto al peso del hidrogel. Como se observa a continuación, el hidrogel también se puede utilizar como vehículo de terapia celular. De este modo, un hidrogel como se ha definido anteriormente también puede comprender células de interés terapéutico, por ejemplo células madre, en concreto células madre inducidas hacia un linaje de interés, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales estromales derivadas de la médula ósea o del tejido adiposo, células madre neuronales, o una mezcla de células de linajes diferentes para estimular un proceso de comunicación celular. En un modo particular de realización, las células son células madre, excluyendo las células madre embrionarias humanas. Las células se introducen en el hidrogel después de la formación de dicho hidrogel, mediante la puesta en contacto de las células y el hidrogel y el cultivo durante un tiempo suficiente (en concreto durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o al menos 7 días) para que las células puedan colonizar el hidrogel. El hidrogel según la invención también puede incluir nanopartículas de componentes minerales, en concreto hidroxiapatita o fosfato de calcio (en concreto en una cantidad comprendida entre 10 y 40 % (p/v)), a fin de aumentar el potencial osteogénico del hidrogel.

El hidrogel de la invención puede ser fabricado por medio de una mezcla de estos diferentes componentes i) a iii) y cualquier otro elemento opcional tal como factores de crecimiento. Los componentes i) a iii) y la cantidad de estos componentes i) a iii) se eligen a fin de preparar un hidrogel que presente propiedades físicas y de soporte adaptadas al problema planteado a su usuario. De manera ventajosa, la formación del hidrogel por reticulación se lleva a cabo bajo la acción de un estímulo como un cambio de temperatura, de pH, o mediante un agente de reticulación, en concreto un agente de reticulación fotosensible (o fotoiniciador). Así, se puede citar a modo de ilustración la inducción de una fotopolimerización mediante un fotoiniciador como el compuesto Irgacure 2959, en concreto utilizado a una densidad de 0,5 % (p/v) en la mezcla, y activado por luz UV-visible ($\lambda = 305\text{-}405 \text{ nm}$, en concreto a 305 nm). En otra variante, el fotoiniciador puede elegirse en concreto entre fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio (LAP) y riboflavina. La concentración de LAP puede variar de 0,005 % a 0,5 % (p/v) en la mezcla, y su fotoiniciación puede desencadenarse a una longitud de onda comprendida entre 365 y 475 nm.

Según un aspecto, la invención se refiere a un hidrogel susceptible de ser obtenido, u obtenido, mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

(a) la mezcla de

- i) un polipéptido de tipo elastina que comprende al menos un residuo de metionina alquenilado y
- ii) un péptido capaz de reclutar células neuronales y/o endoteliales, en concreto un péptido IKVAV, y

opcionalmente (iii) un polímero de reticulación con extremos tioles; y
 iv) un iniciador de polimerización, en concreto un fotoiniciador (y posiblemente otro componente tal como uno o más factores de crecimiento); y

5 b) la aplicación de un estímulo, en concreto de una radiación luminosa, en concreto UV, para activar la polimerización.

De manera ventajosa, como se ha indicado anteriormente, las propiedades reológicas del hidrogel se pueden definirse con gran precisión. Por otro lado, los inventores pudieron demostrar que el hidrogel según la invención es degradable y presenta una estructura porosa. Por último, los inventores pudieron demostrar que este hidrogel es adecuado para el cultivo de tipos celulares muy diferentes, a saber, neuronas, células mesenquimales, células óseas, células endoteliales o sus progenitores, ya que estas células pueden migrar dentro de la estructura del hidrogel y que no tiene ningún efecto citotóxico. Reúne así todas las propiedades ventajosas útiles para el desarrollo de una herramienta adaptada a la regeneración tisular.

15 Por tanto, el hidrogel según la invención es capaz de soportar eficazmente el cultivo *in vitro* de diferentes tipos celulares. En consecuencia, según un modo particular de realización, la invención se refiere a un nuevo soporte tridimensional capaz de albergar *in vitro* diferentes células de interés para la regeneración ósea, en concreto neuronales, óseas o endoteliales. Por tanto, la invención proporciona a los expertos en la materia un sistema particularmente ventajoso de cultivo celular en 3D que permite a las células desarrollarse en un entorno favorable, pero también estudiar las interacciones de diferentes tipos celulares entre sí. Este parámetro es importante para estudiar los fenómenos de regeneración que pueden requerir diálogos complejos entre diferentes tipos celulares. El soporte de la invención puede utilizarse en concreto para albergar células osteoformadoras y endoteliales, y para estudiar el efecto angiogénico, osteogénico y de neurotización en un método de cultivo celular *in vitro*, que comprende el cultivo de células en un soporte como se ha definido anteriormente. El uso del soporte según la invención asimismo puede comprender la adición de un agente al cultivo, tal como un factor de crecimiento o cualquier otro agente que tenga un efecto biológico o capaz de tener un efecto biológico (agente candidato) para determinar su efecto sobre uno o más parámetros y respuestas celulares tales como el crecimiento de células, la inducción de la quiescencia, muerte celular, secreción de proteínas u otras moléculas o iones (en concreto iones de calcio, potasio), o incluso la expresión de ciertos genes.

Según otro aspecto, el hidrogel de la invención se usa en un método de tratamiento, en concreto como implante. El hidrogel se utiliza en concreto en un método de tratamiento de medicina regenerativa. Puede utilizarse en concreto para estimular la inervación de un tejido, en concreto un tejido óseo, y puede utilizarse en concreto en ingeniería ósea. De manera ventajosa, el hidrogel según la invención favorece la neurotización, en concreto en un contexto de regeneración. Más particularmente, el hidrogel según la invención se puede utilizar ventajosamente para reclutar y estimular el sistema nervioso sensorial, más particularmente para promover la regeneración ósea. El hidrogel según la invención también se puede emplear a fin de optimizar o restaurar la vascularización y la inervación de un tejido.

40 Según otro modo de realización, el hidrogel se puede utilizar como vehículo de terapia celular. De este modo, un hidrogel como se ha definido anteriormente colonizado previamente por células de interés terapéutico, por ejemplo mediante células madre, en concreto células madre inducidas en un linaje de interés, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales estromales derivadas de la médula ósea o del tejido adiposo, células madre neuronales, o una mezcla de células de linajes diferentes. Un hidrogel de este tipo se puede utilizar en un método de tratamiento mediante regeneración celular o tisular.

El hidrogel según la invención también se puede utilizar para modificar sistemas de implante, para mejorar su biocompatibilidad y su integración.

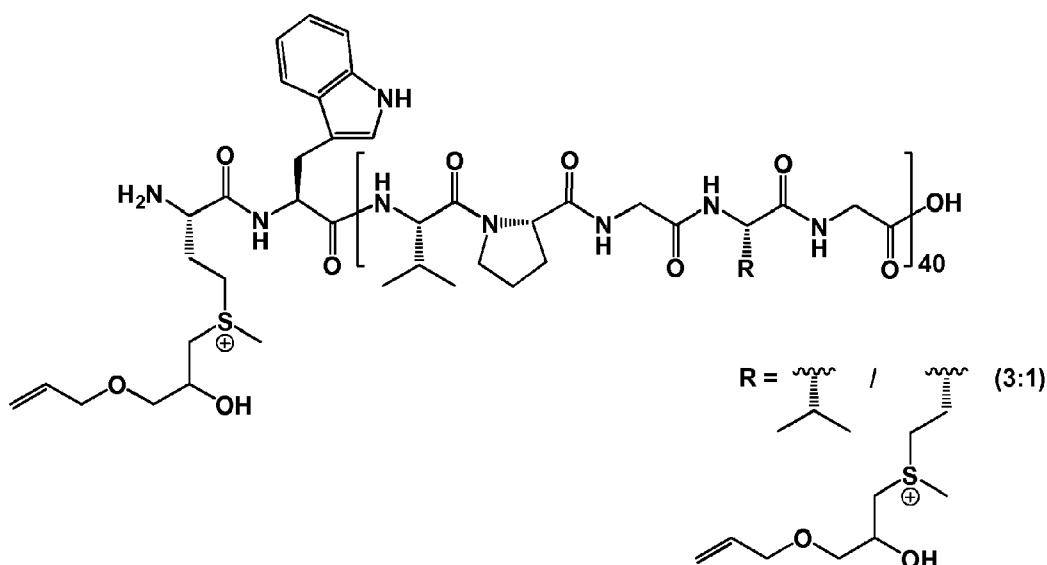
50 Ejemplos

Producción del péptido ELP-M(alqueno)-40:

El artículo de Petitdemange *et al.* (Biomacromolecules. 13 de febrero de 2017;18(2):544-550. doi:10.1021/acs.biomac.6b01696. Epub del 27 de enero de 2017. PubMed PMID: 28075561) describe la construcción del vector de expresión del péptido MX[VPGVGVPGMG(VPGVG)₂]₁₀ (ELPM40), su expresión en *E. coli*, su aislamiento a partir de lisados bacterianos, su purificación y su caracterización.

El método de producción del péptido ELP-M(alqueno)-40, de estructura:

60



mediante tioalquilación quimioselectiva de las cadenas laterales de metionina del péptido ELPM40 utilizando éter alílico y glicídico se describe en Petitdemange *et al.* (Bioconjug Chem. 17 de mayo de 2017;28(5):1403-1412. doi: 10.1021/acs.bioconchem.7b00082. Epub del 18 de abril de 2017. PubMed PMID: 28381088).

En el resto de la parte experimental, el término ELPM40 se utiliza para designar el péptido ELP-M(alqueno)-40.

Desarrollo de un hidrogel compuesto

Producción del hidrogel

Los hidrogeles producidos contienen el péptido ELPM40, un PEG con extremos tioles (SH-PEG, 20 kDa; JenKem, USA) y el péptido de adhesión Cys- $\{\beta$ -Ala $\}$ -Ile-Lys-Val-Ala-Val- $\{\beta$ -Ala $\}$ -Cys (IKVAV) o una versión aleatoria Cys- $\{\beta$ -Ala $\}$ -Val-Lys-Ala-Ile-Val- $\{\beta$ -Ala $\}$ -Cys (VKAIIV), en una relación tio/alqueno equimolar. La fotopolimerización se llevó a cabo utilizando el fotoiniciador Irgacure 2959 (0,5 % p/v) expuesto a luz UV de longitud de onda de 305 nm durante 8 minutos, después de una reacción tiol-eno. La figura 1 muestra una representación esquemática del hidrogel así obtenido.

Se analizaron diferentes relaciones de masa de ELP y PEG para obtener una rigidez óptima y una unión de neuronas sensoriales y un crecimiento de neuritas. Brevemente, se substituyó SH-PEG con el péptido de adhesión en diferentes proporciones. Las composiciones analizadas son las siguientes:

- (i) ELPM40 + PEG, donde el 100 % (mol) de los grupos tioles están representados por SH-PEG,
- (ii) ELPM40 + 25 % IKVAV o VKAIIV, donde el 25 % (mol) de los grupos tioles están representados por el péptido de adhesión, y
- (iii) ELPM40 + 50 % IKVAV o VKAIIV, donde el 50 % (mol) de los grupos tioles están representados por el péptido de adhesión.

Propiedades reológicas

Las propiedades reológicas de los hidrogeles se evaluaron después de 24 horas de remojo en PBS, midiendo la dependencia de la frecuencia de los módulos elástico (G') y de pérdida (G''). Se realizaron barridos de frecuencia en composiciones ELPM40 + PEG a diferentes concentraciones de hidrogel, es decir, a 5 %, 7,5 %, 10 % y 15 % (p/v). Las mediciones se llevaron a cabo a 37 °C.

Los inventores pudieron demostrar que el módulo elástico aumentó proporcionalmente con respecto a la concentración final del hidrogel (figura 2).

Análisis estructural mediante microscopía electrónica de barrido

Se llevó a cabo un análisis de criomicroscopía electrónica de barrido para determinar el tamaño de los poros de los hidrogeles producidos en diferentes concentraciones y visualizar su estructura.

Todas las composiciones de hidrogeles presentan una estructura porosa (figuras 3A-E), con un tamaño de poro que varía de $10,49 \pm 1,61 \mu\text{m}$ (ELPM40 + 25 % IKVAV) a $16,39 \pm 2,81 \mu\text{m}$ (ELPM40 + 50 % IKVAV). Las composiciones

de hidrogeles que comprenden un 25 % de péptido de adhesión presentan tamaños de poros más pequeños en comparación con las composiciones obtenidas en otras condiciones (figura 3F).

Análisis de degradación *in vitro* del hidrogel:

5 Se incubaron 15 µl de hidrogel en 150 µl de una solución de proteinasa K (0,5 U/ml) (Amresco, n.º 0706) en un tampón 50 mM Tris Base, EDTA 1 mM, CaCl₂ 5 mM y Triton X-100 al 0,5 % (v/v) (pH 8,0) durante 7 h a 37 °C. El contenido de grupos aminos libres, expresado por el número de grupos aminos libres presentes por 1000 aminoácidos (n/1000) se determinó utilizando ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS) según el procedimiento descrito en Gilbert *et al.* J Biomed Mater Res 1990, 24, 1221. El contenido de grupos aminos libres se calculó utilizando un coeficiente de absorción molar de 14600 l/mol/cm para trinitrofenil lisina (Wang *et al.*, Biochim Biophys Acta 1978, 544, 555).

Después de la incubación con proteinasa K, se pudieron detectar aminos primarias libres en solución para todas las composiciones de hidrogeles (figura 4), indicando que el proceso de reticulación no interfirió con las propiedades de degradación *in vitro*. Se trata de una propiedad importante para materiales con aplicaciones biomédicas. Diferentes tipos celulares deben poder introducirse en la estructura del hidrogel y migrar en la misma. El mecanismo más común de migración celular es la secreción de proteasas que digieren la estructura del hidrogel a bajas velocidades, lo que permite la colonización del hidrogel por las células.

Evaluación biológica por medio de células primarias

Aislamiento de células y cultivo:

Las neuronas sensoriales (SN) primarias se obtuvieron a partir de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) de ratas Wistar de 6 a 10 semanas de edad, según un procedimiento descrito por Malin *et al.*, Nat Protoc 2007, 2, 152.

Se aislaron células estromales mesenquimales derivadas de la médula ósea (BMSC) de ratas Wistar de 6 a 10 semanas de edad. En resumen, se extrajeron los fémures y las tibias de los animales y se cortaron sus extremos para exponer la médula ósea. Los huesos se transfirieron a tubos de 1,5 ml y luego se centrifugaron a 1500 x g durante 30 s para expulsar la médula ósea. Los sedimentos obtenidos se resuspendieron luego en DMEM con un contenido bajo en glucosa (Gibco) complementado con suero bovino fetal al 10 % (v/v) (PANTM-Biotech, Aidenbach, Alemania) y 1 % (v/v) de penicilina/estreptomicina, luego se pasaron por agujas de 16 G y 21 G de 4 a 6 veces. Luego se sembró el contenido obtenido de un fémur y una tibia en un matraz de 75 cm² y se incubó en una incubadora humidificada (37 °C y 5 % de CO₂). El medio de cultivo se cambió dos veces por semana para eliminar las células no adherentes. Las células adherentes se cultivaron hasta alcanzar el 90 % de confluencia, luego se transfirieron a recipientes con una superficie mayor. Las células se utilizaron hasta el paso P3. Cuando se combinaron con hidrogeles, las BMSC se cultivaron en un medio osteogénico, que corresponde al medio de cultivo mencionado anteriormente, complementado con 10⁻⁹ M de dexametasona (Sigma-Aldrich), β-glicerofosfato 10 mM (Sigma-Aldrich) y 50 µg/ml de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich)

Las células madre endoteliales derivadas de la médula ósea (EC) se adquirieron de Cell Biologics (número de catálogo RA-6221). Las células se cultivaron en un medio EGM-2 MV (Lonza-Verviers, Francia) en placas recubiertas con gelatina (2 %) que contenían todos los complementos del kit y suero bovino fetal al 5 % (v/v) (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) y se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda, con 5 % de CO₂. Las células se transfirieron a otra placa recubierta con gelatina (2 %) cuando alcanzaron el 90 % de confluencia.

En los hidrogeles de la invención se estudiaron los tres tipos celulares debido a su interés en la ingeniería tisular: (i) las BMSC debido a su potencial de diferenciación osteoblástica, (ii) las EC por su papel importante en la angiogénesis, y (iii) las neuronas sensoriales para demostrar la capacidad del tejido nervioso para adherirse y permitir el crecimiento de neuritas en hidrogeles.

Cada tipo celular fue caracterizado antes de su cultivo en los hidrogeles de la invención.

Actividad metabólica celular de cada tipo de célula en los hidrogeles:

La actividad metabólica de las células se determinó mediante un ensayo basado en el uso de resazurina (O'Brien *et al.*, Eur J Biochem 2000, 267, 5421). Brevemente, las células se sembraron en hidrogeles al 7,5 % (p/v) a una densidad de 20.000 células/cm² en una placa de 96 pocillos. Se añadieron a cada pocillo 150 µl de medio celular que contenía resazurina (0,01 mg/ml) y la microplaca se incubó a 37 °C durante 3 h. A continuación, se transfirieron 100 µl de sobrenadante a otra microplaca de 96 pocillos y se midió la fluorescencia (exc = 530 nm, em = 590 nm, Víctor X3, Perkin Elmer). La actividad metabólica se midió los días 4 y 7 (n = 5).

La figura 5 presenta los resultados obtenidos. Los hidrogeles permitieron la fijación y cultivo de las diferentes células primarias analizadas sin efecto citotóxico. Para las EC, la actividad metabólica fue mayor en el hidrogel ELP40 + 25 % IKVAV, con respecto al control de péptido aleatorio correspondiente. Para las SN, el hidrogel ELP40 + 50 % IKVAV induce una mayor actividad metabólica con respecto a la composición ELP40 + PEG.

Otros experimentos también mostraron que los hidrogeles que comprenden otra secuencia ELP asociada con PEG, no inducen una respuesta inflamatoria cuando se implantan por vía subcutánea en ratones.

5 Microscopía confocal de hidrogeles que contienen células:

Las células BMSC, EC y SN se sembraron en hidrogeles a una concentración de 20.000 células/cm² y se cultivaron durante 7 días.

10 Después del cultivo, las SN se fijaron a 4 °C durante 30 minutos con formaldehído al 4 % (p/v), se permeabilizaron con triton X-100 al 0,1 % (v/v) durante 30 minutos a 4 °C, se bloquearon con BSA al 1 % (p/v) durante 1 hora. Se utilizó un anticuerpo primario anti-tubulina beta III para la detección de células. Para las BMSC y las EC, los filamentos de actina se marcaron utilizando faloidina conjugada con Alexa Fluor 568. La morfología de las SN se visualizó utilizando un microscopio confocal (SPE, Leica Microsystems). La cuantificación de la longitud de las neuritas se llevó a cabo
15 utilizando el software ImageJ, con la herramienta "simple neurite tracer". Las neuritas se midieron trazando una trayectoria a partir del soma hasta el extremo visible, luego la longitud se convirtió a µm.

Después de 7 días de cultivo, las CE penetraron en los hidrogeles y formaron en los mismos estructuras ramificadas estables (figura 6). Estas estructuras son importantes para el suministro de oxígeno y nutrientes al tejido vascularizado.
20 Los inventores pudieron observar que las estructuras ramificadas se formaron en el hidrogel ELPM40 + 50 % IKVAV y en las dos composiciones que comprenden el péptido aleatorio. Aunque la secuencia aleatoria del péptido de adhesión no tiene la misma función de adhesión que el péptido IKVAV, en las composiciones de hidrogel que contienen el péptido aleatorio no se observó ninguna diferencia morfológica con respecto a la composición ELPM40 + 50 %
25 IKVAV. Es posible que este fenómeno se deba al aumento de cargas positivas debido a los residuos de lisina.

Cuando las células BMSC se asociaron con los hidrogeles, se desarrollaron en agregados esféricos para todas las composiciones (figura 7). Nuestro estudio muestra que, para la composición ELPM40 + 50 % IKVAV, algunas BMSC que entraron en la estructura del hidrogel, formaron ramificaciones. Algunas células eran binucleadas, con una conexión discreta entre los dos núcleos, lo que sugiere que las células pueden dividirse dentro del gel (figura 7F).
30

En cuanto a las SN, las células presentaron un comportamiento distinto dependiendo de la composición del hidrogel (figura 8). En ELPM40 + PEG, las células formaron agregados más grandes y las neuritas no se dispersaron por toda la estructura del hidrogel, sino que rodearon el cuerpo celular (figura 8A). Cuando se añade la secuencia IKVAV a la composición de hidrogel, las neuritas pueden extenderse. En la composición ELPM40 + 50 % IKVAV, las células adoptaron una distribución más dispersa con una compleja red de neuritas, grande y ramificada en comparación con las otras composiciones (figura 8D). La medición de la longitud de las neuritas confirma esta observación morfológica. En efecto, las SN cultivadas en la composición ELPM40 + 50 % IKVAV pudieron formar neuritas más largas (figura 8F).
35

Es importante señalar que los medios de cultivo utilizados en este estudio no contienen factores de crecimiento (en concreto NGF), con el objetivo de analizar el impacto específico del hidrogel en la estructura y la expansión de las neuritas. Según nuestros resultados, la longitud promedio de las neuritas en la composición ELPM40 + 50 % IKVAV es de 266,44 ± 63,95 µm, lo cual es equivalente a lo medido en otros estudios realizados en 2D donde el medio de cultivo fue complementado con NGF.
40

45 Análisis molecular de marcadores osteo-específicos expresados en BMSC en el hidrogel:

Los ARN totales se extrajeron de BMSC utilizando el kit RNeasy® Plus Micro Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante. Se transcribieron inversamente 100 ng de ARN total obtenido de 4 pocillos en ADNc utilizando el kit Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Scientific™, Termo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), según el protocolo del fabricante. Se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR, utilizando el sistema CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) y se analizaron por el software CFX Manager™, versión 3.0 (Bio-Rad Laboratories). Los cebadores utilizados son los siguientes (SEQ ID NO: 1 a 12):
50

55 *Runx2* D: 5' CCTTCCCTCCGAGACCCTAA 3' e I: 5' ATGGCTGCTCCCTTCTGAAC 3',
Sp7 D: 5' TGCTTGAGGAAGAAGCTCACTA 3' e I: 5' GGGGCTGAAAGGTCAAGTGT 3',
Ctnnb1 (βcat) D: 5' GAAAATGCTTGGGTCGCCAG 3' e I: 5' CGCACTGCCATTTAGCTCC 3',
Bsp1 (Opn) D: 5' GAGTTTGGCAGCTCAGAGGA 3' e I: TCTGCTTCTGAGATGGGTCA 3',
Smad1 D: 5' ATGGACACGAACATGACGAA 3' e I: 5' GCACCAGTGTTTTGGTTCCT 3',
60 *Rplp0* D: 5' CACTGGCTGAAAAGGTCAAGG 3' y 5' GTGTGAGGGGCTTAGTCGAA 3', y
Tek D: 5' CCACAGATAGAGGATTTGCCAG 3' e I: 5' AAGTCATTTGGTTGGAGCACTG 3'.

La expresión se cuantificó utilizando valores de ciclo umbral (Ct) y los niveles de expresión de ARNm se calcularon según el método 2^{-DDCt}.
65

Para determinar si las composiciones de hidrogeles pueden soportar la diferenciación osteogénica de BMSC, se

analizó un grupo de marcadores osteogénicos de diferenciación temprana (*Runx2* y *Sp7*) y de diferenciación tardía (*Opn*), así como genes relacionados con la activación de las vías de señalización osteogénicas (*Smad1* y β cat). Por otro lado, se analizaron factores clave para el proceso de reparación ósea, que inducen una vascularización y la diferenciación osteoblástica: *vegfa* y *bmp2*, respectivamente (Figura 9).

5 Después de 7 días de cultivo en un medio osteogénico, se observó un aumento en la expresión de *Runx2* y *Sp7* en la composición ELPM40 + 50 % IKVAV con respecto a ELPM40 + PEG, y la expresión de *Opn* aumenta en la composición ELPM40 + 50 % IKVAV con respecto al control de péptido aleatorio (figura 9). Cuando se analizaron las vías de señalización que podrían desencadenar la diferenciación osteogénica, la expresión de *Smad1* y β cat aumentó en
 10 ELPM40 + 50 % IKVAV con respecto a ELPM40 + PEG, lo que sugiere que ambas vías de señalización desempeñan un papel en la diferenciación de BMSC asociada con estos hidrogeles. Por tanto, estos resultados muestran que los péptidos ELP pueden representar muy buenos sustratos que promueven la osteogénesis de las BMSC. Por otro lado, los niveles de expresión de todos los genes analizados en este estudio aumentaron de manera dependiente de la dosis con respecto a la concentración del péptido IKVAV. La sobreexpresión de genes que desencadenan y actúan
 15 directamente en diferentes etapas de la diferenciación osteogénica respalda el papel de la composición ELPM40 + 50 % IKVAV en la diferenciación de las células BMSC hacia el linaje osteogénico. El factor angiogénico *Vegfa* vio incrementada su expresión con la composición ELPM40 + 50 % IKVAV con respecto a ELPM40 + PEG o ELPM40 + 50 % VKAIV. La expresión de *Bmp2* aumentó en presencia de ELPM40 + 25 %. Curiosamente, la expresión de todos los genes estudiados aumentó con la composición ELPM40 + 50 % IKVAV con respecto a la composición ELPM40 +
 20 PEG, y este aumento fue proporcional a la concentración de IKVAV.

A fin de determinar el potencial proangiogénico de los hidrogeles de la invención, se cultivaron células endoteliales primarias de médula ósea de rata en diferentes composiciones de hidrogel. Después de 7 días de cultivo, la expresión de *Tek*, que desempeña un papel en la formación de vasos, se evaluó (figura 10). Una sobreexpresión de *Tek* se
 25 observó con la composición que comprendía 50 % de IKVAV con respecto a aquellas que contienen PEG o el péptido aleatorio VKAIV ($p < 0,05$).

Por último, se implantó por vía subcutánea la composición ELPM40 + 50 % IKVAV o VKAIV (Figura 11). Ninguna desencadenó señales importantes de inflamación, como lo demuestra la ausencia de células gigantes multinucleadas. Cuando se cuantificaron los vasos sanguíneos en la región que rodea la zona de implantación, se observó una mayor
 30 densidad de vasos con las composiciones que contenían IKVAV con respecto a aquellas que contienen el péptido VKAIV después de 26 días de implantación, la densidad de los vasos aumentando con el tiempo. Estos resultados están respaldados por los datos obtenidos *in vitro* y la expresión de genes de células endoteliales, mostrando un aumento de la expresión de *Tek* en las composiciones que contienen 50 % de IKVAV.
 35

En conclusión, se produjeron hidrogeles funcionales basados en ELP-M(alqueno)-40, SH-PEG y un péptido sintético que comprende la secuencia de adhesión IKVAV. Estos hidrogeles tienen la ventaja de tener propiedades reológicas adaptables con precisión. A efectos de este estudio, los hidrogeles seleccionados tienen una concentración másica adaptada al crecimiento de SN. Estos hidrogeles son, por otra parte, degradables *in vitro*, y tienen una estructura
 40 porosa.

La evaluación biológica permitió demostrar que los hidrogeles de la invención soportan el cultivo de células EC, BMSC y SN, ya que estas células pudieron migrar dentro de la estructura del hidrogel después de 7 días de cultivo, y no se observó ningún efecto citotóxico de los hidrogeles. En cuanto al potencial de vascularización, las CE pudieron formar
 45 estructuras ramificadas estables en composiciones que comprendían 50 % de péptido de adhesión. En cuanto al potencial osteogénico, la morfología de las BMSC era de tipo organización esferoide en todas las composiciones, y cuando las células se cultivaron en una composición ELPM40 + 50 % IKVAV, se sobreexpresó un conjunto de genes importantes para la diferenciación osteogénica. Por último, en cuanto al potencial de neurotización, las SN cultivadas en la composición ELPM40 + 50 % IKVAV presentaron una red de neuritas más compleja y una mayor longitud de neuritas, siendo este última comparable a la obtenida en otros cultivos de neuritas que se realizan en medios
 50 complementados con NGF, un factor de crecimiento conocido por promover la expansión de las neuritas.

Los datos presentados en esta solicitud muestran que la estrategia propuesta, que se basa en hidrogeles específicos que son los primeros soportes desarrollados que permiten una vascularización, una osteogénesis y una neurotización
 55 sin la presencia de otros factores celulares o factores de crecimiento, presenta características interesantes para aplicaciones biomédicas.

REIVINDICACIONES

1. Hidrogel que comprende:
- 5 i) un polipéptido de tipo elastina que comprende al menos un residuo alquenilado antes de la formación del hidrogel;
y
ii) un péptido capaz de reclutar células neuronales y/o endoteliales.
2. Hidrogel según la reivindicación 1, que comprende además:
- 10 iii) un polímero de reticulación con extremos tioles antes de la formación del hidrogel.
3. Hidrogel según la reivindicación 1 o 2, en donde el péptido ii) es un péptido IKVAV, en concreto un péptido de fórmula Cys-{Beta-Ala}-Ile-Lys-Val-Ala-Val-{Beta-Ala}-Cys.
- 15 4. Hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** el polipéptido de tipo elastina es un polipéptido que comprende al menos una ocurrencia de la secuencia VPGMG.
5. Hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** el polipéptido de tipo elastina es el polipéptido MGTELAAASEFTHMW[VPGMG]₂₀ (ELP20), el polipéptido MW[VPGVGVPGMG(VPGVG)₂]₅ (ELPM20) o el polipéptido MW[VPGVGVPGMG(VPGVG)₂]₁₀ (ELPM40).
- 20 6. Hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, **caracterizado por que** el polímero de reticulación con extremos tioles es un polímero multibrazos.
- 25 7. Hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, **caracterizado por que** el polímero de reticulación es un poli(etilenglicol) con 4 brazos con extremos tioles, teniendo en concreto una masa molecular promedio comprendida entre 10 y 30 kDa en masa, en concreto una masa molecular promedio de 20 kDa en masa.
- 30 8. Hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, **caracterizado por que** el polímero de reticulación con extremos tioles, el polipéptido de tipo elastina que comprende un residuo de metionina alquenilado y el péptido IKVAV están presentes en una relación tiol/alqueno equimolar.
9. Hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por que** la concentración del hidrogel está comprendida entre 5 y 15 % en densidad (p/v), en particular entre 7 y 8 % (p/v).
- 35 10. Hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado por que** el módulo de almacenamiento G' del hidrogel está comprendido entre 1 y 1,5 kPa.
- 40 11. Hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además al menos un agente biológicamente activo, en concreto al menos un factor de crecimiento.
12. Soporte tridimensional capaz de albergar células de interés, **caracterizado por que** comprende un hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 45 13. Hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o soporte según la reivindicación 12, para su uso como medicamento.
14. Hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o soporte según la reivindicación 12, para su uso en un método de regeneración ósea.
- 50 15. Método *in vitro* de cultivo celular, que comprende el cultivo de células en un hidrogel como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o en un soporte según la reivindicación 12.

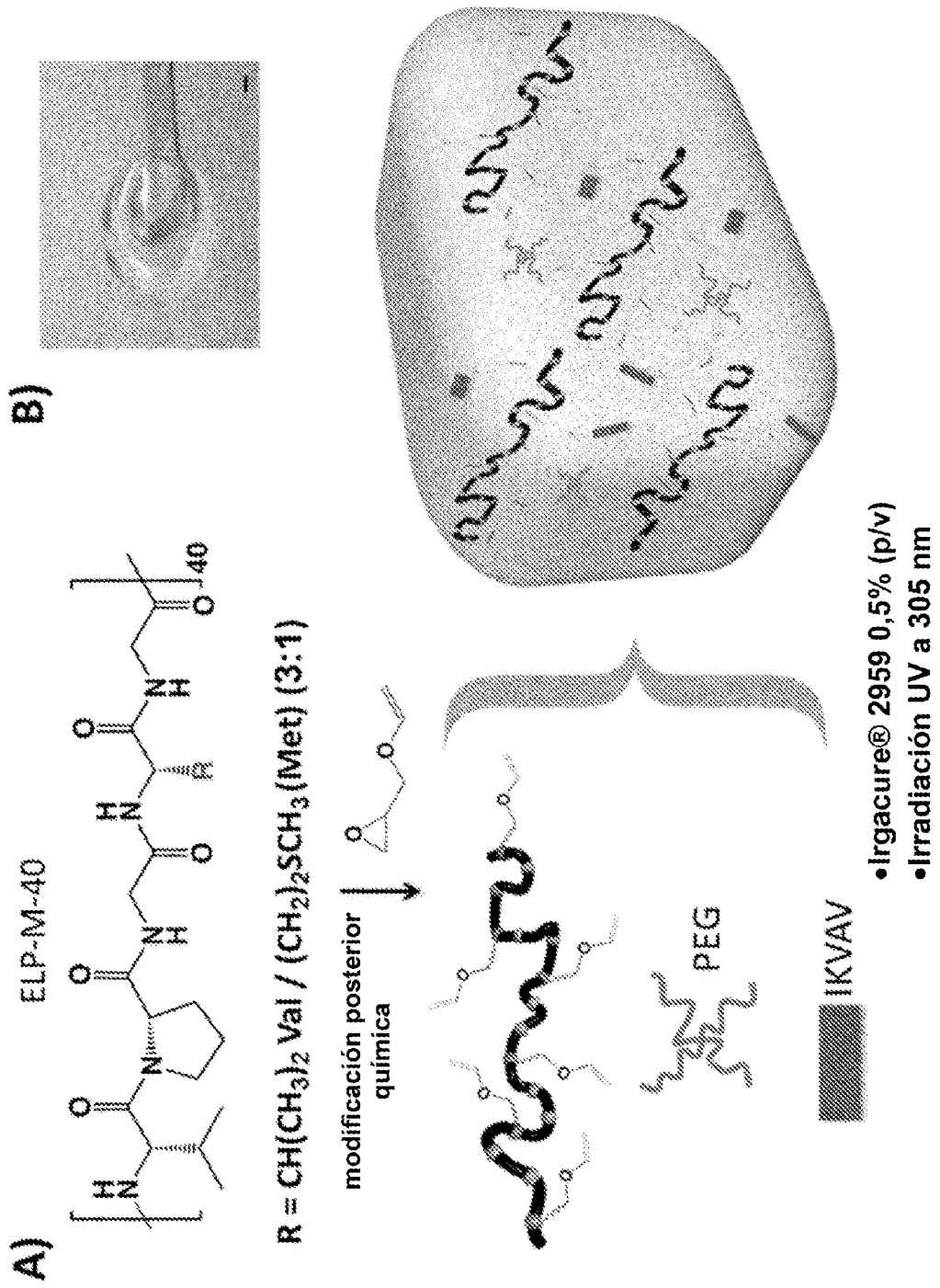


FIGURA 1

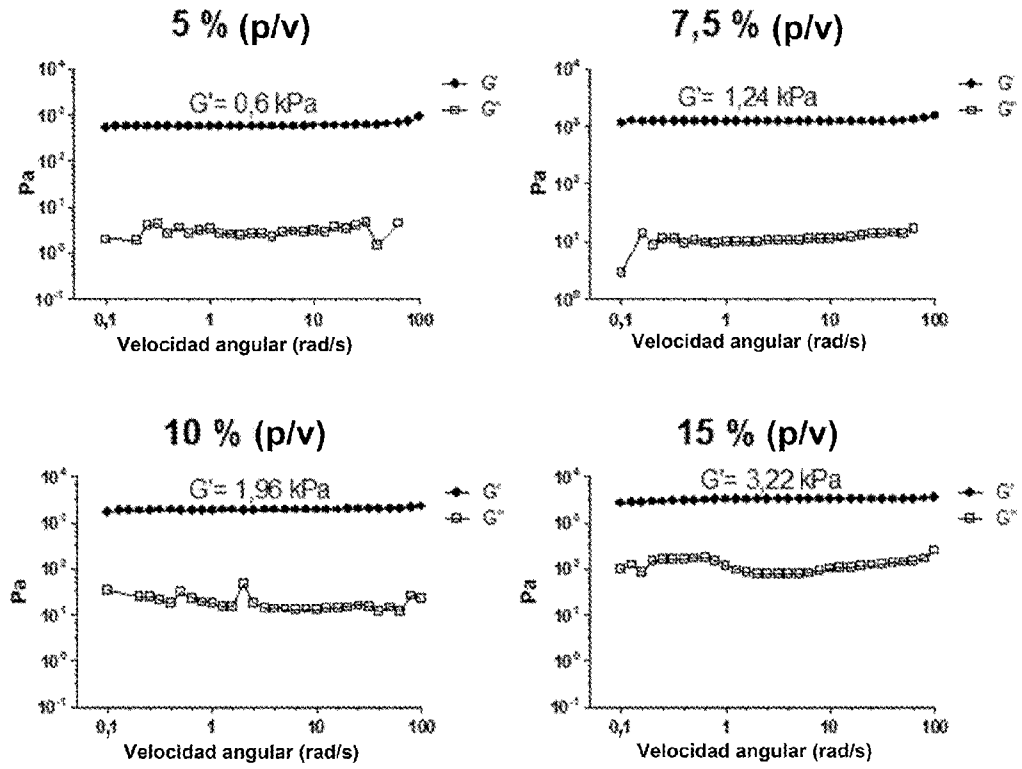


FIGURA 2

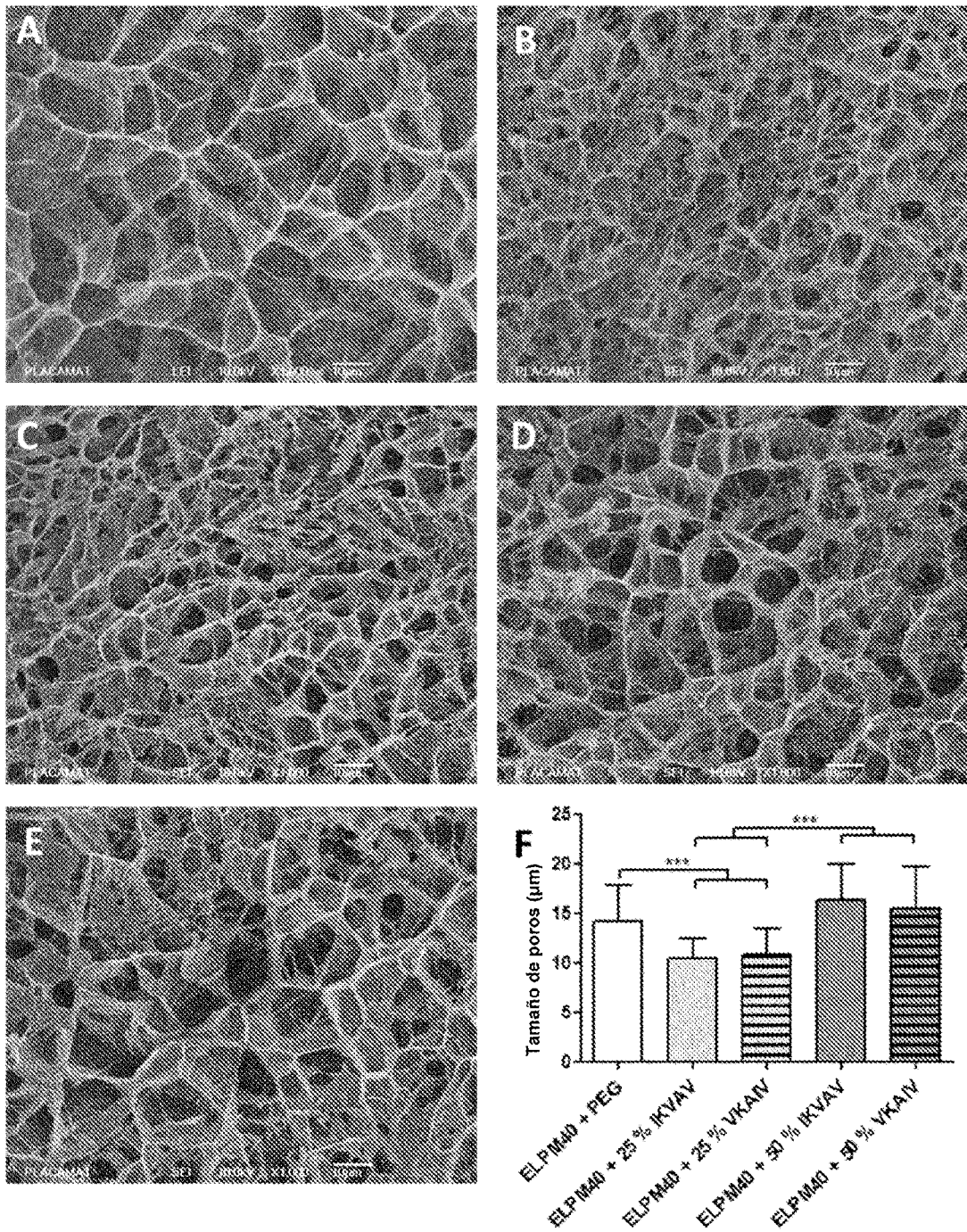


FIGURA 3

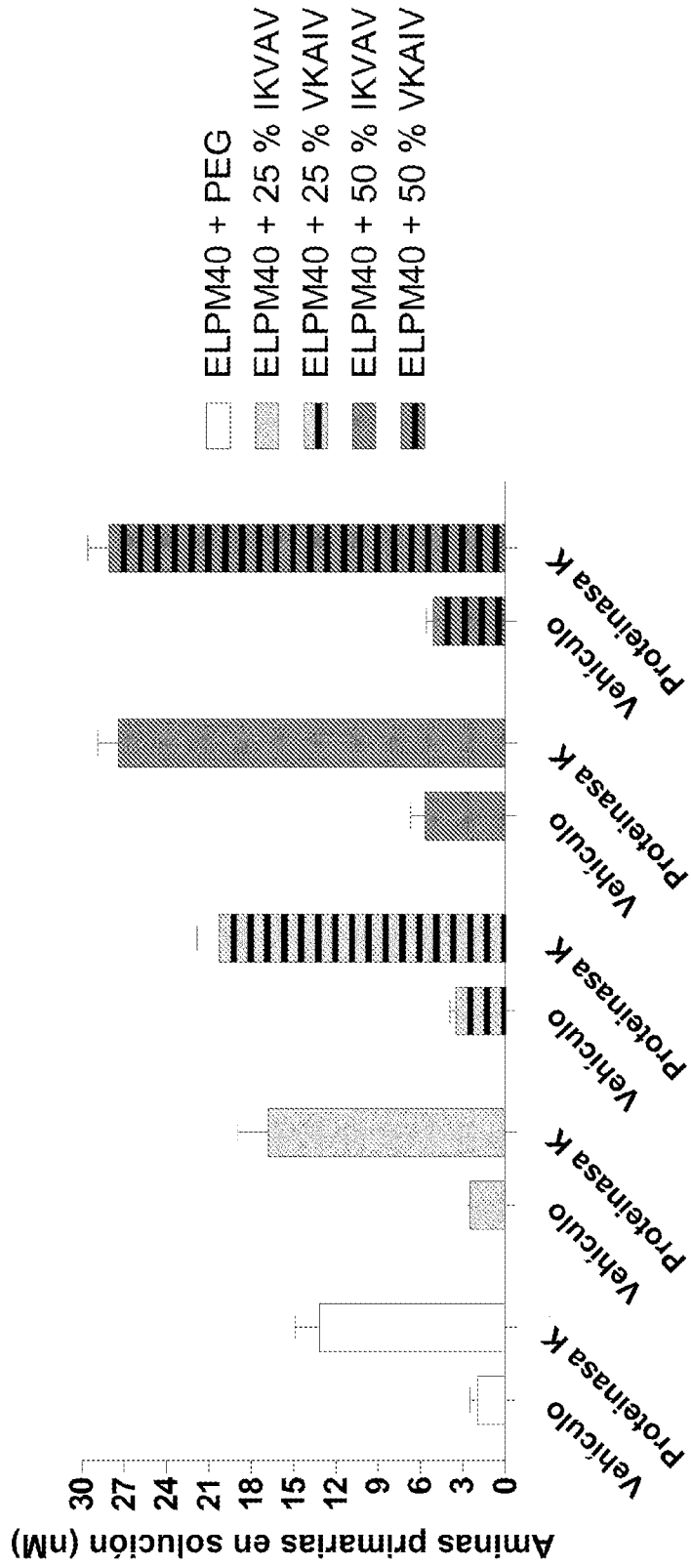


FIGURA 4

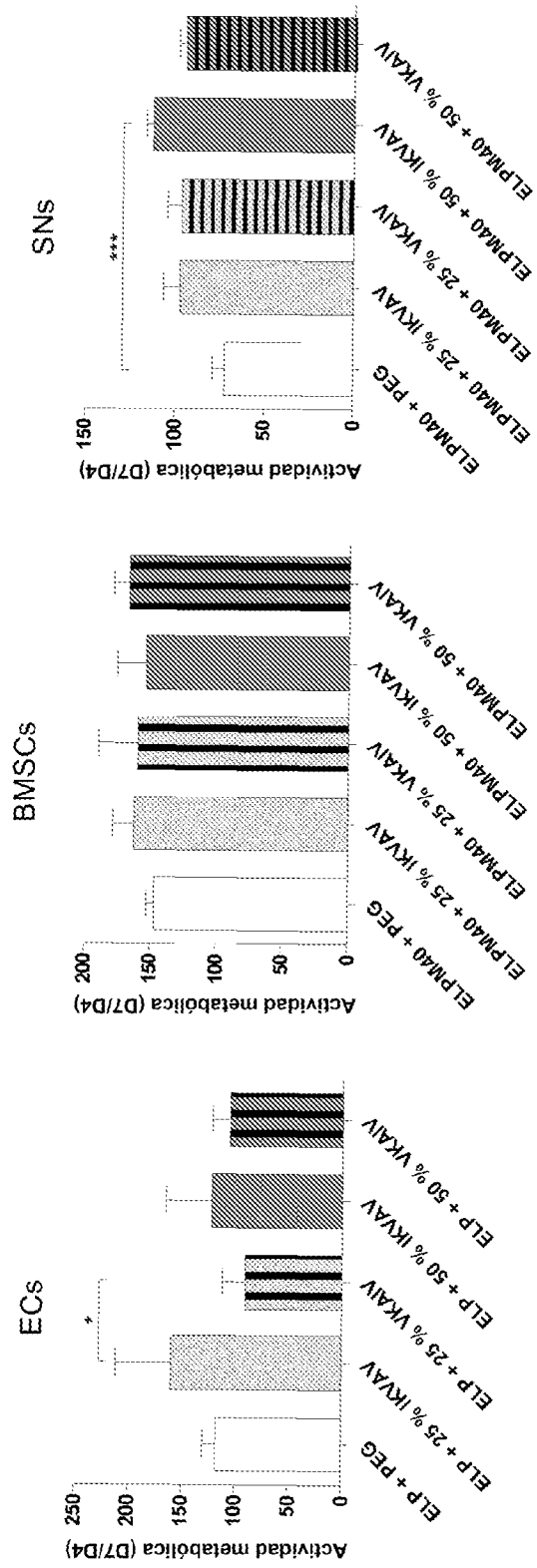


FIGURA 5

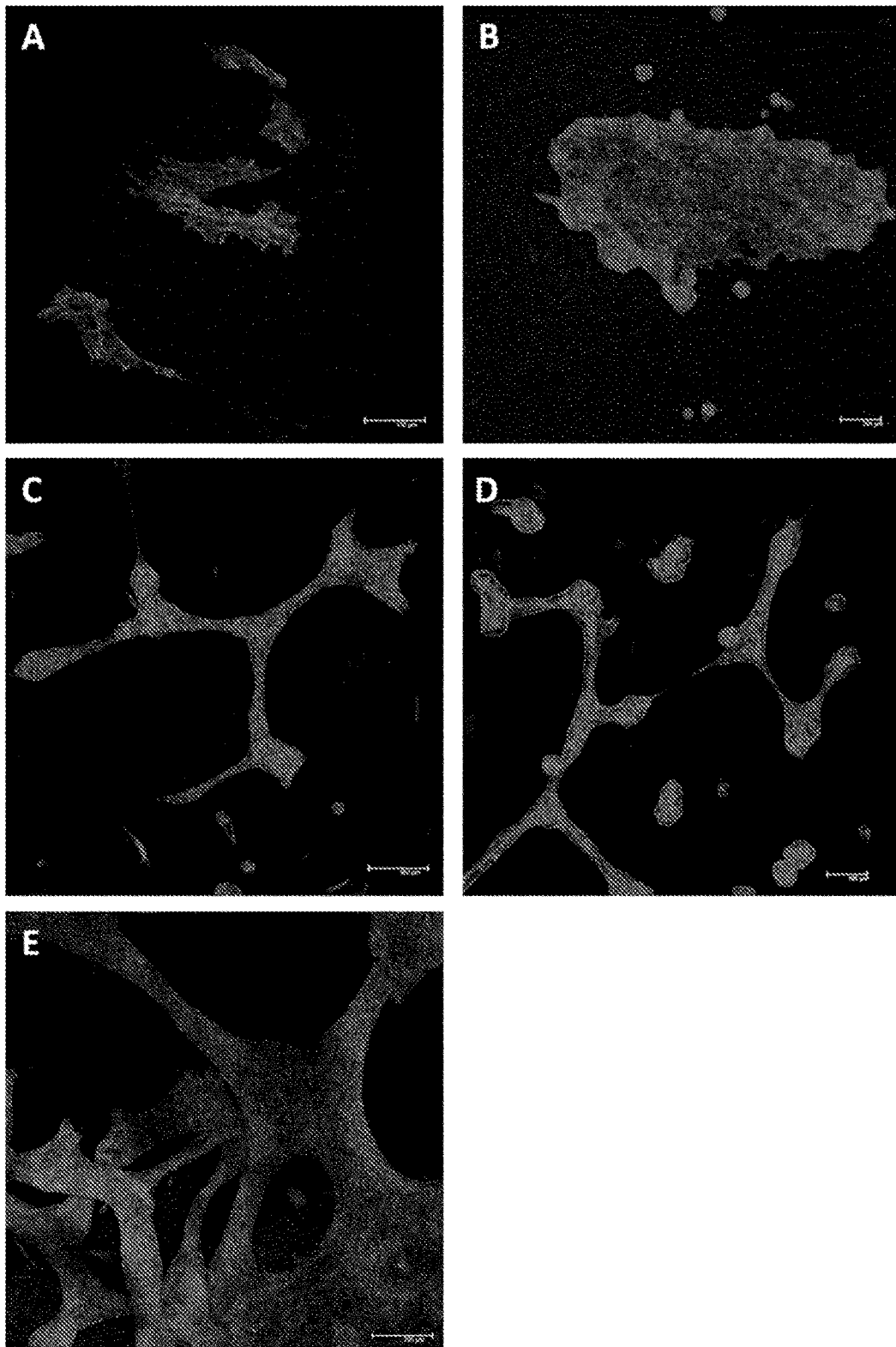


FIGURA 6

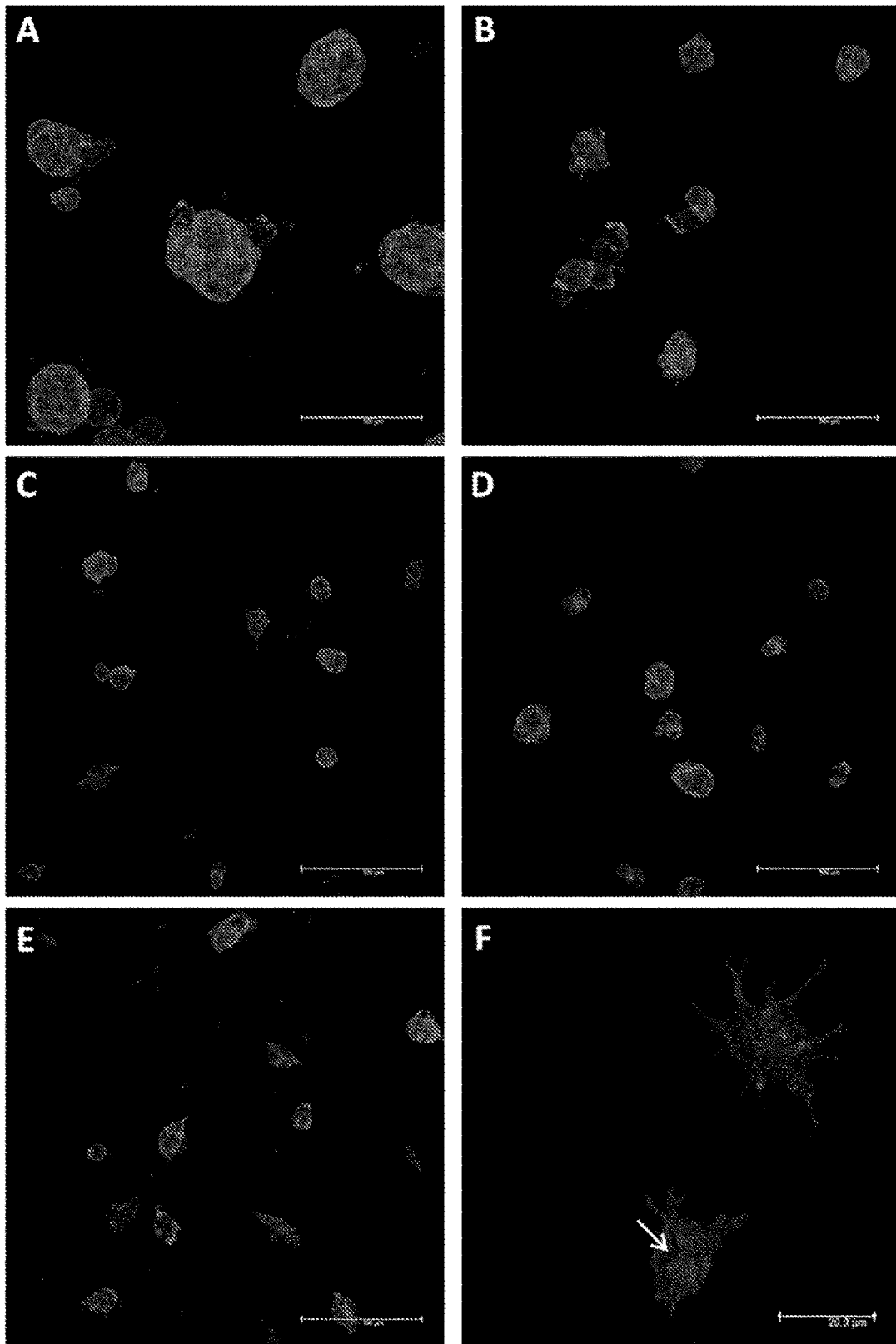


FIGURA 7

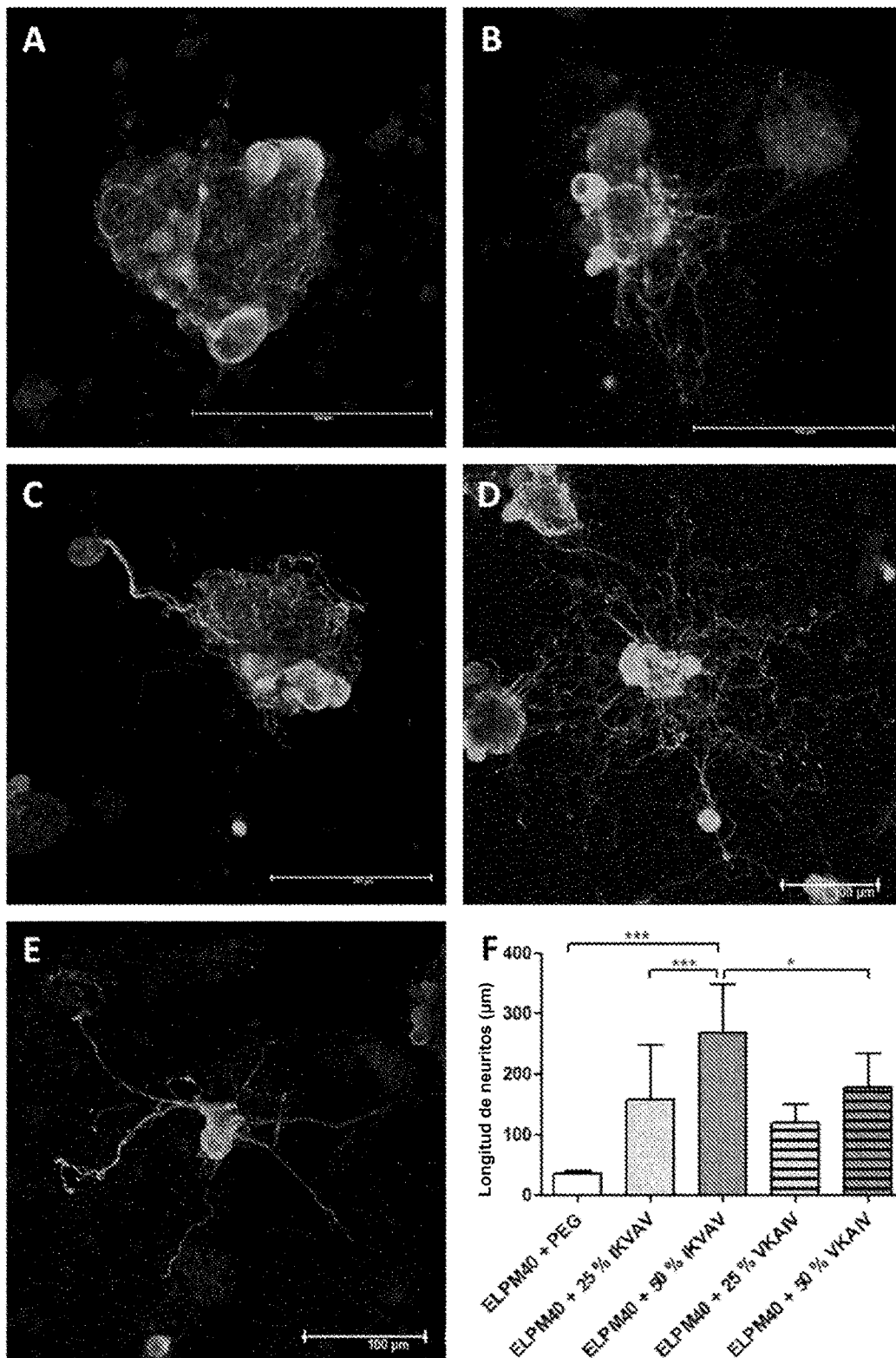


FIGURA 8

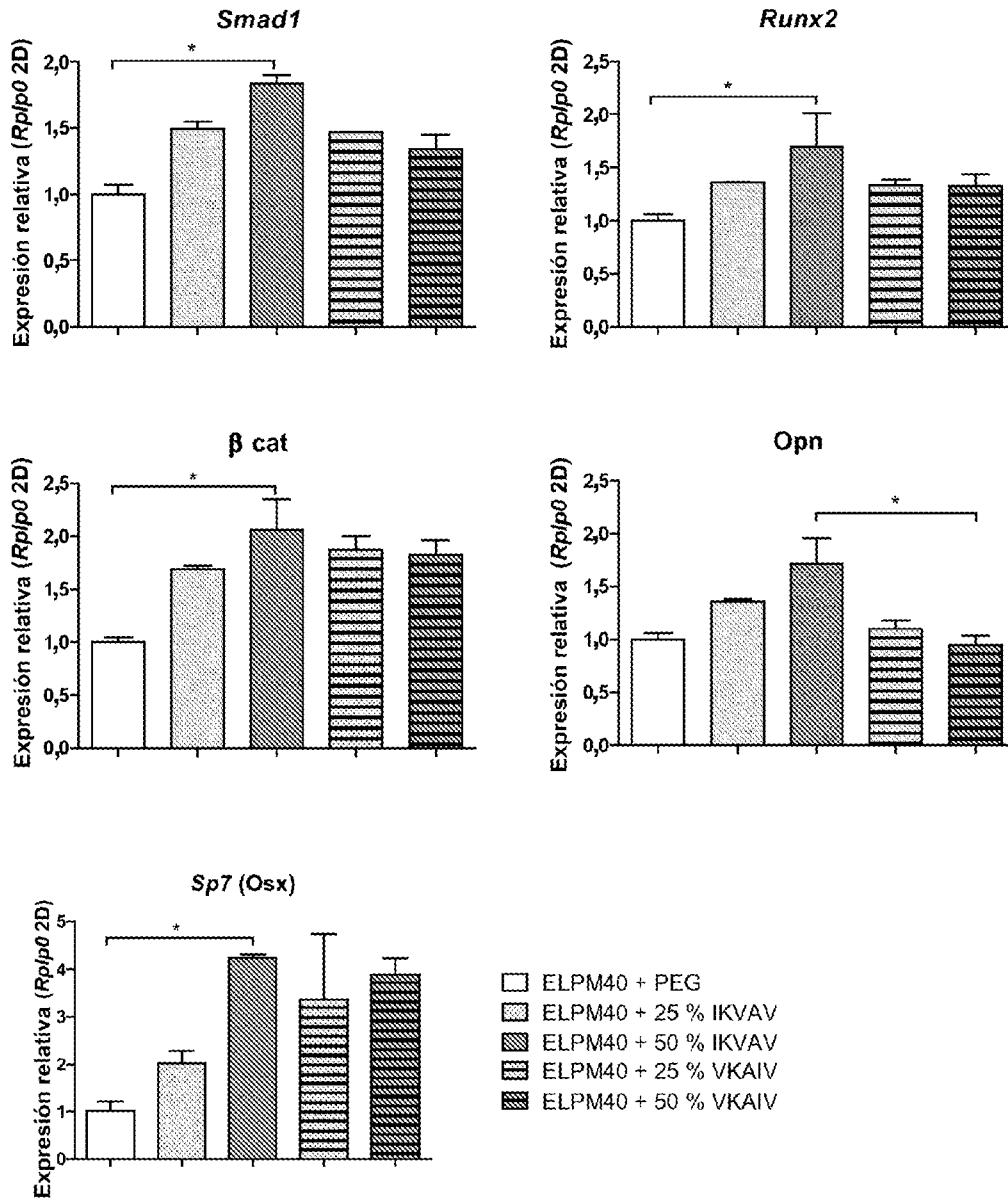


FIGURA 9

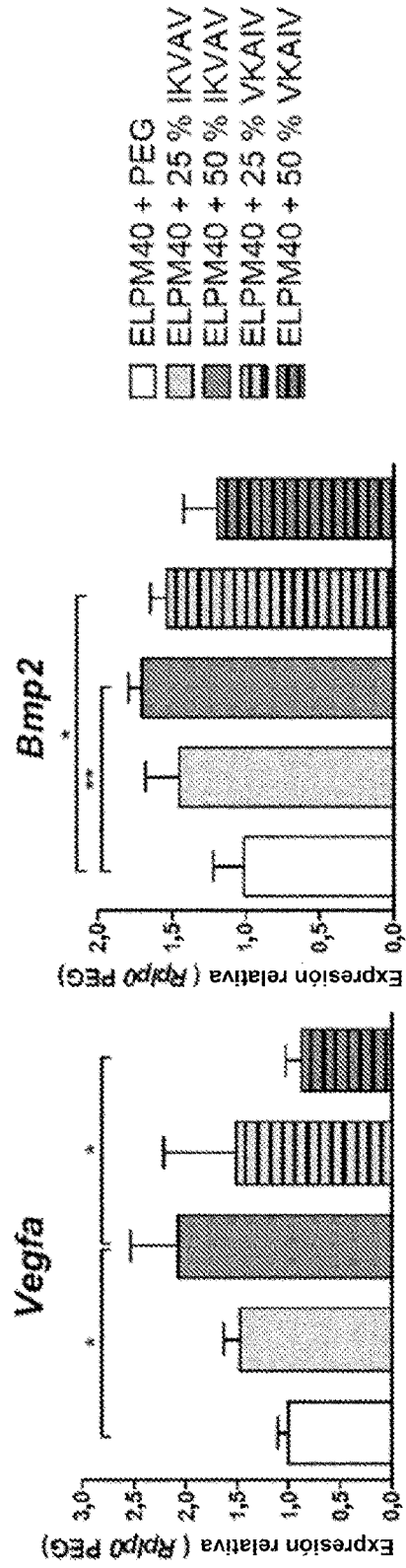


FIGURA 9 (CONTINUACIÓN)

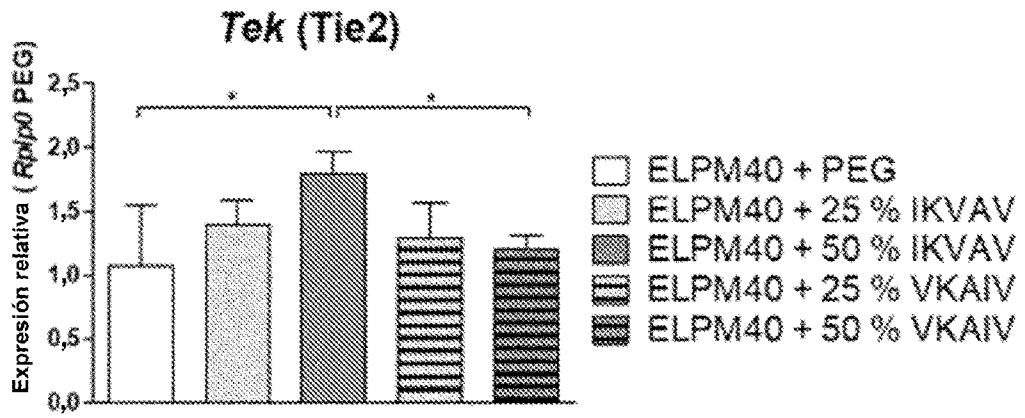


FIGURA 10

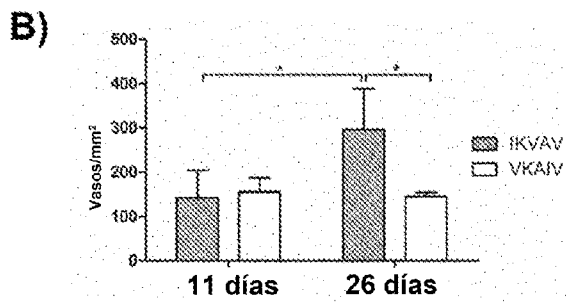
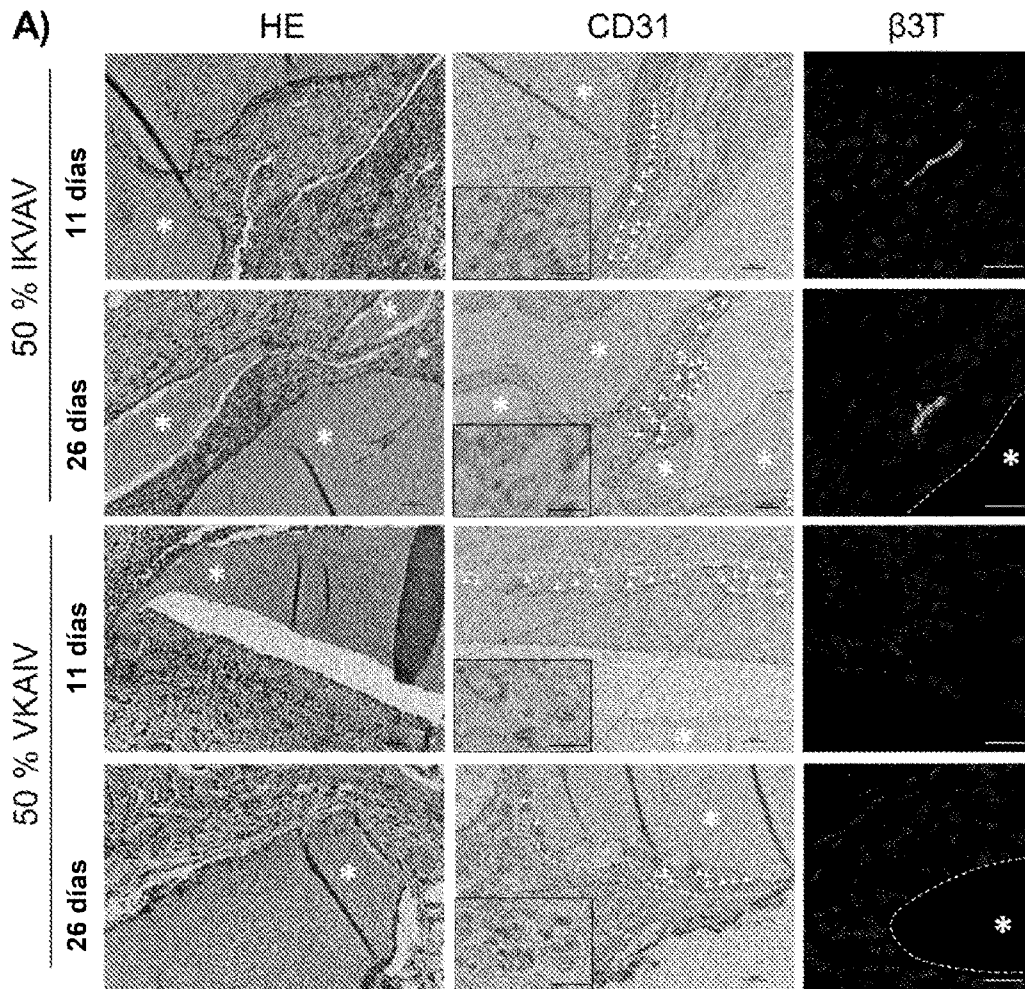


FIGURA 11